Tämä asiakirja on ainoastaan dokumentoinnin apuväline eikä sillä ole oikeudellista vaikutusta. Unionin toimielimet eivät vastaa sen sisällöstä. Säädösten todistusvoimaiset versiot on johdanto-osineen julkaistu Euroopan unionin virallisessa lehdessä ja ne ovat saatavana EUR-Lexissä. Näihin virallisiin teksteihin pääsee suoraan tästä asiakirjasta siihen upotettujen linkkien kautta.

►B ►C1 **KOMISSION ASETUS (EY) N:o 440/2008,**

annettu 30 päivänä toukokuuta 2008,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla ◄

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

(EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1)

sellaisena kuin se on muutettuna seuraavilla:

		virallinen lehti		
		N:o	sivu	päivämäärä
►M1	Komission asetus (EY) N:o 761/2009, annettu 23 päivänä heinäkuuta 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Komission asetus (EU) N:o 1152/2010, annettu 8 päivänä joulukuuta 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Komission asetus (EU) N:o 640/2012, annettu 6 päivänä heinäkuuta 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Komission asetus (EU) N:o 260/2014, annettu 24 päivänä tammikuuta 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Komission asetus (EU) N:o 900/2014, annettu 15 päivänä heinäkuuta 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Komission asetus (EU) 2016/266, annettu 7 päivänä joulukuuta 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Komission asetus (EU) 2017/735, annettu 14 päivänä helmikuuta 2017	L 112	1	28.4.2017
►M8	Komission asetus (EU) 2019/1390, annettu 31 päivänä heinäkuuta 2019	L 247	1	26.9.2019

Oikaistu:

►C1 Oikaisu, EUVL L 151, 10.6.2011, s. 15 (440/2008)

▼B

KOMISSION ASETUS (EY) N:o 440/2008,

annettu 30 päivänä toukokuuta 2008,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

1 artikla

Asetuksen (EY) N:o 1907/2006/EY soveltamiseksi käytettävät testimenetelmät vahvistetaan tämän asetuksen liitteessä.

2 artikla

Komissio tarkastelee tarvittaessa uudelleen tässä asetuksessa mainittuja testimenetelmiä, jos niitä on tarpeen muuttaa selkärankaisilla eläimillä tehtävien kokeiden korvaamiseksi, vähentämiseksi ja menetelmien parantamiseksi.

3 artikla

Viittauksia direktiivin 67/548/ETY liitteeseen V pidetään viittauksina tähän asetukseen.

4 artikla

Tämä asetus tulee voimaan seuraavana päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä.*

Sitä sovelletaan 1 päivästä kesäkuuta 2008.

▼B

LIITE

▼M6

Huomautus:

Ennen kuin mitään seuraavista testimenetelmistä käytetään useammasta ainesosasta koostuvan aineen, koostumukseltaan tuntemattoman tai vaihtelevan aineen, kompleksin reaktiotuotteen tai biologisen materiaalin tai seoksen testauksessa ja siinä tapauksessa, että testimenetelmän soveltuvuutta useammasta ainesosasta koostuvan aineen, koostumukseltaan tuntemattoman tai vaihtelevan aineen, kompleksin reaktiotuotteen tai biologisen materiaalin tai seosten testaamiseen ei ole esitetty kyseisessä testimenetelmässä, on harkittava, onko menetelmä riittävä suunnitellun sääntelytarkoituksen kannalta.

Jos testimenetelmää käytetään useammasta ainesosasta koostuvan aineen, koostumukseltaan tuntemattoman tai vaihtelevan aineen, kompleksin reaktiotuotteen tai biologisen materiaalin tai seoksen testaamiseen, seoksen koostumuksesta olisi saatava riittävästi tietoa, mahdollisuuksien mukaan esimerkiksi seuraavien avulla: ainesosien kemiallinen koostumus, esiintymistiheys ja aineosan asiaa koskevat erityisominaisuudet.

▼B

OSA A: FYSIKAALIS-KEMIALLISTEN OMINAISUUKSIEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

SISÄLLYSLUETTELO

A.1 SULAMIS-/JÄÄTYMISLÄMPÖTILA

A.2 KIEHUMISLÄMPÖTILA

A.3 SUHTEELLINEN TIHEYS

A.4 HÖYRYNPAINE

A.5 PINTAJÄNNITYS

A.6 VESILIUKOISUUS

A.8 JAKAANTUMISKERROIN

A.9 LEIMAHDUSPISTE

A.10 SYTTYVYYS (KIINTEÄT AINEET)

A.11 SYTTYVYYS (KAASUT)

A.12 SYTTYVYYS (KOSKETUS VEDEN KANSSA)

A.13 KIINTEIDEN AINEIDEN JA NESTEIDEN ITSESYTTYVYYS

A.14 RÄJÄHTÄVYYS

A.15 ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA (NESTEET JA KAASUT)

A.16 KIINTEIDEN AINEIDEN SUHTEELLINEN ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA

A.17 HAPETTAVAT OMINAISUUDET (KIINTEÄT AINEET)

A.18 POLYMEERIEN LUKUKESKIMÄÄRÄINEN MOLEKYYLIPAINO JA MOLEKYYLIPAINOJAKAUMA

A.19 PIENIMOLEKYYLISTEN AINEIDEN PITOISUUS POLYMEERISSÄ

A.20 VESILIUOKSESSA OLEVIEN POLYMEERIEN LIUKENEMIS/UUTTUMISOMINAISUUDET

A.21 HAPETTAVAT OMINAISUUDET (NESTEET)

A.22 KUITUJEN HALKAISIJAN PITUUSPAINOTETTU GEOMETRINEN KESKIARVO

A.23 JAKAANTUMISKERROIN (1-OKTANOLI-VESI): HITAAN SEKOITUKSEN MENETELMÄ

A.24 JAKAANTUMISKERROIN (N-OKTANOLI/VESI), KORKEAN SUORITUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIA (HPLC-MENETELMÄ)

A.25 DISSOSIAATIOVAKIOT VEDESSÄ (TITRAUSMENETELMÄ – SPEKTROFOTOMETRINEN MENETELMÄ – KONDUKTOMETRINEN MENETELMÄ)

▼B

A.1 SULAMIS-/JÄÄTYMISLÄMPÖTILA

1. MENETELMÄ

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteissä (2) ja (3).

1.1 JOHDANTO

Kuvattuja menetelmiä ja laitteita voidaan soveltaa aineiden sulamislämpötilan määritykseen ilman rajoituksia aineiden puhtausasteen suhteen.

Sopiva menetelmä valitaan testattavan aineen luonteen mukaan. Aineet voivat olla helposti, vaikeasti tai ei lainkaan jauhettavissa.

Joidenkin aineiden kohdalla on käytännöllisempää määrittää jäätymis- tai jähmettymislämpötila, ja tästä syystä menetelmään on myös otettu mukaan tällaisten määritysten standardit.

Jos aineen ominaisuudet ovat sellaiset, että mikään edellä mainituista parametreista ei ole mitattavissa, voidaan joissakin tapauksissa käyttää jähmettymispistettä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan sulamislämpötila on se lämpötila, jossa tapahtuu faasimuutos kiinteästä olomuodosta nestemäiseen olomuotoon ilmakehän paineessa. Ihannetapauksissa sulamislämpötila on sama kuin jäätymislämpötila.

Koska faasimuutos kattaa usein määrätyn lämpötila-alueen, voidaan käyttää myös käsitettä sulamisalue.

Yksiköiden muuntaminen (K > ^{o}C)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-lämpötila, Celsius-astetta (^{o}C)

T: termodynaaminen lämpötila, kelviniä (K)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Viitteessä (4) kuvataan joitakin kalibrointiaineita.

▼B

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATTEET

Määritetään lämpötila (lämpötila-alue), jossa tapahtuu faasimuutos kiinteästä olomuodosta nestemäiseen olomuotoon tai päinvastoin. Käytännössä määritetään sulamisen tai jäätymisen alku- ja loppulämpötila kuumennettaessa tai jäähdytettäessä näytettä ilmakehän paineessa. Jäljempänä kuvataan viisi menetelmätyyppiä: kapillaarimenetelmä, kuuma-alustamenetelmät, jäätymislämpötilan määritykset, terminen analyysi ja jähmettymispisteen määritys (kehitetty paloöljyjä varten).

Joissakin tapauksissa voi olla käytännöllisempää määrittää sulamislämpötilan sijasta jäätymislämpötila.

1.4.1 **Kapillaarimenetelmä**

1.4.1.1 *Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet*

Pieni määrä hienoksi jauhettua näytettä pakataan tiiviisti kapillaariputkeen. Putkea kuumennetaan yhdessä lämpömittarin kanssa siten, että lämpötilan nousu on alle 1 K minuutissa varsinaisen sulamisen aikana. Määritetään sulamisen alku- ja loppulämpötila.

1.4.1.2 *Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet*

Periaate on muutoin sama kuin kohdassa 1.4.1.1, mutta kapillaariputki ja lämpömittari asetetaan kuumennettavaan metallikappaleeseen, jossa on reiät niiden tarkastelua varten.

1.4.1.3 *Valokennoilmaisin*

Kapillaariputkessa olevaa näytettä kuumennetaan metallisylinterissä automaattisesti. Aineen läpi johdetaan valonsäde sylinterin reiän kautta tarkasti kalibroituun valokennoon. Digitaalisesta osoittimesta nähdään kuumennuskammiossa sijaitsevan platinavastuslämpömittarin mittaama lämpötila. Useimpien aineiden optiset ominaisuudet muuttuvat sulamisen myötä valoaläpäisemättömäksi läpinäkyvään, jolloin valokennoon tulevan valonsäteen intensiteetti kasvaa ja digitaalinen osoitin saa pysäytyssignaalin. Menetelmä ei sovellu voimakkaanväristen aineiden mittauksiin.

1.4.2 **Kuuma-alustamenetelmät**

1.4.2.1 *Koflerin kuumasauva*

Koflerin kuumasauvassa on kaksi metalliosaa, joilla on eri lämmönjohtavuus. Sähkölämmitteinen sauva on suunniteltu siten, että lämpötilagradientti on lähes lineaarinen sauvan pituussuunnassa. Sauvan mitattava lämpötila-alue on 283–573 K, ja mittaus tehdään sauvatyyppikohtaisella erikoislaitteella, jossa on osoitinkisko. Aineen sulamislämpötilan määritystä varten näytettä levitetään ohuelti suoraan kuuman sauvan pinnalle. Muutamassa sekunnissa muodostuu selvä raja nestemäisen ja kiinteän faasin välille. Rajan lämpötila luetaan siirtämällä osoitin rajan kohdalle.

▼B

1.4.2.2 *Sulamismikroskooppi*

Sulamismikroskoopin avulla sulamislämpötila voidaan määrittää hyvin pienestä näytemäärästä. Sulamismikroskooppcja on monia eri tyyppejä. Useimmissa malleissa lämpötila mitataan herkän termoparin avulla, mutta myös elohopeamittaria käytetään. Tyypillisessä sulamismikroskoopissa on kuumennuskammio ja tämän sisällä metallilevy, jolle näytettä sisältävä objektilasi asetetaan. Tarvittava valo saadaan kammioon mikroskoopin valaisupeilistä metallilevyn keskiön reiän kautta. Kammion sulkeva lasilevy estää ilman pääsyn näytealueelle mittauksen aikana.

Näytteen kuumentamista säätää reostaatti. Hyvin tarkoissa optisesti anisotrooppisten aineiden mittauksissa voidaan käyttää polarisoitua valoa.

1.4.2.3 *Meniskimenetelmä*

Tätä menetelmää käytetään erityisesti polyamidien ominaisuuksien mittauksissa.

Määritetään visuaalisesti lämpötila, jossa polyamidinäytteellä lepäävä kuumennusalustan ja lasilevyn välinen silikoniöljymeniski liikkuu.

1.4.3 **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmä**

Näyte pannaan erityiseen koeputkeen, joka asetetaan jäätymislämpötilan määrityslaitteeseen. Näytettä hämmennetään kevyesti koko jäähdyttämisen ajan. Mitataan lämpötila sopivin välein. Kun lämpötila on pysynyt samana muutaman mittauksen ajan, tämä lämpötila (lämpömittarin virheellä korjattuna) katsotaan jäätymislämpötilaksi.

Alijäähtymistä on vältettävä pitämällä yllä kiinteän ja nestemäisen faasin välistä tasapainoa.

1.4.4 **Terminen analyysi**

1.4.4.1 *Differentiaaliterminen analyysi (DTA)*

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) tai eksotermisenä (jäätyminen) poikkeamana lämpötilakäyrän perusviivasta.

▼B

1.4.4.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria (DSC)*

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen energianottoero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Tämä energiaero on energiamäärä, joka tarvitaan pienentämään näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero nollaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä muodonmuutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) tai eksotermisena (jäätyminen) poikkeamana lämpövirran perusviivasta.

1.4.5 **Jähmettymispiste**

Tätä paloöljyjä varten kehitettyä menetelmää voidaan käyttää alhaisen sulamispisteen omaavien öljymäisten aineiden tutkimiseen.

Alustavan kuumennuksen jälkeen näytettä jäähdytetään määrätyllä nopeudella. Jäähtymisen aikana näytteen virtausominaisuuksia tarkastellaan 3 K:n välein. Alin lämpötila, jossa vielä esiinny liikettä, on aineen jähmettymispiste.

1.5 LAATUKRITEERIT

Sulamislämpötilan tai sulamisalueen määritykseen tarkoitettujen menetelmien soveltuvuus ja tarkkuus kuvataan seuraavassa taulukossa:

TAULUKKO: MENETELMIEN SOVELTUVUUS

A. **Kapillaarimenetelmät**

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus ([1])	Nykyinen standardi
Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet	kyllä	vain harvat	273–573 K	± 0,3K	JIS K 0064
Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet	kyllä	vain harvat	293... > 573 K	± 0,5K	ISO 1218(E)
Valokennoilmaisin	kyllä	useat (erikoislaitteiden avulla)	253–573 K	± 0,5 K	

([1]) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan.

▼B

B. **Kuuma-alusta- ja jäätymismenetelmät**

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus (1)	Nykyinen standardi
Koflerin kuumasauva	kyllä	ei	283... > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Sulamismikroskooppi	kyllä	vain harvat	273... > 573 K	± 0,5K	DIN 53736
Meniskimenetelmä	ei	erityisesti polyamidit	293... > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Jäätymislämpötilamenetelmät	kyllä	kyllä	223–573 K	± 0,5 K	esim. BS 4695

(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan.

C. **Terminen analyysi**

Mittausmenetelma	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus (1)	Nykyinen standardi
Differentiaaliterminen analyysi	kyllä	kyllä	173–1 273 K	enintään 600 K ± 0,5 K enintään 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	kyllä	kyllä	173–1 273 K	enintään 600 K ± 0,5 K enintään 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan.

D. **Jähmettymispiste**

Mittausmenetelmä	Jauhettavat aineet	Vaikeasti jauhettavat aineet	Lämpötila-alue	Arvioitu tarkkuus (1)	Nykyinen standardi
Jähmettymispiste	paloöljyt ja öljymäiset aineet	paloöljyt ja öljymäiset aineet	223–323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Vaihtelee laitteen tyypin ja aineen puhtausasteen mukaan.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

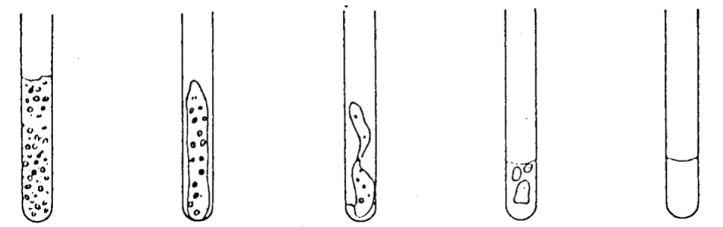
Testimenetelmien työjärjestys on pääosin kuvattu kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa (katso liitettä 1)

1.6.1 **Kapillaariputkimenetelmät**

Kun hienoksi jauhettua ainetta kuumennetaan hitaasti, siinä on yleensä havaittavissa kuvassa 1 esitettävät sulamisvaiheet.

▼B

Kuva 1



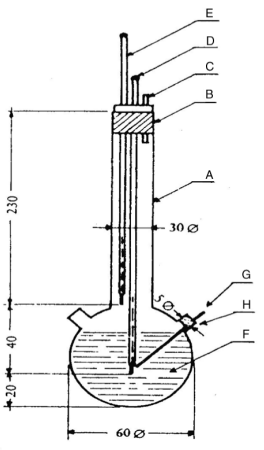
Vaihe A	Sulaminen alkaa: Kapillaariputken sisäseinälle muodostuu yhtenäinen kerros pieniä pisaroita.
Vaihe B	Kutistuminen: Näytteen ja putken sisäseinän väliin muodostuu tyhjä tila.
Vaihe C	Kutistunut näyte vajoaa kasaan ja muuttuu nestemäiseksi.
Vaihe D	Yhtenäinen meniski muodostuu koeputken sisällön pinnalle, mutta huomattava osa näytettä on vielä kiinteässä muodossa.
Vaihe E	Sulamisen loppuvaihe: Nesteen seassa ei enää ole kiinteitä hiukkasia.

Sulamislämpötila määritetään rekisteröimällä sulamisen alku- ja loppulämpötila.

1.6.1.1 *Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet*

Kuvassa 2 on lasista valmistettu standardoitu sulamislämpötilalaite (JIS K 0064). Kaikki mitat ovat millimetreinä.

Kuva 2



A: Mitta-astia
B: Tulppa
C: Ilmaputki
D: Lämpömittari
E: Apulämpömittari
F: Haudeneste
G: Lasinen kapillaariputki, pituus 80–100 mm, sisähalkaisija 1,0 ± 0,2 mm, lasiseinän paksuus 0,2–0,3 mm
H: Sivuputki

▼B

Haudeneste:

Haudeneste valitaan määritettävän sulamislämpötilan mukaan. Jos esimerkiksi sulamislämpötila on enintään 473 K, käytetään paloöljyä, ja jos sulamislämpötila on enintään 573 K, käytetään silikoniöljyä.

Jos sulamislämpötila on suurempi kuin 523 K, voidaan käyttää seosta, jossa on kolme paino-osaa rikkihappoa ja kaksi paino-osaa kaliumsulfaattia. Tätä seosta käytettäessä on noudatettava tarpeellisia varotoimenpiteitä.

Lämpömittari

Käytettävän lämpömittarin tulee täyttää seuraavat tai niitä vastaavat standardit:

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

Työjärjestys:

Kuiva näyte hienonnetaan huhmareessa ja siirretään kapillaariputkeen, jonka toinen pää on suljettu. Näytettä pannaan putkeen sellainen määrä, että sen korkeus tiiviiksi pakattuna on noin 3 mm. Yhtenäisen pakkaustiiviyden saavuttamiseksi kapillaariputki pudotetaan noin 700 mm:n korkeudelta kohtisuoraan lasiputken läpi kellonlasille.

Täytetty kapillaariputki asetetaan hauteeseen siten, että lämpömittarin elohopeanuppi koskettaa kapillaariputkea näytteen kohdalta. Kun kapillaariputki asetetaan hauteeseen, sen lämpötila on yleensä noin 10 K alle sulamislämpötilan.

Hauteen nestettä kuumennetaan siten, että lämpötilan nousu on noin 3 K/min. Nestettä on hämmennettävä. Kun lämpötila on noin 10 K alle sulamislämpötilan, kuumenemista säädetään, niin että lämpötilan nousu on enintään 1 K/min.

Tuloksen laskenta:

Sulamislämpötila lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

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

jossa:

T = korjattu sulamislämpötila kelvineinä

T_D = D-lämpömittarin lukema kelvineinä

T_E = E-lämpömittarin lukema kelvineinä

n = D-lämpömittarin nesteen yläpuolella olevan varren elohopeapylvään astejakojen määrä

1.6.1.2 *Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet*

Laitteisto:

Laitteiston osat ovat seuraavat:

— sylinterinmuotoinen metallikappale, jonka yläosa on ontto ja muodostaa kammion (katso kuvaa 3),

— metallitulppa, jossa on vähintään kaksi reikää, joiden kautta metallikappaleeseen voidaan työntää putkia,

▼B

— metallikappaleen kuumennusjärjestelmä, esimerkiksi kappaleen sisällä oleva sähkövastus,

— reostaatti tehonsäätöä varten (jos käytössä on sähkölämmitys),

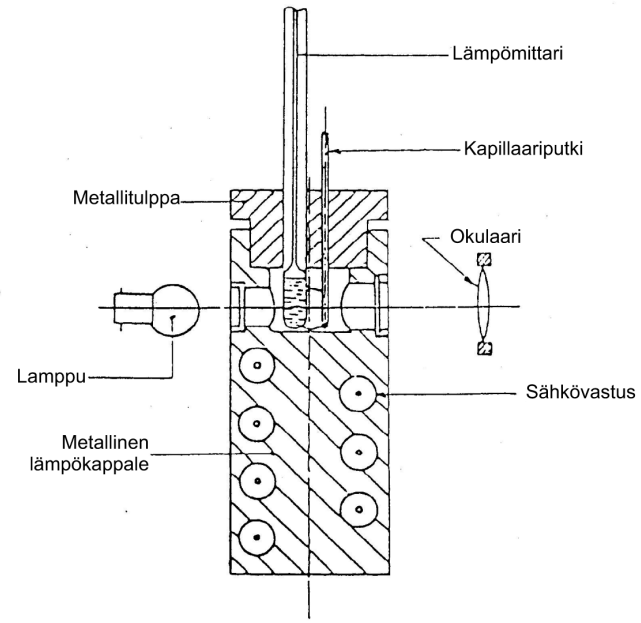
— kammion sivuseinissä neljä lämmönkestävää lasi-ikkunaa, jotka ovat vastakkain ja toisiinsa nähden suorassa kulmassa; yhden ikkunan edessä on okulaari kapillaariputken tarkastelua varten, muiden ikkunoiden läpi johdetaan lampuista valoa kammion sisäosaan,

— lämmönkestävästä lasista valmistettu kapillaariputki, jonka toinen pää on suljettu (katso kohtaa 1.6.1.1).

Lämpömittari:

Katso kohdassa 1.6.1.1 mainittavia standardeja. Myös riittävän tarkkoja lämpösähköisiä mittauslaitteita voidaan käyttää.

Kuva 3



1.6.1.3 *Valokennoilmaisin*

Laitteisto ja työjärjestys:

Laitteisto on automaattisella kuumennusjärjestelmällä varustettu metallikammio. Kolme kapillaariputkea täytetään kohdan 1.6.1.1 ohjeiden mukaan ja asetetaan uuniin.

▼B

Laitteiston kalibroinnin avulla saadaan useita lineaarisia lämpötilan nousukäyriä. Kuumennus säädetään sähköisesti valitun vakion ja lineaarisen nousukäyrän mukaan. Uunin lämpötila ja kapillaariputkessa olevien näytteiden lämpötila ilmenevät rekisteröintilaitteesta.

1.6.2 **Kuuma-alustat**

1.6.2.1 *Koflerin kuumasauva*

Katso liitettä.

1.6.2.2 *Sulamismikroskooppi*

Katso liitettä.

1.6.2.3 *Meniskimenetelmä (polyamidit)*

Katso liitettä.

Sulamislämpötilan alueella lämpötilan nousun on oltava alle 1 K/min.

1.6.3 **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmät**

Katso liitettä.

1.6.4 **Terminen analyysi**

1.6.4.1 *Differentiaaliterminen analyysi*

Katso liitettä.

1.6.4.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria*

Katso liitettä.

1.6.5 **Jähmettymispisteen määritys**

Katso liitettä.

2. **TIEDOT**

Joissakin tapauksissa lämpömittarin korjaus on tarpeen.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset,

— arvio tarkkuudesta.

Sulamislämpötilana raportoidaan vähintään kahden arvioidulla tarkkuusalueella (katso taulukoita) olevan mittauksen keskiarvo.

▼B

Jos sulamisen alku- ja loppulämpötilan ero on menetelmän tarkkuusrajojen sisällä, sulamislämpötilana raportoidaan sulamisen loppuvaiheen lämpötila. Muussa tapauksessa molemmat lämpötilat raportoidaan.

Jos aine hajoaa tai höyrystyy ennen sulamislämpötilaa, raportoidaan lämpötila, jossa hajoaminen tai höyrystyminen on tapahtunut.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

4. **VIITTEET**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) UIPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, 803-834.

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

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

▼B

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa.

1. **Kapillaarimenetelmät**

1.1 Nestehauteella varustetut sulamislämpötilalaitteet

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

1.2 Metallikappaleeseen perustuvat sulamislämpötilalaitteet

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of ‘melting point’

2. **Kuuma-alustat**

2.1 Koflerin kuumasauva

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

2.2 Sulamismikroskooppi

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3 Meniskimenetelmä (polyamidit)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of ‘melting point’

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du ‘point de fusion’. méthode du ménisque.

3. **Jäätymislämpötilan määritysmenetelmät**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallsation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Terminen analyysi**

4.1 Terminen differentiaalianalyysi

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

▼B

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

4.2 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria

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

5. **Jähmettymispisteen määritys**

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

▼B

A.2 KIEHUMISLÄMPÖTILA

1. MENETELMÄ

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteissä (2) ja (3).

1.1 JOHDANTO

Tässä kuvattuja menetelmiä ja laitteita voidaan soveltaa nesteiden ja matalissa lämpötiloissa sulavien aineiden kiehumispisteen määritykseen, edellyttäen että aineissa ei tapahdu kemiallisia reaktioita ennen kiehumista (esimerkiksi itsehapettumista, rakennemuutoksia, hajoamista tms.). Menetelmät soveltuvat sekä puhtaisiin että epäpuhtaisiin nestemäisiin aineisiin.

Päähuomion kohteena ovat valokennoilmaisimiin ja termiseen analyysiin perustuvat menetelmät, koska näiden menetelmien avulla voidaan määrittää sekä sulamis- että kiehumislämpötila. Lisäksi mittaukset voidaan suorittaa automaattisesti.

Ns. dynaamisen menetelmän etu on se, että menetelmää voidaan käyttää höyrynpaineen määritykseen. Tällöin kiehumislämpötilaa ei tarvitse korjata normaaliin paineeseen (101,325 kPa), koska normaalipainetta voidaan mittauksen aikana säätää painekytkimen avulla.

Huomautuksia:

Epäpuhtauksien vaikutus kiehumislämpötilan määritykseen vaihtelee huomattavasti niiden luonteen mukaan. Jos näyte sisältää haihtuvia epäpuhtauksia, jotka voivat vaikuttaa tulokseen, aine voidaan puhdistaa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan normaali kiehumislämpötila on lämpötila, jossa nesteen höyrynpaine on 101,325 kPa.

Jos kiehumislämpötilaa ei mitata normaalissa ilmakehän paineessa, lämpötilan riippuvuus höyrynpaineesta voidaan esittää Clausius-Clapeyronin yhtälön avulla:

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

jossa:

p = aineen höyrynpaine (Pa)

ΔH_v = höyrystymislämpö (J mol^{-1})

R = yleinen molaarinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = termodynaaminen lämpötila (K)

Kiehumislämpötilan rekisteröinnissä otetaan huomioon mittauksen aikana vallitseva ympäristön paine.

▼B

Muunnokset:

Paine (yksikkö: kPa)

100 kPa = 0,1 bar = 0,1 MPa

(yksikköä bar (baari) saa edelleen käyttää, mutta sitä ei suositella)

133 Pa = 1 mmHg = 1 Torr

(yksiköitä mmHg ja Torr ei saa käyttää)

1 atm = normaali-ilmakehä = 101 325 Pa

(yksikköä atm ei saa käyttää)

Lämpötila (yksikkö: K)

t = T - 273,15

t: Celsius-lämpötila, Celsius-asteina (^{o}C)

T: termodynaaminen lämpötila, kelvineinä (K)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Liitteessä kuvattavissa menetelmissä mainitaan joitakin kalibrointiaineita.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATTEET

Kiehumislämpötilan (kiehumisalueen) määritysmenetelmistä viisi perustuu kiehumislämpötilan mittaamiseen ja kaksi termiseen analyysiin.

1.4.1 **Ebulliometrimenetelmä**

Ebulliometrit kehitettiin alun perin molekyylipainon määritykseen kiehumispisteen kohoamisen avulla, mutta niitä voidaan myös käyttää tarkan kiehumislämpötilan määritykseen. Standardissa ASTM D 1120-72 (katso liitettä) kuvataan yksinkertainen laitteisto, jolla neste kuumennetaan tasapaino-olosuhteissa kiehumispisteeseen.

1.4.2 **Dynaaminen menetelmä**

Mitataan höyryn jälleenlauhtumislämpötila pitämällä tarkoitukseen soveltuvaa lämpömittaria höyryn palautusvirrassa nesteen kiehuessa. Tämä menetelmä sallii paineen vaihtelun.

1.4.3 **Tislausmenetelmä**

Neste tislataan ja höyryn jälleenlauhtumislämpötila sekä tisleen määrä mitataan.

▼B

1.4.4 **Siwoloboffin menetelmä**

Näyte kuumennetaan putkiottimessa, joka upotetaan kuumahauteen nesteeseen. Putkiottimeen pannaan suljettu kapillaari, jonka alaosassa on ilmakupla.

1.4.5 **Valokennomenetelmä**

Tehdään automaattisia valosähköisiä mittauksia nousevien ilmakuplien avulla Siwoloboffin menetelmän mukaan.

1.4.6 **Differentiaaliterminen analyysi**

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (kiehuminen) poikkeamana lämpötilakäyrän perusviivasta.

1.4.7 **Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria**

Tämän tekniikan avulla voidaan rekisteröidä näytteen ja vertailuaineen energianottoero lämpötilan funktiona, kun näytettä ja vertailuainetta käsitellään saman valvotun lämpötilaohjelman mukaan. Tämä energiaero on energiamäärä, joka tarvitaan pienentämään näytteen ja vertailuaineen lämpötilaero nollaan. Kun näytteessä tapahtuu entalpiamuutoksen sisältävä olomuodon muutos, muutos näkyy endotermisenä (sulaminen) poikkeamana lämpövirran perusviivasta.

1.5 LAATUKRITEERIT

Kiehumislämpötilan ja kiehumisalueen määritykseen tarkoitettujen menetelmien soveltuvuus ja tarkkuus kuvataan taulukossa 1.

Taulukko 1

Menetelmien vertailu

Mittausmenetelmä	Arvioitu tarkkuus	Nykyinen standardi
Ebullioometri	± 1,4 K (enintään 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (enintään 600 K) (1) (2)	ASTMD 1120-720 (1)
Dynaaminen menetelmä	± 0,5 K (enintään 600 K) (2)	
Tislausprosessi (kiehumisalue)	± 0,5 K (enintään 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboffin menetelmä	± 2 K (enintään 600 K) (2)	
Valokennomenetelmä	± 0,3 K (enintään 373 K) (2)	
Differentiaaliterminen analyysi	± 0,5 K (enintään 600 K) ± 2,0 K (enintään 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	± 0,5 K (enintään 600 K) ± 2,0 K (enintään 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Koskee vain esimerkiksi ASTM D 1120-72:ssa kuvattujen yksinkertaisten laitteiden avulla tehtäviä määrityksiä. Tarkkuutta voidaan parantaa käyttämällä kehittyneempiä laitteita.

(2) Koskee vain puhtaita aineita. Menetelmän käyttö muissa olosuhteissa on perusteltava.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Joidenkin testimenetelmien työjärjestys on kuvattu kansainvälisissä ja kansallisissa standardeissa (katso liitettä).

1.6.1 **Ebulliometrimenetelmä**

Katso liitettä.

1.6.2 **Dynaaminen menetelmä**

Katso testimenetelmää A4, höyrynpaineen määritys.

Rekisteröidään havaittu kiehumislämpötila 101,325 kPa:n paineessa.

1.6.3 **Tislausmenetelmä**

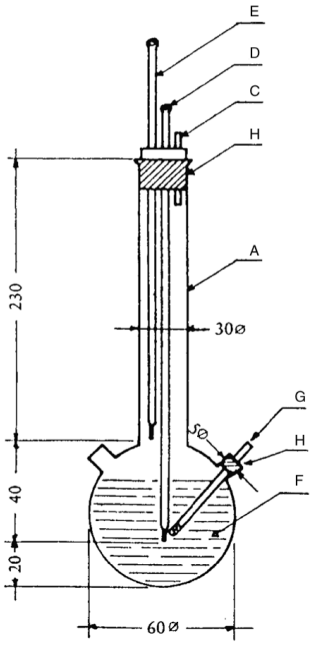
Katso liitettä.

1.6.4 **Siwoloboffin menetelmä**

Näyte pannaan putkiottimeen, jonka halkaisija on noin 5 mm (kuva 1). Putkiotinta kuumennetaan sulamislaitteella.

Kuvassa 1 on lasista valmistettu standardisoitu sulamis- ja kiehumislämpötilalaite (JIS K 0064). Kaikki mitat ovat millimetreinä.

Kuva 1



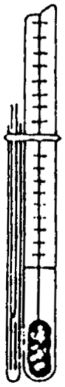
A: Mitta-astia
B: Korkki
C: Ilmanvaihtoputki
D: Lämpömittari
E: Apulämpömittari
F: Haudeneste
G: Putkiotin, jonka ulkohalkaisija on enintään 5 mm, ja sen sisällä kapillaariputki, jonka pituus on noin 100 mm, sisähalkaisija noin 1 mm ja lasiseinän paksuus 0,2-0,3 mm
H: Sivuputki

Kapillaariputki (kiehumiskapillaari), joka on suljettu noin 1 cm alareunan yläpuolelta, asetetaan putkiottimeen. Näytettä lisätään niin paljon, että kapillaariputken suljettu osa on nestepinnan alapuolella. Kiehumiskapillaarin sisältävä putkiotin kiinnitetään lämpömittariin kuminauhan avulla tai tuetaan sivulta muulla tavoin (katso kuva 2).

▼B

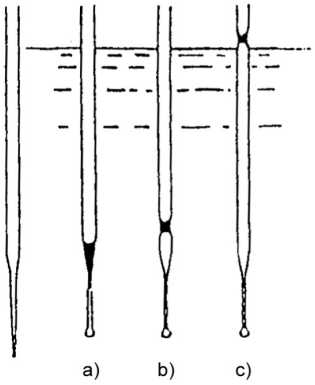
Kuva 2

Siwoloboffin periaate



Kuva 3

Muunneltu periaate



Haudeneste valitaan mitattavan kiehumislämpötilan mukaan. Mitattaessa alle 573 K:n lämpötiloja voidaan käyttää silikoniöljyä. Parafiiniöljyä voidaan käyttää vain 473 K:iin asti. Alussa haudenestettä kuumennetaan siten, että lämpötila nousee 3 K/min. Kuumentamisen aikana nestettä on hämmennettävä. Kun lämpötila on noin 10 K odotetun kiehumispisteen alapuolella, kuumennusta hidastetaan, niin että lämpötila nousee alle 1 K/min. Kun lämpötila on saavuttanut kiehumispisteen, kiehumiskapillaarista alkaa nopeasti nousta kuplia.

Kiehumislämpötila on lämpötila, jossa kuplien nousu lakkaa ja neste alkaa nousta nopeasti kapillaariputkessa hetkellisen jäähdyttämisen seurauksena. Lämpömittarin lukema osoittaa tällöin näytteen kiehumislämpötilaa.

Muunnetun periaatteen mukaan (kuva 3) kiehumispiste määritetään sulamislämpötilakapillaarin avulla. Kapillaariputkeen imetään näytettä, kunnes näytepatsaan korkeus kapillaarissa on noin 2 cm (a). Kapillaariputken kapea pää suljetaan sulattamalla ja pieni ilmakupla jätetään ääripäähän. Kun putkea kuumennetaan sulamislämpötilalaitteessa (b), ilmakupla laajenee. Kiehumislämpötila on se lämpötila, jossa näytteen muodostama tulppa saavuttaa haudenesteen pinnan (c).

1.6.5 **Valokennomenetelmä**

Tässä menetelmässä kuumennettava näyte on metallikappaleeseen asetetussa kapillaariputkessa.

Metallikappaleen reikien kautta johdetaan valonsäde näytteen läpi tarkasti kalibroituun valokennoon.

Kun näytteen lämpötila nousee, kiehumiskapillaarista nousee yksittäisiä kuplia. Kun kiehumislämpötila saavutetaan, kuplien määrä lisääntyy huomattavasti. Tämä aiheuttaa muutoksen valokennon rekisteröimässä valon intensiteetissä. Valokennosta lähtee pysäytyssignaali osoitinlaitteeseen, joka lukee metallikappaleessa sijaitsevan platinavastuslämpömittarin lukeman.

Tämä menetelmä on erityisen käytännöllinen, koska sillä voidaan tehdä määrityksiä kylmissä lämpötiloissa — jopa 253,15 K:ssa (–20 ^{o}C:ssa) asti — ilman laitteeseen tehtäviä muutoksia. Riittää, kun laite asetetaan jäähdytyshauteeseen.

▼B

1.6.6 **Terminen analyysi**

1.6.6.1 *Differentiaaliterminen analyysi*

Katso liitettä.

1.6.6.2 *Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria*

Katso liitettä.

2. **TIEDOT**

Kun poikkeamat normaalipaineesta ovat pieniä (enintään ± 5 kPa), kiehumislämpötilat normalisoidaan T_n:ään Sidney Youngin yhtälön avulla:

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

jossa:

Δp = (101,325 - p) [huomaa etumerkki]

p = paine (kPa)

f_T = kiehumislämpötilan muutos paineen funktiona (K/kPa)

T = mitattu kiehumislämpötila (K)

T_n = normaalipaineeseen korjattu kiehumislämpötila (K).

Lämpötilan korjausvakiot (f_T) ja yhtälöt näiden vakioiden likiarvojen laskemista varten sisältyvät monien aineiden kohdalla edellä mainittuihin kansainvälisiin ja kansallisiin standardeihin.

Esimerkiksi DIN 53171 -menetelmä mainitsee seuraavat karkeat korjaukset maaleissa käytettävien liuottimien osalta:

Taulukko 2

Lämpötilat ja vastaavat korjauskertoimet f_T

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

▼B

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset,

— arvio tarkkuudesta.

Kiehumislämpötilana raportoidaan vähintään kahden, arvioidun tarkkuusalueen (katso taulukoita) sisällä olevan mittauksen keskiarvo.

Ilmoitetaan mitatut kiehumislämpötilat ja näiden keskiarvo. Mittaushetkellä vallinnut paine ilmoitetaan kilopascaleina (kPa). Paineen tulisi olla lähellä normaalia ilmakehän painetta.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

4. **VIITTEET**

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

(2) UICPA, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.

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

▼B

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa.

1. **Ebulliometri**

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

2. **Tislausprosessi (kiehumisalue)**

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

3. **Differentiaaliterminen analyysi ja differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria**

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

▼B

A.3 SUHTEELLINEN TIHEYS

1. MENETELMÄ

Tässä kuvattavat menetelmät perustuvat pääosin OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteessä (2).

1.1 JOHDANTO

Tässä kuvattavia suhteellisen tiheyden määritysmenetelmiä voidaan soveltaa kiinteisiin ja nestemäisiin aineisiin, ilman rajoituksia aineiden puhtauden suhteen. Luettelo menetelmistä on taulukossa 1.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Kiinteiden ja nestemäisten aineiden suhteellinen tiheys (D_4^{20}) ilmaisee tutkittavan aineen (t = 20 °C) tilavuuden massan ja saman vesimäärän (t = 4 °C) massan suhteen. Suhteellisella tiheydellä ei ole yksikköä.

Aineen tiheys ρ on sen massan (m) ja tilavuuden (v) suhde.

Tiheys ρ ilmaistaan SI-yksikköinä kg/m^3.

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATTEET

Käytössä on neljä menetelmäluokkaa.

1.4.1 **Nesteeseen perustuvat menetelmät**

1.4.1.1 *Hydrometri* (nestemäiset aineet)

Nesteen tiheys voidaan määrittää nopeasti ja tyydyttävän tarkasti kelluvan hydrometrin avulla, jonka asteikosta voidaan lukea uppoamissyvyyteen perustuva tiheyslukema.

1.4.1.2 *Hydrostaattinen vaaka* (nestemäiset ja kiinteät aineet)

Aineen tiheys voidaan määrittää punnitsemalla näyte ensin ilmassa ja sen jälkeen sopivassa nesteessä (esimerkiksi vedessä).

Kiinteiden aineiden kohdalla mitattu tiheys on edustava vain kyseisen näytteen osalta. Nesteiden tiheys määritetään siten, että tunnettu tilavuus (v) punnitaan ensin ilmassa ja sen jälkeen nesteessä.

1.4.1.3 *Uppokappalemenetelmä* (nestemäiset aineet) (4)

Tässä menetelmässä nesteen tiheys määritetään kahden punnitustuloksen eron perusteella. Kun näyte on ensin punnittu, siihen upotetaan kappale, jonka tilavuus on tunnettu, ja punnitus toistetaan.

▼B

1.4.2 **Pyknometrimenetelmät**

Erimuotoisia pyknometrejä, joiden tilavuus on tunnettu, voidaan käyttää kiinteiden ja nestemäisten aineiden tiheyksien määritykseen. Tiheys lasketaan täyden ja tyhjän pyknometrin painoeron ja sen tunnetun tilavuuden perusteella.

1.4.3 **Kaasuvertailupyknometri** (kiinteät aineet)

Kaasuvertailupyknometrin avulla voidaan mitata minkä tahansa aineen tiheys huoneenlämpötilassa, olipa aineen muoto mikä tahansa. Aineen tilavuus mitataan ilmassa tai inerttikaasussa sylinterissä, jonka tilavuus on muutettavissa ja kalibroitu. Tiheyden laskemista varten mitataan tilavuusmittauksen jälkeen aineen massa.

1.4.4 **Oskilloiva densitometri** (5) (6) (7)

Tämän laitteen avulla voidaan mitata nesteen tiheys. U-putken muotoinen mekaaninen oskillaattori asetetaan värähtelemään oskillaattorin resonanssitaajuudella, joka määräytyy oskillaattorin massan mukaan. Kun oskillaattoriin pannaan näyte, resonanssitaajuus muuttuu. Laitteen kalibroinnissa käytetään kahta nestemäistä ainetta, joiden tiheys tunnetaan. Kalibrointiaineet valitaan siten, että niiden tiheydet kattavat mitattavan alueen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Jäljempänä olevassa taulukossa esitetään suhteellisen tiheyden määritysmenetelmien soveltuvuus eri tarkoituksiin.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Lisätietoja teknisistä yksityiskohdista on mm. liitteessä mainituissa standardeissa.

Testit tulee suorittaa lämpötilassa 20 °C. Vähintään kaksi mittausta vaaditaan.

2. **TIEDOT**

Katso standardeja.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset.

Suhteellinen tiheys (D_4^{20}) raportoidaan kohdan 1.2 määrityksen mukaan. Lisäksi on mainittava mitattavan aineen fysikaalinen olomuoto.

Raporttiin tulee sisällyttää myös kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

▼B

Taulukko

menetelmien soveltuvuus

Mittausmenetelmä	Tiheys		Suurin mahdollinen dynaaminen viskositeetti	Nykyiset standardit
	kiinteä aine	neste		
1.4.1.1 Hydrometri		kyllä	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2 Hydrostaattinen vaaka				
(a) kiinteät aineet	kyllä			ISO 1183 (A)
(b) nesteet		kyllä	5 Pa s	ISO 901 ja 758
1.4.1.3 Uppokappalemenetelmä		kyllä	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometri				ISO 3507
(a) kiinteät aineet	kyllä			ISO 1183 (B), NF T 20-053
(b) nesteet		kyllä	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Kaasuvertailupyknometri	kyllä			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4 Oskilloiva densitometri		kyllä	5 Pa s	

4. **VIITTEET**

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Liite

Lisää teknisiä tietoja on seuraavissa standardeissa:

1. **Nesteeseen perustuvat menetelmät**

1.1 Hydrometri

DIN 12790, IS0 387	Hydrormeter; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation Part III: Use and test
ISO 649-2	Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose
NF T 20-050	Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hydrostaattinen vaaka

Kiinteät aineet

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

Nestemäiset aineet

ISO 901	ISO 758

▼B

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

1.3 Uppokappalemenetelmät

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

2. **Pyknometriset menetelmät**

2.1 Nestemäiset aineet

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

▼B

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

▼B

2.2	Kiinteät aineet	
	ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
	NF T 20-053	Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Kaasuvertailupyknometri**	
	DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. HÖYRYNPAINE

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 104 (2004).

1.1 JOHDANTO

Tämä testimenetelmän A.4 (1) tarkistettu versio sisältää yhden uuden menetelmän. Kyseessä on effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria, joka on kehitetty sellaisia aineita varten, joiden höyrynpaine on hyvin alhainen (arvoon 10^{-10} saakka). Koska uusia menetelmiä tarvitaan erityisesti sellaisten aineiden höyrynpaineen määrittämiseksi, joiden höyrynpaine on alhainen, muita tähän testimenetelmän kuuluvia menetelmiä arvioidaan uudelleen sen perusteella, voidaanko niitä käyttää muillakin määritysalueilla.

Termodynaamisen tasapainon vallitessa puhtaan aineen höyrynpaine vaihtelee ainoastaan lämpötilan funktiona. Perusperiaatteita käsitellään kirjallisuuslähteissä (2)(3).

Mitään yksittäistä mittausmenetelmää ei voida käyttää koko höyrynpainealueella arvoa 10^{-10} pienemmistä arvoista arvoon 10^5 Pa. Tähän testimenetelmään kuuluu kahdeksan höyrynpaineen mittausmenetelmää, joita voidaan käyttää eri höyrynpainealueilla. Eri menetelmiä verrataan niiden soveltuvuuden ja mittausalueen suhteen taulukossa 1. Menetelmiä voidaan käyttää ainoastaan sellaisten yhdisteiden tutkimiseen, jotka eivät hajoa testiolosuhteissa. Jos kokeellisia menetelmiä ei voida käyttää teknisistä syistä, höyrynpaine voidaan myös arvioida. Sopivaa arviointimenetelmää kuvataan tämän testimenetelmän lisäyksessä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan aineen höyrynpaine on kiinteään tai nestemäiseen aineeseen ylhäältä kohdistuva kyllästyspaine.

Paineen SI-yksikkö on pascal (Pa), jota tulee käyttää tässä yhteydessä. Aiemmin käytetyt yksiköt ja niiden muuntokertoimet ovat seuraavat:

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

1 ilmakehä = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 baari (bar) = 10^5 Pa

Lämpötilan SI-yksikkö on kelvin (K). Celsius-asteet muunnetaan kelvineiksi seuraavan kaavan avulla:

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

jossa T on kelvineinä ilmaistu termodynaaminen lämpötila ja t on lämpötila Celsius-asteina.

▼**M1**

Taulukko 1

Mittausmenetelmä	Aineet		Arvioitu toistettavuus	Arvioitu uusittavuus	Suositeltu alue
	Kiinteät	Nestemäiset			
Dynaaminen menetelmä	Alhainen sulamispiste	Kyllä	Enintään 25 % 1–5 %	Enintään 25 % 1–5 %	10^3 Pa – 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa – 10^5 Pa
Staattinen menetelmä	Kyllä	Kyllä	5–10 %	5–10 %	10 Pa – 10^5 Pa 10^{-2} Pa – 10^5 Pa [1]
Isoteniskooppimenetelmä	Kyllä	Kyllä	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa – 10^5 Pa
Effuusiomenetelmä: höyrynpainevaaka	Kyllä	Kyllä	5–20 %	Enintään 50 %	10^{-3} – 1 Pa
Effuusiomenetelmä: Knudsen-kenno	Kyllä	Kyllä	10–30 %	—	10^{-10} – 1 P
Effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria	Kyllä	Kyllä	5–30 %	Enintään 50 %	10^{-10} – 1 Pa
Kaasunkyllästysmenetelmä	Kyllä	Kyllä	10–30 %	Enintään 50 %	10^{-10} – 10^3 Pa
Pyörivä roottori-menetelmä	Kyllä	Kyllä	10–20 %	—	10^{-4} –0,5 Pa

[1] Käytettäessä kapasitanssimanometriä.

1.3 TESTIN PERIAATE

Höyrynpaine määritetään yleensä eri lämpötiloissa. Rajoitetulla lämpötila-alueella puhtaan aineen höyrynpaineen logaritmi on Clausiuksen ja Clapeyronin yksinkertaistetun yhtälön mukaan suoraan verrannollinen lämpötilan käänteisarvoon:

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

jossa

p = höyrynpaine (Pa)

ΔHv = höyrystymislämpö (J mol^{-1})

R = yleinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = lämpötila (K).

▼**M1**

1.4 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei tarvitse käyttää. Niitä käytetään lähinnä silloin, kun menetelmän toimivuutta tarkistetaan ajoittain tai kun eri menetelmillä saatuja tuloksia verrataan toisiinsa.

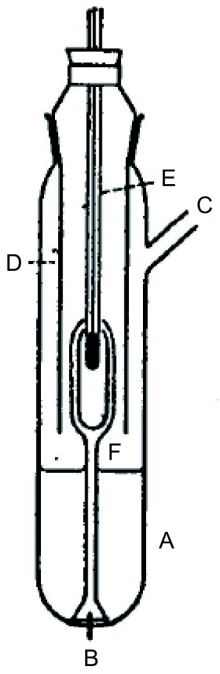
1.5 MENETELMIEN KUVAUS

1.5.1 **Dynaaminen menetelmä (Cottrellin menetelmä)**

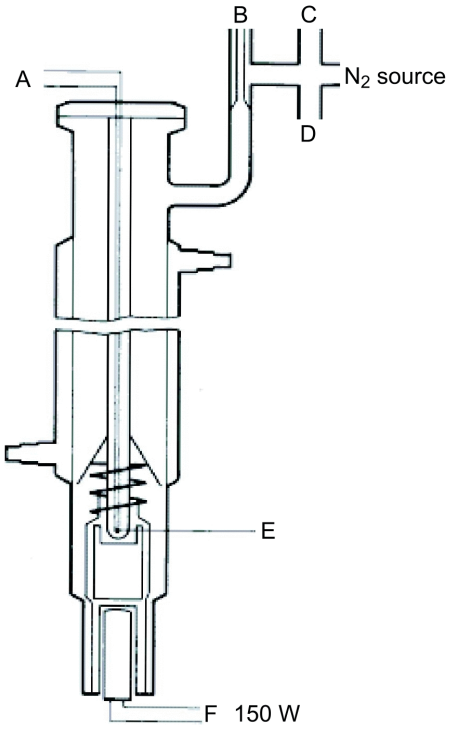
1.5.1.1 *Periaate*

Höyrynpaine määritetään mittaamalla aineen kiehumispiste useissa ennalta määrätyissä paineissa suunnilleen alueella 10^3–10^5 Pa. Menetelmää suositellaan myös kiehumispisteen määritykseen, jossa sitä voidaan käyttää lämpötilaan 600 K saakka. Nesteiden kiehumispisteet ovat noin 0,1 °C suurempia 3–4 cm:n syvyydellä kuin pinnassa, mikä johtuu nestepatsaan hydrostaattisesta paineesta. Cottrellin menetelmässä (4) lämpömittari viedään nestepinnan yläpuolella olevaan höyryyn ja kiehuvaa nestettä pumpataan jatkuvasti lämpömittarin nupin yli. Nuppia peittää ohut nestekerros, joka on tasapainossa höyryn kanssa ilmakehän paineessa. Lämpömittari osoittaa siis todellisen kiehumispisteen ilman ylikuumennuksesta tai hydrostaattisesta paineesta johtuvia virheitä. Kuva 1 esittää Cottrellin alun perin käyttämää pumppua. Kiehuva neste on putkessa A. Putken pohjaan kiinnitetty platinalanka B tasoittaa kiehumista. Sivuputki C johtaa lauhduttimeen, ja vaippa D estää kylmää lauhdetta pääsemästä lämpömittarille E. Kun putkessa A oleva neste kiehuu, suppiloon jääneet kuplat ja neste huuhtovat pumpun F molempien haarojen kautta lämpömittarin nuppia.

Kuva 1



Kuva 2



▼**M1**

Cottrellin pumppu (4)

A: Termopari

B: Tyhjiön puskuritilavuus

C: Painemittari

D: Tyhjiö

E: Mittauspiste

F: Lämmitysvastus, noin 150 W

1.5.1.2 *Laite*

Kuva 2 esittää hyvin tarkkaa, Cottrellin periaatteen mukaista laitetta. Laitteessa on putki, jonka alaosassa on kiehuntaosa, keskiosassa jäähdytin ja yläosassa ulostulo ja laippa. Cottrellin pumppu sijoitetaan kiehuntaosaan, jota kuumennetaan sähköpatruunalla. Lämpötila mitataan vaipallisella termoparilla tai vastuslämpömittarilla, joka viedään laitteen yläosassa olevan laipan kautta sisään. Ulostulo kytketään paineensäätöjärjestelmään, jossa on tyhjiöpumppu, puskuritilavuus, paineensäädin paineensäätöön tarvittavan typen johtamiseksi laitteeseen ja manometri.

1.5.1.3 *Menettely*

Näyte pannaan putken kiehuntaosaan. Jos näyte ei ole jauheena, mahdolliset ongelmat voidaan yrittää ratkaista kuumentamalla jäähdytysvaippaa. Laite suljetaan laipan kohdalta, ja näytteelle tehdään kaasunpoisto. Menetelmä ei sovellu vaahtoavien aineiden mittaukseen.

Tämän jälkeen asetetaan alin haluttu paine ja aloitetaan kuumennus. Lämpöanturi kytketään samalla rekisteröintilaitteeseen.

Järjestelmässä vallitsee tasapaino, kun vakiopaineessa mitattu kiehumislämpötila pysyy vakiona. Kiehumisen aikana on erityisesti vältettävä näytteen ”poukkoilua”. Lisäksi jäähdyttimellä on tapahduttava täydellinen tiivistyminen. Jos höyrynpaineen määritys tehdään kiinteälle aineelle, jonka sulamispiste on alhainen, on varottava lauhduttimen tukkeutumista.

Tasapainopisteen kirjaamisen jälkeen asetetaan uusi, suurempi paine. Mittauksia jatketaan 10^5 Pa:n paineeseen asti (yhteensä 5–10 mittausta). Tulokset tarkistetaan toistamalla mittaukset laskevassa painejärjestyksessä.

1.5.2 **Staattinen menetelmä**

1.5.2.1 *Periaate*

Staattisessa menetelmässä (5) mitataan tiettyä lämpötilaa vastaava höyrynpaine termodynaamisen tasapainon vallitessa. Menetelmä soveltuu kiinteiden ja nestemäisten yksi- tai monikomponenttiaineiden tutkimiseen alueella 10–10^5 Pa ja huolellisuutta noudattaen myös alueella 1–10 Pa.

▼**M1**

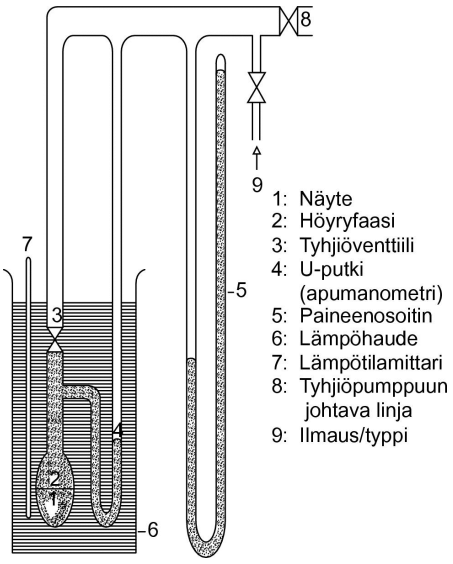
1.5.2.2 *Laite*

Laitteessa on vakiolämpöinen haude (tarkkuus ± 0,2 K), näyteastia, joka on liitetty tyhjiölinjaan, sekä manometri ja paineensäätöjärjestelmä. Näytekammio (kuva 3 a) on liitetty venttiilin välityksellä tyhjiölinjaan ja differentiaalimanometriin (sopivaa painemittarinestettä sisältävään U-putkeen), joka toimii nollaosoittimena. Differentiaalimanometrissa voidaan painealueen ja näytteen kemiallisen käyttäytymisen perusteella käyttää elohopeaa, silikoneja tai ftalaatteja. Elohopean käyttöä on kuitenkin vältettävä ympäristösyistä, jos se on mahdollista. Näyte ei saa mainittavassa määrin liueta U-putken nesteeseen tai reagoida sen kanssa. U-putken sijasta voidaan käyttää painemittaria (kuva 3 b). Manometrissa voidaan käyttää elohopeaa normaalista ilmanpaineesta 10^2 Pa:iin asti sekä silikoninesteitä ja ftalaatteja painealueella 10–10^2 Pa. Käytössä on myös muuntyyppisiä painemittareita alle 10^2 Pa:n mittauksia varten, ja kuumakalvomanometreja voidaan käyttää jopa alle 10^{-1} Pa:n paineessa. Lämpötila mitataan näyteastian ulkopuolelta tai astian sisältä.

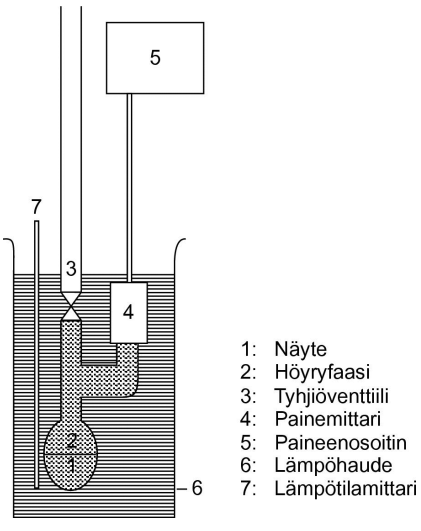
1.5.2.3 *Menettely*

Kuvan 3 a laitetta käytettäessä U-putki täytetään valitulla nesteellä, jolle on tehtävä kaasunpoisto korkeassa lämpötilassa ennen mittauksia. Näytettä pannaan laitteeseen ja sille tehdään kaasunpoisto alennetussa lämpötilassa. Jos näyte on monikomponenttinen, lämpötilan on oltava niin alhainen, ettei aineen koostumus muutu. Tasapaino voidaan saavuttaa nopeammin sekoittamalla näytettä. Näyte voidaan jäähdyttää nestemäisellä typellä tai hiilihappojäällä, mutta silloin on varottava ilmankosteuden tai pumppunesteen lauhtumista. Näyteastian venttiili avataan ja ilma poistetaan ylläpitämällä imua usean minuutin ajan. Ilmanpoisto toistetaan tarvittaessa useita kertoja.

Kuva 3 a



Kuva 3 b



▼**M1**

Kun näytettä kuumennetaan venttiilin ollessa suljettu, höyrynpaine kasvaa, mikä vaikuttaa U-putken nestepatsaan tasapainoon. Tämä kompensoidaan päästämällä typpeä tai ilmaa laitteeseen, kunnes paine-eron osoitin palaa nollaan. Tähän vaadittava paine voidaan lukea manometristä tai tarkemmasta mittauslaitteesta. Paine vastaa näytteen höyrynpainetta kyseisessä mittauslämpötilassa. Käytettäessä kuvan 3 b laitetta höyrynpaineen lukema saadaan suoraan.

Höyrynpaine määritetään sopivin lämpötilavälein (yhteensä 5–10 mittausta) haluttuun maksimilämpötilaan asti.

Alhaisen lämpötilan mittaukset on toistettava tarkistuksen vuoksi. Jos toistomittauksista saadut tulokset eivät ole yhteneviä lämpötilan noston aikana saatujen tulosten kanssa, syy voi olla jokin seuraavista:

i) Näyte sisältää vielä ilmaa (esimerkiksi aineet, joiden viskositeetti on suuri) tai alhaisessa lämpötilassa kiehuvaa ainetta, joka vapautuu kuumentamisen aikana.

ii) Näytteessä tapahtuu kemiallinen reaktio (esimerkiksi hajoaminen tai polymerisoituminen) mitattavalla lämpötila-alueella.

1.5.3 **Isoteniskooppimenetelmä**

1.5.3.1 *Periaate*

Isoteniskooppimenetelmä (6) rakentuu staattisen menetelmän periaatteelle. Menetelmässä näyte pannaan isoteniskoopin laajennukseen, jota pidetään vakiolämpötilassa. Laajennus on liitetty manometriin ja tyhjiöpumppuun. Epäpuhtaudet, jotka ovat haihtuvampia kuin näyte, poistetaan tekemällä kaasunpoisto alennetussa paineessa. Näytteen höyrynpaine valituissa lämpötiloissa saatetaan tasapainoon inertin kaasun tunnetun paineen kanssa. Isoteniskooppi kehitettiin mittaamaan tiettyjen nestemäisten hiilivetyjen höyrynpainetta, mutta se soveltuu myös kiinteiden aineiden tutkimiseen. Menetelmä ei yleensä sovellu monikomponenttijärjestelmien tutkimiseen. Haihtumattomia epäpuhtauksia sisältävistä näytteistä saaduissa tuloksissa on vain pieniä virheitä. Suositeltava mittausalue on 10^2–10^5 Pa.

1.5.3.2 *Laite*

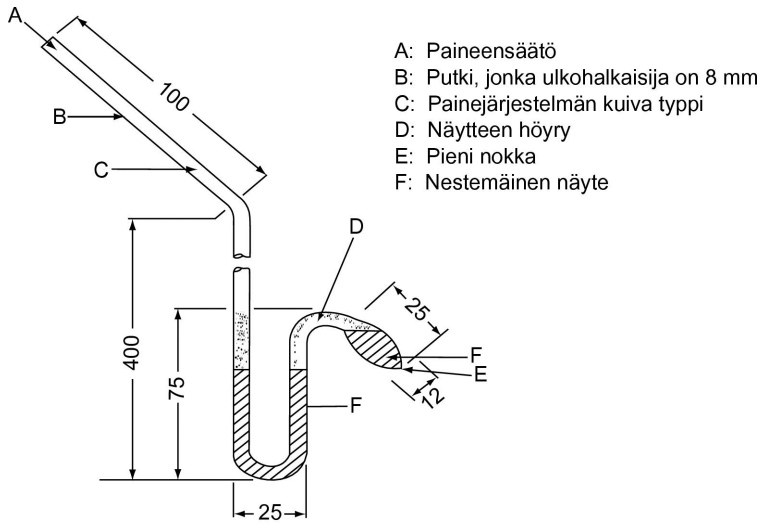
Kuvassa 4 on esimerkki mittauslaitteesta. Täydellinen kuvaus esitetään testimenetelmässä ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3 *Menettely*

Nestemäiset näytteet toimivat samalla differentiaalimanometrin nesteenä. Isoteniskooppiin lisätään nestettä niin paljon, että sen laajennus ja manometrin lyhyempi jalka täyttyvät. Isoteniskooppi liitetään tyhjiöjärjestelmään ja siitä poistetaan ilma, minkä jälkeen se täytetään typellä. Tämä toistetaan kaksi kertaa hapenjäännösten poistamiseksi. Täytetty isoteniskooppi asetetaan vaaka-asentoon siten, että näyte leviää ohueksi kerrokseksi laajennuksessa ja manometrissa. Järjestelmän paine lasketaan arvoon 133 Pa ja näytettä kuumennetaan varovasti, kunnes se alkaa kiehua (näytteeseen liuenneiden kaasujen poisto). Isoteniskoopin asentoa muutetaan niin, että näyte palaa laajennukseen ja täyttää manometrin lyhyemmän jalan. Paine pidetään 133 Pa:ssa. Laajennuksen nokkaa kuumennetaan pienen liekin avulla, kunnes näytteestä vapautuu niin paljon höyryä, että näytettä työntyy laajennuksen yläosasta ja manometrin varresta isoteniskoopin manometriosaan, jolloin muodostuu höyrytäytteinen tila, jossa ei ole typpeä. Tämän jälkeen isoteniskooppi asetetaan hauteeseen, jonka lämpötila on vakio, ja typen painetta säädetään, kunnes se on sama kuin näytteen paine. Tässä tilanteessa typen ja näytteen höyrynpaine on sama.

Kuva 4



(Mitat millimetreinä)

Kiinteiden aineiden tutkimiseen käytetään silikoninesteiden tai ftalaattien kaltaisia manometrinesteitä. Manometrinesteen valinta riippuu kulloisestakin paine- ja lämpötila-alueesta. Manometrineste, jolle on tehty kaasunpoisto, lisätään isoteniskoopin pidemmän varren pullistumaan. Näyte pannaan laajennukseen, ja sille tehdään kaasunpoisto korkeassa lämpötilassa, minkä jälkeen isoteniskooppia kallistetaan, kunnes manometrineste virtaa U-putkeen.

▼M1

1.5.4 **Effuusiomenetelmä: höyrynpainevaaka** (7)

1.5.4.1 *Periaate*

Tutkittavasta aineesta otetaan näyte, jota kuumennetaan pienessä uunissa kelloastiassa, josta on poistettu ilma. Uuni on peitetty kannella, jossa on pieniä aukkoja, joiden halkaisijat tunnetaan. Höyry, joka vapautuu näytteestä yhden tällaisen aukon kautta, johdetaan samassa kelloastiassa olevan erittäin herkän vaa'an vaakakuppiin. Joissakin koejärjestelyissä vaakakupin ympärillä on jäähdytyslaatikko, joka johtaa lämmön ulkopuolelle. Vaakakuppi jäähdytetään säteilyn avulla, jotta vapautuva höyry tiivistyisi kupin pinnalle. Höyryvirran momentti toimii vaakaan kohdistuvana voimana. Höyrynpaine voidaan määrittää kahdella tavalla: suoraan vaakakuppiin kohdistuvasta voimasta tai haihtumisnopeudesta Hertzin ja Knudsenin yhtälön (2) avulla:

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

jossa:

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

M = moolimassa (g mol^{-1})

T = lämpötila (K)

R = yleinen kaasuvakio (J mol^{-1} K^{-1})

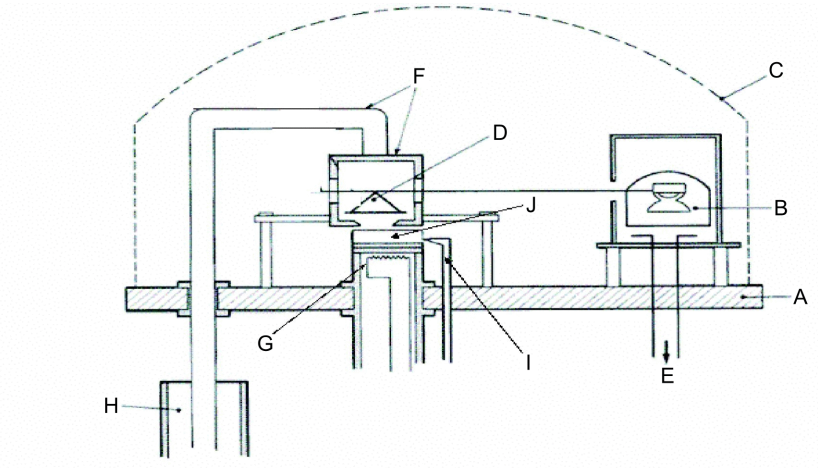
p = höyrynpaine (Pa)

Suositeltava mittausalue on 10^{-3}–1 Pa.

1.5.4.2 *Laite*

Kuva 5 havainnollistaa laitteen yleistä periaatetta.

Kuva 5



A: Aluslevy

B: Kiertokäämimittari

C: Kelloastia

D: Vaaka ja vaakakuppi

E: Tyhjiömittari

F: Jäähdytyslaatikko ja kylmätanko

G: Haihdutusuuni

H: Dewar-astia, jossa on nestemäistä typpeä

I: Näytteen lämpötilan mittaus

J: Näyte

▼**M1**

1.5.5 **Effuusiomenetelmä: Knudsen-kenno**

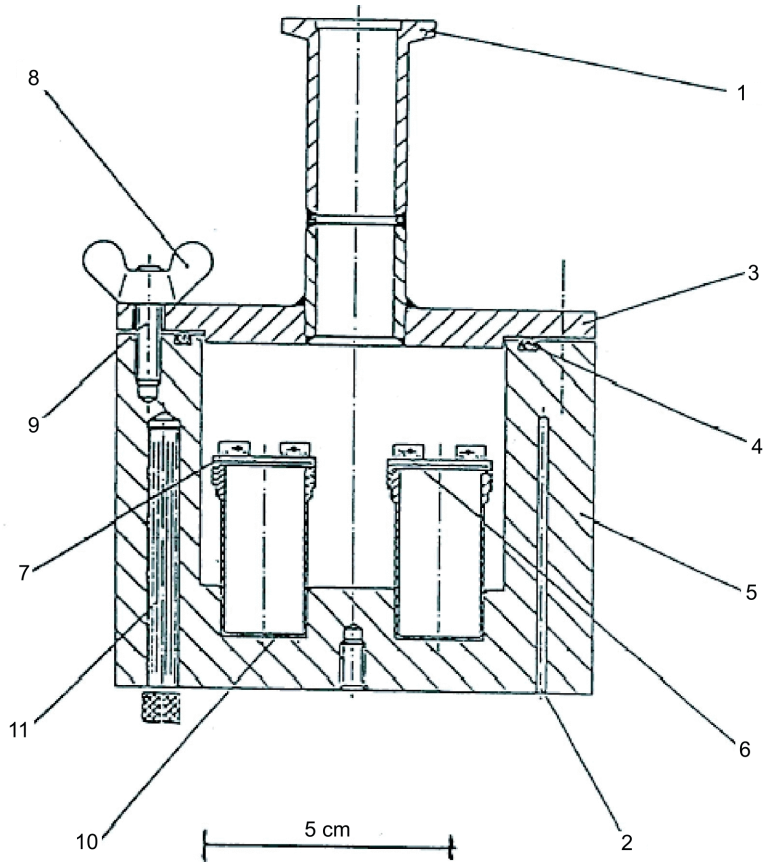
1.5.5.1 *Periaate*

Menetelmä perustuu Knudsen-kennosta (8) aikayksikköä kohti virtaavan, höyrymäisen näytteen massan mittaamiseen. Virtaus tapahtuu mikroaukon läpi ultratyhjiössä. Ulos virtaavan höyryn massa saadaan joko määrittämällä kennon painohäviö tai tiivistämällä höyry alhaisessa lämpötilassa, minkä jälkeen höyrystyneen aineen määrä voidaan määrittää kromatografian avulla. Höyrynpaine lasketaan Hertzin ja Knudsenin yhtälön avulla (ks. kohta 1.5.4.1) käyttämällä korjauskertoimia, jotka riippuvat laitteen parametreista (9). Suositeltava mittausalue on 10^{-10}–1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2 *Laite*

Kuva 6 havainnollistaa laitteen yleistä periaatetta.

Kuva 6



1:	Tyhjiöliitäntä	7:	Kierrekansi
2:	Suojatasku platinavastuslämpömittaria tai lämpötilan mittausta ja säätöä varten	8:	Siipimutterit
3:	Tyhjiösäiliön kansi	9:	Pultit
4:	O-rengas	10:	Effuusiokennot (ruostumatonta terästä)
5:	Tyhjiösäiliö (alumiinia)	11:	Lämpöpatruuna
6:	Effuusiokennojen asetus- ja poistolaite		

▼**M1**

1.5.6 **Effuusiomenetelmä: isoterminen termogravimetria**

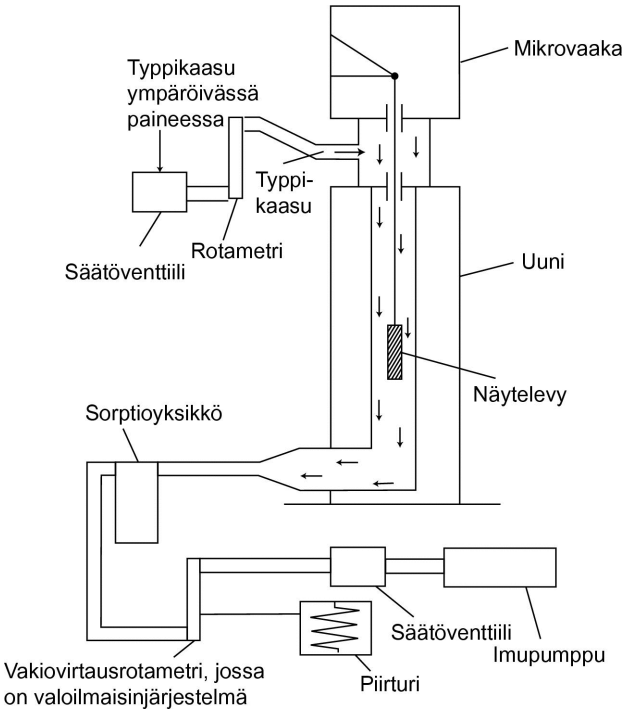
1.5.6.1 *Periaate*

Menetelmässä määritetään näytteen kiihdytetyt haihtumisnopeudet korkeissa lämpötiloissa ja ympäröivässä paineessa termogravimetrian avulla (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Haihtumisnopeudet v_T saadaan käsittelemällä valittua ainetta hitaasti virtaavalla inertillä kaasulla ja rekisteröimällä painohäviö tietyissä isotermisissä lämpötiloissa T (kelvineinä) tiettyjen ajanjaksojen kuluessa. Höyrynpaineet p_T lasketaan v_T-arvoista höyrynpaineen logaritmin ja haihtumisnopeuden logaritmin lineaarisen suhteen perusteella. Tarvittaessa voidaan tehdä ekstrapolointi lämpötiloihin 20 ja 25 °C tekemällä regressioanalyysi logaritmista p_T lämpötilan käänteisarvon 1/T suhteen. Menetelmällä voidaan tutkia aineita, joiden höyrynpaine voi olla niinkin alhainen kuin 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar). Tutkittavien aineiden puhtauden on oltava niin lähellä 100:aa prosenttia kuin mahdollista, jotta mitattuja painohäviöitä ei tulkittaisi väärin.

1.5.6.2 *Laite*

Kuva 7 havainnollistaa koejärjestelyn yleistä periaatetta.

Kuva 7



Lämpötilaohjatussa kammiossa olevaan mikrovaakaan ripustetun näytelevyn yli virtaa kuiva typpikaasu, joka kantaa näytteen höyrystyneet molekyylit mukanaan. Tultuaan ulos kammiosta kaasuvirta puhdistuu sorptioyksikössä.

1.5.6.3 *Menettely*

Näyte levitetään karhennetun lasilevyn pintaan tasaiseksi kerrokseksi. Jos näyte on kiinteä, se liuotetaan sopivalla liuottimella ja liuosta levitetään tasaisesti näytelevylle, joka kuivataan inertissä ympäristössä. Näin käsitelty levy ripustetaan mittausta varten termogravimetriseen analysaattoriin, ja sen painohäviötä mitataan jatkuvasti ajan funktiona.

▼M1

Haihtumisnopeus v_T tietyssä lämpötilassa lasketaan näytelevyn painohäviöstä Δm seuraavalla kaavalla:

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

jossa F on levitetyn näytteen pinta-ala (yleensä näytelevyn pinta-ala) ja t on painohäviön Δm vaatima aika.

Höyrynpaine p_T lasketaan haihtumisnopeuden v_T funktiona seuraavan kaavan mukaan:

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

jossa C ja D ovat koejärjestelykohtaisia vakioita, jotka riippuvat mittauskammion halkaisijasta ja kaasun virtausnopeudesta. Vakiot on määritettävä kerran mittaamalla sarja yhdisteitä, joiden höyrynpaineet tiedetään, ja tekemällä regressio, jossa log v_T riippuu log p_T:stä (11)(21)(22).

Höyrynpaineen p_T ja kelvineinä ilmaistun lämpötilan T välinen suhde on seuraava:

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

jossa A ja B ovat vakioita, jotka on saatu muuttujien log p_T ja 1/T välisestä regressiosta. Yhtälön avulla voidaan laskea mitä tahansa lämpötilaa vastaava höyrynpaine käyttämällä ekstrapolointia.

1.5.7 **Kaasunkyllästysmenetelmä** (23)

1.5.7.1 *Periaate*

Inerttiä kaasua johdetaan huoneenlämpötilassa tietyllä virtausnopeudella näytteen läpi tai yli siten, että näytteen höyry ehtii kyllästää kaasun. Kaasufaasin kyllästyminen on ratkaisevan tärkeää. Kaasun kuljettama aine kerätään talteen, yleensä sorbentin avulla, ja sen määrä mitataan. Höyryn keräämisen ja sitä seuraavan analyysin sijasta kuljetettu ainemäärä voidaan määrittää myös suora-analyysin (esimerkiksi kromatografian) avulla. Höyrynpaine lasketaan olettaen, että ideaalikaasulaki on voimassa ja että kaasuseoksen kokonaispaine on yhtä kuin seoksessa olevien kaasujen paineiden summa. Näytteen osapaine eli höyrynpaine lasketaan kaasujen tunnetun kokonaistilavuuden ja kuljetetun aineen painon avulla.

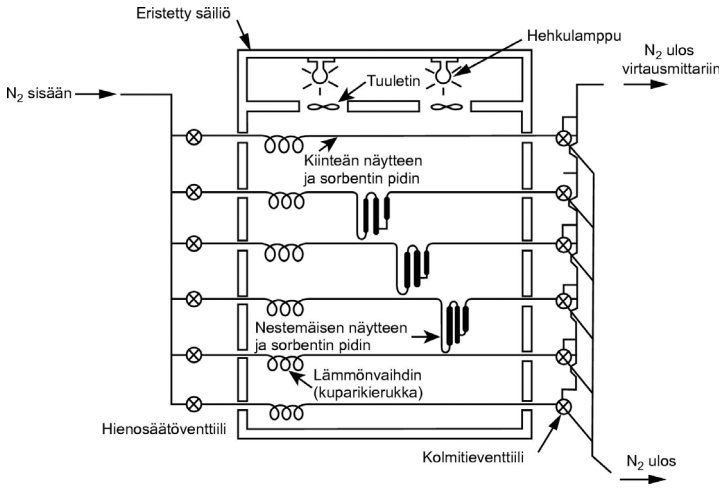
Kaasunkyllästysmenetelmä soveltuu kiinteiden ja nestemäisten aineiden tutkimiseen. Sillä voidaan mitata höyrynpaineita arvoon 10^{-10} Pa saakka (10)(11)(12)(13)(14). Menetelmä on kaikkein luotettavin mitattaessa alle 10^3 Pa:n höyrynpaineita. Tätä suuremmilla arvoilla höyrynpaineet arvioidaan yleensä liian suuriksi, todennäköisesti aerosolien muodostumisen vuoksi. Koska höyrynpaineen mittaukset tehdään huoneenlämpötilassa, ei ole tarpeen ekstrapoloida korkeampia lämpötiloja koskevia tietoja. Tällaista ekstrapolointia vältetään, koska se voi aiheuttaa vakavia virheitä.

1.5.7.2 *Laite*

Menetelmässä käytetään säiliötä, jonka lämpötila on vakio. Kuvan 8 piirros esittää säiliötä, joka sisältää kolme kiinteän näytteen ja kolme nestemäisen näytteen pidintä. Niiden avulla kiinteästä tai nestemäisestä näytteestä voidaan tehdä kolme analyysiä. Lämpötila säädetään ± 0,5 °C:n tarkkuudella tai tarkemmin.

▼**M1**

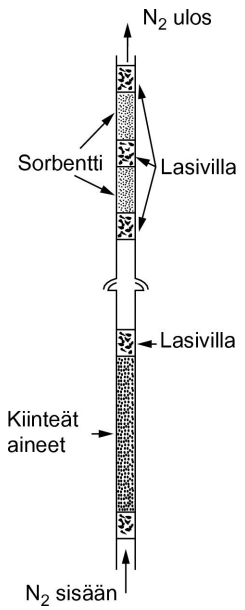
Kuva 8



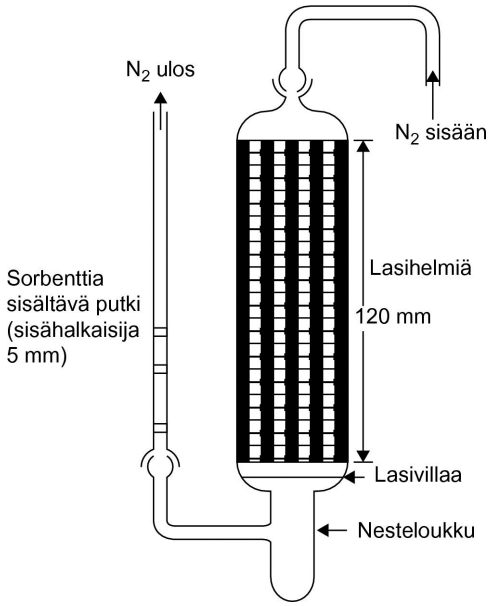
Inerttinä kantokaasuna käytetään yleensä typpeä, mutta joskus voidaan tarvita muutakin kaasua (24). Kantokaasun on oltava kuiva. Kaasuvirta jaetaan kuudeksi osavirraksi, joita säädetään neulaventtiileillä (aukot noin 0,79 mm) ja jotka johdetaan säiliöön kupariputkien kautta (sisähalkaisija 3,8 mm). Lämpötilatasoituksen jälkeen kaasu virtaa näytteen ja sorbenttiloukun läpi ja sen jälkeen ulos säiliöstä.

Kiinteä näyte pannaan lasiputkeen, jonka sisähalkaisija on 5 mm ja jossa on näytteen molemmin puolin lasivillatulpat (ks. kuva 9). Kuva 10 esittää nestemäisen näytteen pidintä ja sorbenttijärjestelmää. Nesteiden höyrynpaineiden mittauksissa parhaiten toistettavissa oleva menetelmä on valaa nestettä lasihelmien tai inertin sorbentin, kuten piidioksidin päälle ja täyttää näytteenpidin näillä helmillä. Vaihtoehtona on antaa kantokaasun kulkea karkean fritin kautta ja kuplia nestemäistä näytettä sisältävän kolonnin läpi.

Kuva 9



Kuva 10



▼**M1**

Sorbenttijärjestelmässä on etummainen ja takimmainen sorptio-osa. Hyvin alhaisilla höyrypaineilla sorbentti pidättää vain pieniä ainemääriä, jolloin adsorboituminen lasivillaan sekä näytteen ja sorbentin välisen lasiputken seiniin voi olla vakava ongelma.

Toinen tehokas tapa kerätä höyrystynyt materiaali talteen on käyttää loukkuja, jotka jäähdytetään hiilihappojäällä. Ne eivät aiheuta kyllästymiskolonniin kohdistuvaa vastapainetta, ja niihin jääneen ainemäärän kerääminen on helppoa.

1.5.7.3 *Menettely*

Ulos virtaavan kantokaasun virtausnopeus mitataan huoneenlämpötilassa. Virtausnopeus tarkistetaan useita kertoja kokeen aikana, jotta kantokaasun kokonaistilavuudesta saadaan luotettava arvo. Jatkuva mittaus massavirtausmittarin avulla on suositeltavaa. Kaasufaasin kyllästyminen voi vaatia huomattavan pitkän kontaktiajan, minkä vuoksi kaasun virtausnopeuden on oltava suhteellisen pieni (25).

Kokeen lopussa sorbenttijärjestelmän molemmat osat analysoidaan erikseen. Niissä olevat aineet desorboidaan lisäämällä liuotinta. Näin saadut liuokset analysoidaan kvantitatiivisesti, jotta voidaan määrittää kummastakin osasta desorboituneen ainemäärän paino. Analyysimenetelmän (kuten myös sorbentin ja desorboivan liuottimen) valinta riippuu näytteen ominaisuuksista. Desorption tehokkuus määritetään ruiskuttamalla tunnettu määrä näytettä sorbenttiin, desorboimalla se ja analysoimalla näin saatu määrä. On tärkeää, että desorption tehokkuus tarkistetaan käyttämällä pitoisuutta, joka on sama tai lähes sama kuin näytteen pitoisuus koeolosuhteissa.

Kantokaasun kyllästyminen tutkittavalla aineella varmistetaan käyttämällä kolmea eri kaasunvirtausnopeutta. Kaasun oletetaan olevan kyllästynyt, jos laskettu höyrynpaine ei muutu eri virtausnopeuksilla.

Höyrynpaine lasketaan seuraavan kaavan avulla:

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

jossa

p = höyrynpaine (Pa)

W = haihdutetun näytteen massa (g)

V = kyllästetyn kaasun tilavuus (m^3)

R = yleinen kaasuvakio (8,314 J mol^{-1} K^{-1})

T = lämpötila (K)

M = näytteen moolimassa (g mol^{-1}).

Mitatut tilavuudet on korjattava virtausmittarin ja kyllästimen välisten paine- ja lämpötilaerojen suhteen.

▼M1

1.5.8 **Pyörivä roottori**

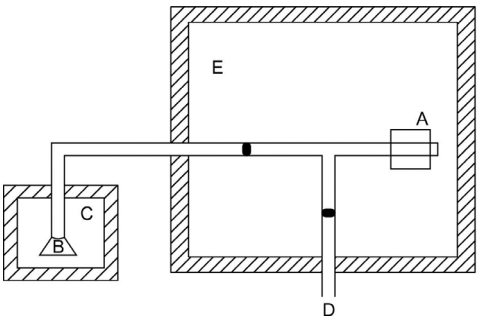
1.5.8.1 *Periaate*

Menetelmässä käytetään pyörivään roottoriin perustuvaa viskositeettimittaria, jossa mittauselementtinä on pieni teräspallo, joka leijuu magneettikentässä ja pyörii pyörivien kenttien vaikutuksesta (26)(27)(28). Pallon pyörimisnopeus saadaan anturikelojen avulla. Kun pallo on saavuttanut tietyn pyörimisnopeuden (yleensä noin 400 kierrosta sekunnissa), magnetointi lopetetaan, jolloin pyöriminen hidastuu kaasukitkan vaikutuksesta. Pyörimisnopeuden pienenemiset mitataan ajan funktiona. Höyrynpaine voidaan päätellä määrittämällä teräspallon nopeuden pieneneminen paineen vaikutuksesta. Suositeltava mittausalue on 10^{-4}–0,5 Pa.

1.5.8.2 *Laite*

Laitteen periaatepiirros on kuvassa 11. Mittapää on suljettu vakiolämpöiseen tilaan (säätötarkkuus 0,1 °C). Näytesäiliö asetetaan erilliseen koteloon (säätötarkkuus jälleen 0,1 °C), ja järjestelmän kaikkia muita osia pidetään lämmitettyinä tiivistymisen estämiseksi. Koko laite on liitetty tyhjiöjärjestelmään.

Kuva 11



A: Pyörivällä roottorilla varustettu mittapää
B: Näytekenno
C: Termostaatti
D: Tyhjiölinja (turbopumppu)
E: Ilmatermostaatti

2. **TIEDOT JA NIIDEN RAPORTOIMINEN**

2.1 TIEDOT

Kaikissa edellä kuvatuissa menetelmissä höyrynpaine määritetään vähintään kahdessa lämpötilassa. Lämpötila-alueella 0–50 °C suositellaan vähintään kolmea mittausta, jotta höyrynpainekäyrän lineaarisuus voitaisiin tarkistaa. Käytettäessä effuusiomenetelmää (Knudsen-kennoa tai isotermistä termogravimetriaa) tai kaasunkyllästysmenetelmää mittausten lämpötila-alueeksi suositetaan alueen 0–50 °C sijasta aluetta 120–150 °C.

2.2 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

▼**M1**

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet) ja mahdolliset esipuhdistukset,

— vähintään kaksi höyrynpaine- ja lämpötila-arvoa – ja mieluiten kolme tai enemmän – alueelta 0–50 °C (tai 120–150 °C),

— lämpötila-arvoista ainakin yhden on oltava 25 °C tai vähemmän, jos se on valitussa menetelmässä teknisesti mahdollista,

— kaikki lähtöarvot,

— käyrä, joka kuvaa log p:n ja lämpötilan käänteisarvon 1/T välistä riippuvuutta,

— arvio höyrynpaineesta 20 tai 25 °C:n lämpötilassa.

Jos aineessa tapahtuu muutoksia (olomuodon muutos, hajoaminen), on lisäksi ilmoitettava:

— muutoksen luonne,

— lämpötila, jossa muutos tapahtui ilmakehän paineessa,

— höyrynpaine 10 °C ja 20 °C muutoslämpötilan alapuolella sekä 10 °C ja 20 °C tämän lämpötilan yläpuolella (ellei kyseessä ole muutos kiinteästä olomuodosta kaasuksi).

Raportissa on esitettävä myös kaikki sellaiset tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

3. **KIRJALLISUUS**

(1) *Euroopan yhteisöjen virallinen lehti* L 383 A, s. 26–47 (1992).

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

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

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

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

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

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

▼M1

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

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

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

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, kahdestoista laitos (2000).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼**M1**

Lisäys

Arviointimenetelmä

JOHDANTO

Höyrynpaineen arvioituja arvoja voidaan käyttää, kun halutaan:

— päättää, mikä kokeellisista menetelmistä on sopiva,

— saada arvio tai raja-arvo tapauksissa, joissa kokeellista menetelmää ei voida käyttää teknisistä syistä.

ARVIOINTIMENETELMÄ

Nesteiden ja kiinteiden aineiden höyrynpaine voidaan arvioida muunnetun Watson-korrelaation (a) avulla. Ainoa tarvittava kokeellinen tieto on normaali kiehumispiste. Menetelmää voidaan käyttää painealueella 10^{5}–10^{-5} Pa.

Tarkemmat tiedot menetelmästä esitetään kirjassa ‘Handbook of Chemical Property Estimation Methods’ (b). Ks. myös OECD Environmental Monograph No.67 (c).

LASKENTA

Höyrynpaine lasketaan seuraavasti:

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

jossa

T = kyseinen lämpötila

T_b = normaali kiehumispiste

P_{vp} = höyrynpaine lämpötilassa T

ΔH_{vb} = höyrystymislämpö

ΔZ_b = puristuvuustekijä (arvioitu arvo 0,97)

m = empiirinen kerroin, joka vaihtelee fysikaalisen olomuodon mukaan kyseisessä lämpötilassa.

Lisäksi

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

jossa K_F on empiirinen vakio, jolla otetaan huomioon aineen polaarisuus. Viitteessä (b) on lueteltu K_F-vakiot useille sekoitetyypeille.

▼**M1**

Usein on saatavana tietoja kiehumispisteestä alennetussa paineessa. Tällöin höyrynpaine voidaan viitteen (b) mukaan laskea seuraavasti:

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

jossa T_1 on kiehumispiste alennetussa paineessa P_1.

RAPORTTI

Arviointimenetelmää käytettäessä raportissa on esitettävä yksityiskohtaiset selvitykset laskennasta.

KIRJALLISUUS

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

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

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

▼B

A.5 PINTAJÄNNITYS

1. MENETELMÄ

Tässä kuvatut menetelmät perustuvat OECD:n testiohjeisiin (1). Perusperiaatteet kuvataan viitteessä (2).

1.1 JOHDANTO

Kuvattuja menetelmiä voidaan soveltaa vesiliuosten pintajännityksen mittaamiseen.

On suositeltavaa selvittää ensin tutkittavan aineen vesiliukoisuus, rakenne, hydrolysoitumisominaisuudet ja misellimuodostuksen kriittinen pitoisuus.

Kuvattuja menetelmiä voidaan käyttää lähes kaikkiin kemiallisiin aineisiin ilman rajoituksia aineiden puhtausasteen suhteen.

Pintajännityksen mittaaminen rengastensiometrillä on rajoitettu vesiliuoksiin, joiden dynaaminen viskositeetti on alle 200 mPa s.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Vapaan pinnan entalpiaa pintayksikköä kohti kutsutaan pintajännitykseksi.

Pintajännityksen yksiköt ovat seuraavat:

N/m (SI-yksikkö) tai

mN/m (SI-alayksikkö)

1 N/m = 10^3 dyniä/cm

1 mN/m = 1 dyni käytöstä poistuneessa cgs-järjestelmässä

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

Viitteissä (1) ja (3) esitetään vertailuaineita, jotka kattavat laajan pintajännitysalueen.

1.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATTEET

Menetelmä perustuu sen pystysuoran vetovoiman mittaamiseen, joka tarvitaan erottamaan sanka tai rengas mitta-astiassa olevan tutkittavan nesteen pinnasta vetämällä kohtisuoraan ylöspäin. Voidaan myös panna neste lautaselle ja mitata voima, joka tarvitaan kappaleen reunan ja nestepinnan välisen kalvon irrottamiseen.

Aineet, joiden vesiliukoisuus on vähintään 1 mg/l, tutkitaan vesiliuoksessa yhtenä ainoana pitoisuutena.

1.5 LAATUKRITEERIT

Menetelmillä on mahdollista saavuttaa tarkkuus, joka on todennäköisesti suurempi kuin mitä ympäristöllisiä arviointeja varten tarvitaan.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

Ainetta liuotetaan tislattuun veteen. Liuoksen pitoisuuden tulee olla 90 % aineen kyllästymispitoisuudesta veteen liuotettaessa. Jos kyllästymispitoisuus ylittää arvon 1 g/l, testiin käytetään pitoisuutta 1 g/l. Aineita, joiden vesiliukoisuus on alle 1 mg/l, ei tarvitse testata.

1.6.1 **Lautasmenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ia NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films)

1.6.2 **Sinkilämenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ja NF T 73-060 {Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films)

1.6.3 **Rengasmenetelmä**

Katso standardeja ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films)

1.6.4 **OECD-maiden yhtenäistetty rengasmenetelmä**

1.6.4.1 *Laite*

Tähän mittaukseen voidaan käyttää kaupallisesti saatavia tensiometrejä. Tensiometrin osat ovat seuraavat:

— liikkuva näytepöytä,

— mittauskappale (rengas),

— voimanmittausjärjestelmä,

— mittausastia.

1.6.4.1.1 Liikkuva näytepöytä

Liikkuva näytepöytä toimii näytettä paikallaanpitävän, termostaatilla varustetun mittausastian tukena. Näytepöytä ja voimanmittausjärjestelmä on kiinnitetty telineeseen.

1.6.4.1.2 Voimanmittausjärjestelmä

Voimanmittausjärjestelmä (katso kuvaa) sijaitsee näytepöydän yläpuolella. Voimanmittauksen virhe ei saa ylittää arvoa ± 10^{-6} N, mikä vastaa virherajaa ± 0,1 mg massamittauksissa. Useimmissa tapauksissa kaupallisten tensiometrien mitta-asteikko on mN/m-yksikköinä, jolloin pintajännityslukema saadaan suoraan mN/m-yksikköinä 0,1 mN/m:n tarkkuudella.

▼B

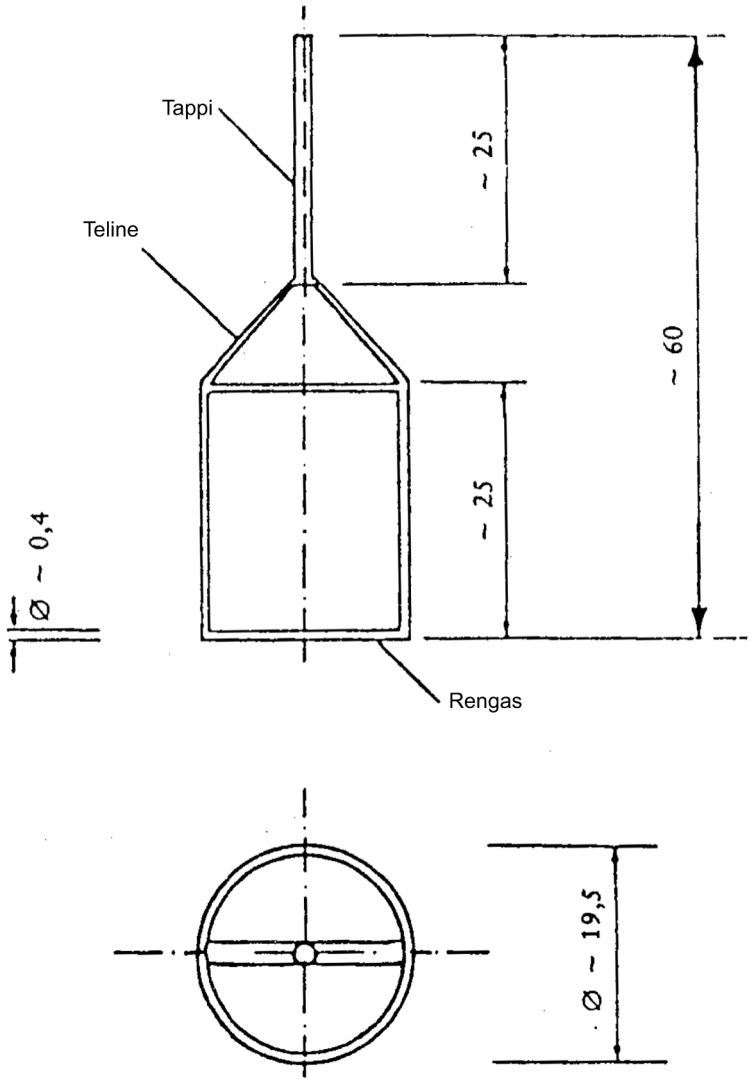
1.6.4.1.3 Mittauskappale (rengas)

Rengas on yleensä tehty noin 0,4 mm:n paksuisesta platina-iridiumlangasta. Keskiympärysmitta on 60 mm. Rengas riippuu vaakasuorassa metallitapista ja lankatelineestä ja on tätä kautta yhteydessä voimanmittausjärjestelmään (katso kuvaa).

Kuva

Mittauskappale

(Kaikki mitat ovat millimetreinä.)



1.6.4.1.4 Mittausastia

Näyteliuosta sisältävän mittausastian on oltava termostaatilla varustettu ja lasista valmistettu. Astian tulee olla siten muotoiltu, että näyteliuoksen ja sen yläpuolella olevan kaasufaasin lämpötila pysyy mittauksen aikana vakiona eikä näytettä pääse haihtumaan. Hyväksyttävän sylinterinmuotoisen mittausastian sisähalkaisijan on oltava vähintään 45 mm.

▼B

1.6.4.2 *Valmistelutoimet*

1.6.4.2.1 Puhdistus

Lasiastiat on puhdistettava huolella. Tarvittaessa ne on pestävä kuumalla kromi-rikkihapolla ja sen jälkeen väkevällä fosforihapolla (83–98 painoprosenttia H_3PO_4:ää), ja sen jälkeen huuhdeltava huolellisesti vesijohtovedellä. Lopuksi astiat on pestävä kaksoistislatulla vedellä, niin että saadaan neutraali reaktio, ja kuivattava, tai huuhdeltava pienellä määrällä näyteliuosta.

Rengas huuhdellaan ensin huolellisesti vedellä kaikkien vesiliukoisten aineiden poistamiseksi. Tämän jälkeen se upotetaan hetkeksi kromi-rikkihappoon, ja sitten se pestään kaksoistislatulla vedellä, niin että saadaan neutraali reaktio. Lopuksi rengasta kuumennetaan vähän aikaa metanoliliekin yllä.

Huomautus:

Epäpuhtaudet, jotka eivät liukene tai tuhoudu kromi-rikkihapon tai fosforihapon vaikutuksesta, poistetaan sopivalla orgaanisella liuottimella.

1.6.4.2.2 Laitteen kalibrointi

Laite kalibroidaan vahvistamalla nollapiste ja säätämällä se siten, että instrumentin lukema sallii luotettavan mN/m-lukeman määrityksen.

Asennus:

Laite tasapainotetaan esimerkiksi tensiometrin jalustalla olevan vesiva'an avulla. Jalustan tasapainotusruuveja säädetään tarpeen mukaan.

Nollapisteen säätö:

Kun rengas on kiinnitetty laitteeseen, tensiometrin lukema on ennen mittauksia säädettävä nollaan ja renkaan yhdensuuntaisuus nesteen pinnan suhteen on tarkistettava. Nesteen pintaa voidaan käyttää peilinä.

Kalibrointi:

Varsinainen kalibrointi voidaan tehdä jollakin seuraavista menetelmistä:

a) Massamenetelmä: Renkaalle asetetaan kappaleita, joiden massa on tunnettu (0,1–1,0 g). Kalibrointikerroin (Φ_a), jolla instrumentin kaikki lukemat on kerrottava, määritetään yhtälön (1) mukaisesti:

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

jossa

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

m = kappaleen massa (g)

g = putoamiskiihtyvyys (981 cm s^{-2} merenpinnan tasolla)

b = renkaan keskiympärysmitta (cm)

σ_a = tensiometrin lukema, kun renkaalle on asetettu kappaleita (mN/m).

▼B

b) Vesimenetelmä: Käytetään vettä, jonka pintajännitys esimerkiksi 23 °C:ssa on 72,3 mN/m. Menetelmä on nopeampi kuin painokalibrointi, mutta siihen liittyy vaara veden pintajännitysarvon vääristymisestä pinta-aktiivisten epäpuhtauksien vaikutuksesta.

Kalibrointikerroin (Φ_b), jolla instrumentin kaikki lukemat on kerrottava, määritetään yhtälön (2) mukaisesti:

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

jossa

σ_o = lähdekirjallisuudesta saatu veden pintajännityksen arvo (mN/m)

o_g = veden pintajännityksen mitattu arvo (mN/m) molemmat samassa lämpötilassa.

1.6.4.3 *Näytteiden valmistelu*

Näytteistä valmistetaan vaadittavan pitoiset vesiliuokset, jotka eivät saa sisältää liukenemattomia aineita.

Liuosten lämpötila on pidettävä vakiona (± 0,5°C). Koska mittausastiassa olevan liuoksen pintajännitys muuttuu ajan kuluessa, on tehtävä useita mittauksia eri ajankohtina ja tuloksista on piirrettävä käyrä, joka ilmaisee pintajännityksen muuttumisen ajan funktiona. Kun muutoksia ei enää tapahdu, järjestelmä on saavuttanut tasapainon.

Pölyt ja muiden aineiden kaasumaiset epäpuhtaudet häiritsevät mittauksia. Siksi mittaukset on suoritettava suojan alla.

1.6.5 **Testiolosuhteet**

Mittaukset tehdään noin 20 °C:ssa. Lämpötila on säädettävä ± 0,5°C:n tarkkuudella.

1.6.6 **Työjärjestys**

Näyteliuokset kaadetaan huolella puhdistettuun mittausastiaan välttäen tarkoin vaahdon muodostumista. Mittausastia asetetaan laitteen pöydälle. Pöytää mittausastioineen nostetaan, kunnes rengas on kokonaan näyteliuoksen pinnan alla. Tämän jälkeen pöytää lasketaan hitaasti ja tasaisesti (noin 0,5 cm minuutissa), niin että saavutetaan maksimivoima renkaan noustessa pintaan irtoamatta siitä ja pintaa yhdistävästä vesikerroksesta. Mittauksen jälkeen rengas lasketaan uudelleen pinnan alle ja mittauksia toistetaan, kunnes pintajännitysarvo ei enää muutu. Jokaisen mittauksen yhteydessä rekisteröidään aika, joka on kulunut näyteliuoksen kaatamisesta mittausastiaan. Mittaustulokseksi valitaan maksimivoima, joka tarvitaan nostamaan rengas nesteen pinnan yläpuolelle.

▼B

2. **TIEDOT**

Yksikkönä mN/m saadut mittaustulokset kerrotaan ensin kalibrointikertoimella Φ_a tai Φ_b (käytetyn kalibrointimenetelmän mukaan). Näin saadaan kuitenkin vain likiarvo, jota on vielä korjattava.

Harkins ja Jordan (4) ovat määritelleet empiirisesti korjauskertoimia rengasmenetelmällä mitatuille arvoille renkaan mittojen, nesteen tiheyden ja pintajännityksen mukaan.

Koska korjauskertoimen määritys Harkinsin ja Jordanin taulukosta jokaista yksittäistä mittausta varten on työlästä, voidaan vesiliuosten pintajännityksen laskemista varten käyttää yksinkertaistettua menetelmää, jossa korjatut pintajännitysarvot luetaan suoraan taulukosta. (Väliarvoja varten käytetään interpolointia.)

Taulukko

Mitatun pintajännityksen korjaaminen

Vain vesiliuoksille, joiden tiheys on noin 1 g/cm^3

R	= 9,55 mm (renkaan säteen keskiarvo)
r	= 0,185 mm (renkaan langan säde)

Kokeellinen arvo (mN/m)	Korjattu arvo (mN/m)	
	Painokalibroint (katso 1.6.4.2.2 i (a))	Vesikalibrointi (katso 1.6.4.2.2 (b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Kokeellinen arvo (mN/m)	Korjattu arvo (mN/m)	
	Painokalibroint (katso 1.6.4.2.2 i (a))	Vesikalibrointi (katso 1.6.4.2.2 (b))
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Taulukko perustuu Harkinsin-Jordanin korjaukseen. Taulukko vastaa vettä ja vesiliuoksia käsittelevän DIN-standardin (DIN 53914) taulukkoa (tiheys = 1 g/cm^3). Se on tarkoitettu mittauksiin, joissa käytetään kaupallista rengasta, jonka mitat ovat R = 9,55 mm (renkaan säteen keskiarvo) ja r = 0,185 mm (renkaan langan säde). Taulukossa on pintajännitysmittauksien korjatut arvot, jotka tehdään paino- tai vesikalibroinnin jälkeen.

Vaihtoehtoisesti pintajännitys, joka on mitattu ilman ensin tehtyä kalibrointia, voidaan laskea seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\sigma = \frac{fxF}{4\pi R}$$

jossa

F = dynamometrin mittaama voima kalvon murtuessa

R = renkaan säde

f = korjauskerroin (1)

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— käytetty menetelmä,

— käytetyn veden tai liuoksen tyyppi,

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet),

— mittaustulokset: pintajännitys (lukema); ilmoitetaan sekä yksilölliset lukemat aritmeettisine keskiarvoineen että korjattu keskiarvo (laitekerroin ja korjaustaulukko huomioon ottaen),

▼B

— liuoksen pitoisuus,

— testilämpötila,

— liuoksen ikä; erityisesti aika liuoksen valmistelusta mittaushetkeen,

— selvitys liuoksen pintajännityksen verrannollisuudesta aikaan siitä hetkestä lähtien, jolloin liuos on siirretty mittausastiaan,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Koska tislatun veden pintajännitys on 20 ^{o}C:ssa 72,75 mN/m, aineet, joiden pintajännitys on alle 60 mN/m kuvatun menetelmän kaltaisissa olosuhteissa, on katsottava pinta-aktiivisiksi aineiksi.

4. **VIITTEET**

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

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

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

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

▼M4

A.6 **VESILIUKOISUUS**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 105 (1995). Tämä testimenetelmä on tarkistettu versio alkuperäisestä testiohjeesta nro 105, joka hyväksyttiin vuonna 1981. Nykyisen version ja vuoden 1981 version välillä ei ole merkittävää eroa, pääosin vain muotoa on muutettu. Tarkistus perustui EU:n testimenetelmään ”Vesiliukoisuus” ([1]).

ALUSTAVAT HUOMIOT

2. Epäpuhtaudet voivat vaikuttaa aineen vesiliukoisuuteen huomattavasti. Tällä testimenetelmällä määritetään sellaisten aineiden vesiliukoisuus, jotka ovat huomattavan puhtaita sekä stabiileja vedessä, eivät siis haihtuvia. Ennen vesiliukoisuuden määrittämistä on suositeltavaa hankkia testiaineesta joitakin alustavia tietoja, kuten rakennekaava, höyrynpaine, dissosiaatiovakio ja hydrolyysi pH:n funktiona.

3. Tässä testimenetelmässä kuvataan kaksi menetelmää, kolonnieluutiomenetelmä ja pullomenetelmä. Näitä menetelmiä voidaan soveltaa aineisiin, joiden liukoisuus on yli ja alle 10^{-2} grammaa litraa kohti (g/l). Lisäksi kuvataan yksinkertainen alustava testi. Sen avulla voidaan määrittää lopullisessa testissä käytettävä näytemäärä suurin piirtein sekä kyllästymisen saavuttamiseen tarvittava aika.

MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

4. Aineen vesiliukoisuus on sen kyllästyspitoisuus vedessä määrätyssä lämpötilassa.

5. Vesiliukoisuus ilmoitetaan liuenneen aineen massana liuostilavuutta kohti. SI-yksikkö on kg/m^3, mutta myös yksikköä g/l voidaan käyttää.

VERTAILUKEMIKAALIT

6. Testiainetta tutkittaessa ei tarvitse käyttää vertailukemikaaleja.

MENETELMIEN KUVAUS

Testiolosuhteet

7. Testi on mieluiten tehtävä lämpötilassa 20 ± 0,5 °C. Valittua lämpötilaa on pidettävä yllä laitteen kaikissa tärkeissä osissa.

Alustava testi

8. Noin 0,1 g näytettä (kiinteät aineet on ensin jauhettava) pannaan lasilla suljettuun, 10 ml:n asteikolla varustettuun mittasylinteriin, johon lisätään asteittain suurenevia määriä huoneenlämpöistä vettä. Jokaisen vedenlisäyksen jälkeen seosta ravistetaan 10 minuuttia ja tarkistetaan silmämääräisesti, ettei liuokseen ole jäänyt liukenemattomia hiukkasia. Jos näyte tai sen osa jää

▼M4

liukenematta 10 ml:n vedenlisäyksen jälkeen, koetta on jatkettava 100 ml:n mittasylinterissä. Likimääräinen liukoisuus ilmenee jäljempänä olevasta taulukosta 1 sen vesimäärän alta, jonka lisäyksen jälkeen näyte on täysin liuennut. Jos liukoisuus on huono, testiaineen liukeneminen voi kestää kauan, ja sitä varten on odotettava vähintään 24 tuntia. Jos testiaine ei ole liuennut 24 tunnin kuluttua, on odotettava kauemmin (enintään 96 tuntia), tai liuosta on yritettävä laimentaa, jotta voitaisiin päättää, käytetäänkö kolonnieluutio- vai pullomenetelmää.

Taulukko 1

0,1 liukenee X ml:aan vettä	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Likimääräinen liukoisuus	< 1 000	1 000–200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Kolonnieluutiomenetelmä

Periaate

9. Tämä menetelmä perustuu veden avulla suoritettavaan näytteen eluutioon mikrokolonnista, jossa on inerttiä, runsaalla määrällä näytettä päällystettyä kantaja-ainetta, esimerkiksi lasihelmiä tai hiekkaa (2). Vesiliukoisuus ilmoitetaan eluaatin massapitoisuutena, kun se on saavuttanut tasanteen ajan funktiona.

Laite

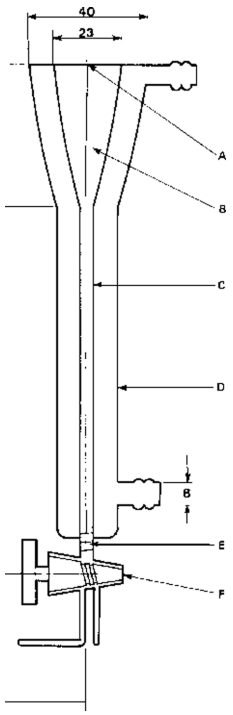
10. Laite koostuu mikrokolonnista (kuva 1), jonka lämpötila pidetään vakiona. Se kytketään joko kiertopumppuun (kuva 2) tai tasausastiaan (kuva 3). Mikrokolonnin sisällä on inerttiä kantaja-ainetta. Sitä pitää paikallaan pieni lasivillatulppa, joka myös suodattaa hiukkasia. Mahdollisia kantaja-aineeksi sopivia materiaaleja ovat lasihelmet, piimaa tai muut inertit materiaalit.

11. Kuvassa 1 oleva mikrokolonni sopii käytettäväksi kiertopumpun kanssa. Sen ylätilaan mahtuu viisi tilavuutta vettä (jotka poistetaan kokeen alussa) ja viisi näytettä (joita analysoidaan kokeen aikana). Vaihtoehtoisesti kokoa voidaan pienentää, jos järjestelmään voidaan lisätä vettä kokeen aikana ensimmäisten viiden epäpuhtauksien poistoon tarkoitetun tilavuuden korvaamiseksi. Kolonni liitetään inertistä materiaalista valmistetulla putkella kiertopumppuun, joka pystyy säätämään virtauksia, joiden nopeus on noin 25 ml/h. Kiertopumppu voi olla esimerkiksi peristaltiikkapumppu tai kalvopumppu. On huolehdittava siitä, ettei putken materiaali aiheuta saastumista ja/tai adsorptiota.

12. Kuvassa 3 on kaaviokuva tasausastian käyttämisestä. Tässä mallissa mikrokolonniin on laitettu yksitiesulkuventtiili. Liitos tasausastiaan toteutetaan lasihioksella ja inertistä materiaalista valmistetulla putkella. Virtausnopeuden tasausastiasta on oltava noin 25 ml tunnissa.

▼**M4**

Kuva 1



Mitat millimetreinä

A. Lasihioksen liitäntä

B. Ylätila

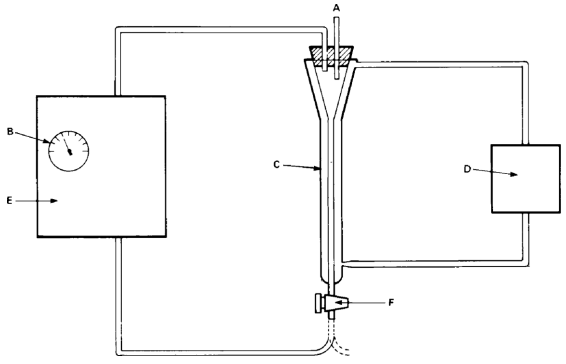
C. Sisätila 5

D. Ulkotila 19

E. Lasivillatulppa

F. Sulkuventtiili

Kuva 2



A. Paineen tasaus

B. Virtausmittari

C. Mikrokolonni

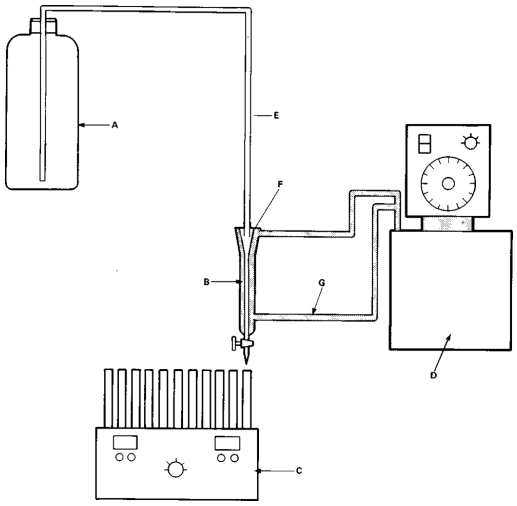
D. Termostaatilla varustettu kiertopumppu

E. Kiertopumppu

F. Kaksitieventtiili näytteenottoa varten

▼**M4**

Kuva 3



A. Tasausastia (esimerkiksi 2,5 litran pullo)

B. Kolonni

C. Fraktionkeräin

D. Termostaatti

E. Teflonputki

F. Lasihios

G. Vesilinja (termostaatin ja kolonnin välillä, sisähalkaisija noin 8 mm)

13. Noin 600 mg kantaja-ainetta siirretään 50 ml:n pyörökolviin. Sopiva määrä testiainetta liuotetaan haihtuvaan liuottimeen, joka on laadultaan analyyttisen puhdasta reagenssia, ja kantaja-aine täytetään sopivalla määrällä tätä liuosta. Liuottimen on haihduttava täysin, esimerkiksi pyörivässä haihduttimessa, sillä muutoin kantaja-aine ei kyllästy vedellä eluutiovaiheen aikana kantaja-aineen pinnan jakaantumisen vuoksi. Täytön jälkeen kantaja-ainetta pidetään noin 5 ml:ssä vettä noin kahden tunnin ajan, minkä jälkeen suspensio kaadetaan mikrokolonniin. Vaihtoehtoisesti voidaan kaataa kuivaa, täytettyä kantaja-ainetta vedellä täytettyyn mikrokolonniin ja jättää se tasapainottumaan kahden tunnin ajaksi.

14. Kantaja-aineen täyttö saattaa aiheuttaa ongelmia, mikä johtaa virheellisiin tuloksiin, esimerkiksi jos testiaine lisätään öljynä. Nämä ongelmat on tutkittava ja yksityiskohdat on raportoitava.

Mittauksen tekeminen kiertopumpun avulla

15. Käynnistetään virtaus kolonnin läpi. Suositeltava virtausnopeus on noin 25 ml/h, mikä vastaa 10:tä tilavuutta tunnissa kuvatun kolonnin kohdalla. Vesiliukoiset epäpuhtaudet poistetaan hylkäämällä vähintään ensimmäiset viisi tilavuutta. Tämän jälkeen kiertopumppu saa käydä, kunnes tasapaino on saavutettu. Se voidaan todeta saavutetuksi, kun viiden peräkkäin otetun näytteen pitoisuudet vaihtelevat enintään ± 30 prosenttia satunnaisella tavalla. Näytteenottovälin on vastattava vähintään eluentin kymmenen tilavuuden läpivirtausta. Sen mukaan, mitä analyysimenetelmää käytetään, voi olla tarpeen määrittää pitoisuus-aikakäyrä sen osoittamiseksi, että tasapaino on saavutettu.

▼M4

Mittauksen tekeminen tasausastian avulla

16. Peräkkäiset eluaattifraktiot kerätään ja analysoidaan valitun menetelmän mukaisesti. Vesiliukoisuuden määritykseen käytetään vähintään viisi peräkkäin otettua fraktiota eluaatin keskialueelta, jossa pitoisuudet pysyvät vakiona (± 30 %).

17. Ensisijainen eluentti on kaksoistislattu vesi. Myös deionisoitua vettä, jonka resistiivisyys on yli 10 megaohmia/cm ja jonka orgaaninen kokonaishiilipitoisuus on alle 0,01 prosenttia, voidaan käyttää.

18. Kummankin menetelmän yhteydessä on tehtävä toinen ajo, jossa virtausnopeus on puolet ensimmäisen ajon virtausnopeudesta. Jos molempien ajojen tulokset ovat yhtenevät, testin katsotaan olevan tyydyttävä. Jos mitattu liukoisuus on suurempi alemman virtausnopeuden yhteydessä, virtausnopeuden puolittamista on jatkettava, kunnes saadaan kaksi peräkkäistä, saman liukoisuuden antavaa ajoa.

19. Kummankin menetelmän yhteydessä fraktioista on etsittävä kolloideja Tyndall-ilmiön avulla. Hiukkasten esiintyminen mitätöi testin, ja testi on toistettava sen jälkeen, kun kolonnin suodatustehoa on ensin parannettu.

20. Jokaisen näytteen pH on mitattava ensisijaisesti erikoistestiliuskoja käyttämällä.

Pullomenetelmä

Periaate

21. Testiaine (kiinteät aineet on jauhettava) liuotetaan veteen lämpötilassa, joka on hieman testilämpötilan yläpuolella. Kun kyllästyminen saavutetaan, seos jäähdytetään, ja sitä pidetään sen jälkeen testilämpötilassa. Vaihtoehtoisesti mittaus voidaan suorittaa suoraan testilämpötilassa edellyttäen, että kyllästymistasapaino varmistetaan soveltuvalla näytteenotolla. Tämän jälkeen määritetään testiaineen massapitoisuus sopivalla analyysimenetelmällä vesiliuoksessa, joka ei saa sisältää liukenemattomia hiukkasia (3).

Laite

22. Pullomenetelmää varten tarvitaan seuraavat osat:

— tavallisia laboratoriolaseja ja -instrumentteja

— laite, jolla liuoksia voidaan ravistaa säädetyissä vakiolämpötiloissa

— sentrifugi (mieluiten termostaatilla varustettu), jos sellainen tarvitaan emulsioiden käsittelyyn

— analyysilaitteet.

Mittauksen tekeminen

23. Alustavan testin avulla saadaan tieto halutun vesimäärän kyllästämiseen tarvittavasta ainemäärästä. Noin viisinkertainen määrä ainetta punnitaan kolmeen eri lasitulpalla varustettuun lasiastiaan (esimerkiksi sentrifugiputkiin tai pulloihin). Kuhunkin astiaan laitetaan analyysimenetelmän ja liukoisuusalueen mukaan valittu vesimäärä. Astiat suljetaan tiiviisti, ja niitä ravistetaan 30 °C:ssa. Tarkoitukseen käytetään ravistus- tai sekoitustapaa, jossa voidaan ylläpitää vakiolämpötilaa, esimerkiksi magneettisekoitusta termostaatilla varustetussa vesihauteessa). Vuorokauden kuluttua yksi astioista tasapainotetaan 24 tunnin aikana testilämpötilassa astiaa ajoittain ravistamalla. Astian

▼M4

sisältö lingotaan testilämpötilassa, ja testiaineen pitoisuus määritetään kirkkaasta vesifaasista sopivan analyyttisen menetelmän mukaisesti. Toista jäljellä olevaa astiaa käsitellään ensimmäisen 30 °C:ssa tapahtuneen tasapainotuksen jälkeen samalla tavoin kaksi vuorokautta ja toista astiaa kolme vuorokautta. Jos vähintään kahdesta viimeksi käsitellystä astiasta mitatut pitoisuudet vaihtelevat enintään 15 prosenttia, testi hyväksytään. Jos astioista 1, 2 ja 3 saadut tulokset osoittavat nousevaa suuntausta, koko testi on toistettava pidempiä tasapainotusaikoja käyttäen.

24. Testi voidaan myös toteuttaa ilman 30 °C:ssa tapahtuvaa esi-inkubaatiota. Kyllästystasapainon saavuttamisnopeutta voidaan arvioida jatkamalla näytteidenottoa, kunnes sekoitusaika ei enää vaikuta mitattuihin pitoisuuksiin.

25. Jokaisen näytteen pH on mitattava ensisijaisesti erikoistestiliuskoja käyttämällä.

Analyyttiset määritykset

26. Näitä määrityksiä varten suositellaan ainekohtaista menetelmää, koska pienet määrät liukoisia epäpuhtauksia voivat aiheuttaa suuria virheitä mitatussa liukoisuudessa. Esimerkkejä tällaisista menetelmistä ovat kaasu- tai nestekromatografia, titraus, fotometriset menetelmät ja kulometriset menetelmät.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

Kolonnieluutiomenetelmä

27. Jokaista ajoa kohti on laskettava vähintään viiden peräkkäisen kyllästysalueelta otetun näytteen keskiarvo ja näytteiden keskihajonta. Kahdesta eri virtauksilla toteutetusta testistä saatujen keskiarvojen ero saa olla enintään 30 prosenttia.

Pullomenetelmä

28. Kaikkien kolmen pullon yksittäisistä tuloksista, joiden välinen ero saa olla enintään 15 prosenttia, lasketaan keskiarvo.

Testiraportti

Kolonnieluutiomenetelmä

29. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

— alustavan testin tulokset

— kemiallinen identiteetti ja epäpuhtaudet (esipuhdistusvaihe, jos tarpeen)

— jokaisen näytteen pitoisuus, virtausnopeus ja pH

— jokaisen ajon vähintään viiden kyllästysalueelta otetun näytteen keskiarvot ja keskihajonnat

— kahden peräkkäisen ajon keskiarvo

— veden lämpötila kyllästysprosessin aikana

— analyysimenetelmä

— käytetyn kantaja-aineen luonne

— kantaja-aineen täyttö

— käytetty liuotin

— todisteet aineen mahdollisesta kemiallisesta epästabiliteetista testin aikana

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

▼**M4**

Pullomenetelmä

30. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

— alustavan testin tulokset

— kemiallinen identiteetti ja epäpuhtaudet (esipuhdistusvaihe, jos tarpeen)

— yksittäiset analyyttiset määritykset sekä keskiarvo, jos jokaista pulloa kohti on määritetty useampia arvoja

— jokaisen näytteen pH

— keskiarvo niistä eri astioista, joiden tulokset olivat yhteneviä

— testilämpötila

— analyyttinen menetelmä

— todisteet aineen mahdollisesta kemiallisesta epästabiliteetista testin aikana

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Komission direktiivi 92/69/ETY, annettu 31 päivänä heinäkuuta 1992, vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen seitsemännentoista kerran, EYVL L 383, 29.12.1992, s. 113.

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

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

▼B

A.8 **JAKAANTUMISKERROIN**

1. **MENETELMÄ**

Tässä kuvattu ravistuspullomenetelmä perustuu OECD:n testiohjeeseen (1).

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää ensin tutkittavan aineen rakennekaava, dissosiaatiovakio, vesiliukoisuus, hydrolysoituminen, n-oktanoliliukoisuus ja pintajännitys.

Mitattaessa ionisoituvia aineita on aina käytettävä aineiden ionisoitumatonta muotoa (vapaata happoa tai vapaata emästä), joka on saatu sellaisen sopivan puskurin avulla, jonka pH on vähintään yhden pH-yksikön pK-arvoa pienempi (vapaa happo) tai suurempi (vapaa emäs).

Testi voidaan tehdä kahdella eri menetelmällä: ravistuspullomenetelmällä tai HPLC-nestekromatografialla. Ensimmäistä menetelmää voidaan soveltaa, kun P_{ow}-arvo (katso jäljempänä olevaa määritelmää) on - 2...4, ja toista menetelmää arvon ollessa 0...6. Alustavan kokeen avulla saadaan arvio näytteen jakaantumiskertoimesta, minkä jälkeen valitaan sopiva menetelmä.

Ravistuspullomenetelmää voidaan soveltaa vain huomattavan puhtaiden, vesi- ja n-oktanoliliukoisten aineiden testaukseen. Menetelmää ei voida soveltaa pinta-aktiivisten aineiden testaukseen (näiden kohdalla on esitettävä laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin vesi- ja n-oktanoliliukoisuuksiin).

HPLC-menetelmää ei voida soveltaa vahvojen happojen ja emästen, metallikompleksien, pinta-aktiivisten aineiden tai eluentin kanssa reagoivien aineiden testaukseen. Näiden aineiden kohdalla on esitettävä laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin vesi- ja n-oktanoliliukoisuuksiin.

HPLC-menetelmä ei ole yhtä herkkä näytteessä oleville epäpuhtauksille kuin ravistuspullomenetelmä. Kuitenkin epäpuhtaudet voivat joissakin tapauksissa vaikeuttaa tulosten tulkintaa, koska kärkien kohdentaminen on tällöin epävarmaa. Jos seoksen testauksessa saadaan määrittämätön kaista, on ilmoitettava log P:n ylä- ja alaraja.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Määritelmän mukaan jakaantumiskerroin (P) on liuotetun aineen tasapainopitoisuuksien (c_i) välinen suhde kaksifaasijärjestelmässä, jossa on kaksi toisiinsa heikosti sekoittuvaa liuotinta:

$$p_{ow} = \frac{C_{n-oktanoli}}{C_{vesi}}$$

Jakaantumiskerroin (P) on siis kahden pitoisuuden välinen suhde, ja se ilmoitetaan normaalisti kymmenkantaisena logaritmina (log P).

▼B

1.3 VERTAILUAINEET

Ravistuspullomenetelmä

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

HPLC-menetelmä

Aineen HPLC-mittaustulosten ja yhdisteen P-arvon välinen vastaavuus saadaan kalibrointikäyrästä, jossa log P esitetään kromatografisten tietojen funktiona. Kalibrointikäyrän kromatografisten tietojen on katettava vähintään 6 vertailupistettä. Käyttäjä valitsee sopivat vertailuaineet. Mahdollisuuksien mukaan on valittava vähintään yksi vertailuaine, jonka P_{ow}-arvo on pienempi kuin näytteen P_{ow}-arvo, ja yksi vertailuaine, jonka P_{ow}-arvo on suurempi. Kun log P -arvo on pienempi kuin 4, kalibrointi voi perustua ravistuspullomenetelmällä saatuihin tuloksiin. Kun log P -arvo on suurempi kuin 4, kalibrointi voi perustua validoituihin, lähdekirjallisuudesta saatuihin arvoihin, jotka ovat yhteneviä laskettujen arvojen kanssa. Tarkkuutta voidaan parantaa käyttämällä vertailuaineita, joiden rakenne muistuttaa näytteen rakennetta.

Lähdekirjallisuudessa on laajat luettelot monen kemikaaliryhmän log P_{ow} -arvoista (2), (3). Jos näytteen kanssa samankaltaisen rakenteen omaavien yhdisteiden tietoja ei ole käytettävissä, voidaan käyttää yleisempää kalibrointia, joka perustuu muihin vertailuaineisiin.

Liitteessä 2 on luettelo suositeltavista vertailuaineista ja niiden P_{ow}-arvoista.

1.4 MENETELMIEN PERIAATTEET

1.4.1 **Ravistuspullomenetelmä**

Jakaantumiskertoimen määritystä varten järjestelmän kaikkien keskinäisessä vuorovaikutuksessa olevien osien on saavutettava tasapaino, minkä jälkeen määritetään järjestelmän kahteen faasiin liuotetun aineen pitoisuudet. Lähdekirjallisuudessa esitetään useita tekniikoita, joiden avulla molemmat faasit voidaan sekoittaa huolella ja joiden avulla niistä voidaan määrittää näytteen tasapainopitoisuudet kummassakin faasissa faasien erotuksen jälkeen.

1.4.2 **HPLC-menetelmä**

HPLC tapahtuu analyyttisessa kolonnissa, joka on täytetty kaupallisesti saatavana olevalla, pitkiä hiilivetyketjuja (esimerkiksi C_8, C_{18}) sisältävällä kiinteällä faasilla, joka on kemiallisesti sidottu piidioksidiin. Kolonniin ruiskutetut kemikaalit liikkuvat eri nopeuksilla sen mukaan, mikä on niiden jakaantumiskerroin liikkuvan faasin ja kiinteän hiilivetyfaasin välillä. Kemikaaliseokset eluoituvat hydrofobisuuden perusteella siten, että vesiliukoiset kemikaalit eluoituvat ensin ja öljyliukoiset viimeisenä suhteessa niiden hiilivety-vesi-jakaantumiskertoimeen. Näin voidaan määrittää vastafaasikolonnin retention ja n-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen välinen suhde. Jakaantumiskerroin voidaan laskea *käyttökertoimen* k perusteella seuraavasti:

▼B

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

jossa t_R = näytteen retentio ja t_0 = liuotinmolekyylin keskimääräinen läpäisyaika (viive).

Kvantitatiivisia analyyttisia menetelmiä ei tarvita. Eluointiaikojen määritys riittää.

1.5 LAATUKRITEERIT

1.5.1 **Toistettavuus**

Ravistuspullomenetelmä

Jakaantumiskertoimen tarkkuus varmistetaan tekemällä kolme määritystä eri testiolosuhteissa, joissa näytteen määrä ja liuotintilavuuksien suhde voivat vaihdella. Saadut jakaantumiskertoimen arvot saavat vaihdella enintään ± 0,3 logaritmiyksikköä kymmenkantaisina logaritmeina ilmaistuna.

HPLC-menetelmä

Mittaustulokset varmistetaan tekemällä kaksi määritystä. Yksittäisten mittausten perusteella saadut log P -arvot saavat vaihdella enintään ± 0,1 logaritmiyksikköä.

1.5.2 **Herkkyys**

Ravistuspullomenetelmä

Menetelmän mittausalue määräytyy analyyttisen menetelmän havaintorajojen mukaan. Yleensä log P_{ow} -arvoja voidaan määrittää alueella - 2...4 (määrätyissä olosuhteissa jopa arvoon log P_{ow} = 5 asti), kun liuenneen aineen pitoisuus kummassakin faasissa on enintään 0,01 moolia litrassa.

HPLC-menetelmä

HPCL-menetelmällä voidaan laskea jakaantumiskerroin P_{ow}-alueella 0–6.

Yleensä yhdisteen jakaantumiskertoimeksi voidaan arvioida ± 1 logaritmista yksikköä ravistuspullomenetelmän arvosta. Tyypillisiä korrelaatioita löytyy lähdekirjallisuudesta (4), (5), (6), (7), (8). Yleensä on mahdollista saada tarkempia tuloksia, kun korrelaatiopisteet on saatu rakenteellisesti samankaltaisten vertailuyhdisteiden tiedoista (9).

▼B

1.5.3 **Spesifisyys**

Ravistuspullomenetelmä

Nernstin jakaantumislakia voidaan laimennettujen liuosten kohdalla soveltaa vain vakiolämpötilassa, vakiopaineessa ja vakio-pH:ssa. Suoraan sovellettuna laki koskee vain puhtaita aineita, jotka jakautuvat kahden puhtaan liuottimen välillä. Jos toisessa tai molemmissa faaseissa on samanaikaisesti useita erilaisia liuoksia, tämä saattaa vaikuttaa tuloksiin.

Liuotettujen molekyylien assosiaatiosta tai dissosiaatiosta seuraa poikkeamia Nernstin jakaantumislaista. Tällaiset poikkeamat voidaan osoittaa sillä, että jakaantumiskerroin vaihtelee liuoksen pitoisuuden mukaan.

Koska tasapainoja on useita, testimenetelmää ei pidä soveltaa ionisoituviin yhdisteisiin ilman korjausta. Tällaisten yhdisteiden kohdalla on harkittava veden korvaamista puskuriliuoksilla, ja puskurin pH:n tulisi poiketa vähintään yhden pH-yksikön verran aineen pKa-arvosta. Lisäksi on otettava huomioon valitun pH:n sovellettavuus kyseiseen ympäristöön.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Jakaantumiskertoimen alustava arviointi**

Alustavaan arviointiin tulisi mieluiten käyttää laskentamenetelmää (katso liitettä 1). Määrätyissä tapauksissa arviointiin voidaan käyttää myös näytteen liukoisuutta puhtaisiin liuottimiin (10).

1.6.2 **Ravistuspullomenetelmä**

1.6.2.1 *Valmistelutoimet*

n-oktanoli: Jakaantumiskertoimen määritykseen käytetään analyyttisen puhdasta reagenssia.

Vesi: Tarkoitukseen käytetään lasi- tai kvartsilaitteessa tislattua tai kaksoistislattua vettä. Ionisoituvien aineiden kohdalla on tarpeen mukaan käytettävä puskuriliuoksia veden sijasta.

Huomautus:

Suoraan ioninvaihtimesta otettua vettä ei pidä käyttää.

1.6.2.1.1 Liuottimien esikyllästys

Ennen jakaantumiskertoimen määritystä molemmat liuotinjärjestelmän faasit kyllästetään ravistamalla testilämpötilassa. Käytännöllinen toteutustapa on käyttää kahta suurta, analyyttisen puhtaalla n-oktanolilla tai vedellä täytettyä varastopulloa, joissa on tarpeellinen määrä toista liuotinta, pitää pulloja vuorokauden ajan mekaanisessa ravistimessa ja antaa tämän jälkeen pullojen levätä, kunnes faasit erottuvat ja kyllästyspiste saavutetaan.

▼B

1.6.2.1.2 Testin valmistelutoimet

Kaksifaasijärjestelmän on täytettävä testausastia lähes kokonaan. Näin voidaan pienentää haihtumisesta aiheutuvaa ainehukkaa. Aineen tilavuussuhde ja määrät määräytyvät seuraavien tekijöiden mukaan:

— jakaantumiskertoimen alustava määritys (katso edellä),

— pienin määrä näytettä, joka tarvitaan analyyttistä menetelmää varten,

— rajoitus, jonka mukaan pitoisuus ei saa ylittää 0,01 moolia litrassa kummassakaan faasissa.

Tehdään kolme testiä. Ensimmäisessä käytetään laskettua n-oktanolin ja veden tilavuussuhdetta, toisessa suhde puolitetaan ja kolmannessa se kerrotaan kahdella (esimerkiksi 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Näyte

Valmistetaan varastoliuos esikyllästämällä n-oktanolia vedellä. Varastoliuoksen pitoisuus määritetään tarkasti juuri ennen liuoksen käyttöä jakaantumiskertoimen määritykseen. Liuosta on pidettävä olosuhteissa, joissa sen stabiliteetti voidaan taata.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Lämpötila on pidettävä vakiona (± 1 °C) alueella 20–25 °C.

1.6.2.3 *Mittauksen suorittaminen*

1.6.2.3.1 Jakaantumistasapainon luominen

Jokaista testiolosuhdetta varten valmistetaan kaksi testausastiaa, joissa on tarkasti mitatut määrät kumpaakin liuotinta ja tarpeellinen määrä varastoliuosta.

Mitataan n-oktanolifaasit tilavuuden mukaan. Testausastiat pannaan sopivaan ravistuslaitteeseen tai niitä ravistetaan käsin. Jos käytössä on sentrifugiputki, suositellaan sen kääntämistä nopeasti poikittaisakselillaan 180 astetta, jolloin mahdollisesti loukkuun jäänyt ilma nousee molempien faasien läpi. Käytäntö on osoittanut, että 50 tällaisella käännöllä voidaan saavuttaa jakaantumistasapaino. Varmuuden vuoksi suositellaan kuitenkin 100:aa kääntöä viidessä minuutissa.

1.6.2.3.2 Faasierotus

Tarvittaessa faasien erotukseen on käytettävä sentrifugointia. Tämä tehdään laboratoriosentrifugissa huoneenlämmössä. Jos sentrifugissa ei ole termostaattia, sentrifugiputket on pidettävä testilämpötilassa vähintään yhden tunnin ajan ennen analyysia.

▼B

1.6.2.4 *Analyysi*

Jakaantumiskertoimen määritystä varten on määritettävä näytteen pitoisuus kummassakin faasissa. Tämä voidaan toteuttaa ottamalla alikvootti kumpaakin faasia kummastakin putkesta testiolosuhdetta kohti ja analysoimalla otokset valitulla menetelmällä. Aineen kokonaismäärä kummassakin faasissa lasketaan ja arvoja verrataan alun perin lisättyyn määrään.

Näytteenotto vesifaasista on tehtävä menetelmällä, joka minimoi n-oktanolin mukaanpääsyn riskin. Poistettavalla neulalla varustettu lasiruisku on hyvä vaihtoehto. Näytteenottoa varten ruisku täytetään osittain ilmalla, joka työnnetään varovasti ulos vietäessä ruisku n-oktanolikerroksen läpi. Tämän jälkeen ruiskuun vedetään sopiva määrä vesifaasia. Ruisku poistetaan nopeasti liuoksesta ja neula irrotetaan. Ruiskun sisältöä voidaan tämän jälkeen käyttää vesinäytteenä. Aineen pitoisuus kummassakin erotetussa faasissa määritetään mieluiten ainekohtaisella menetelmällä. Sopivia analyyttisiä menetelmiä ovat esimerkiksi

— fotometriset menetelmät,

— kaasukromatografia,

— nestekromatografia (HPLC).

1.6.3 **HPLC-menetelmä**

1.6.3.1 *Valmistelutoimet*

Laite

Menetelmää varten tarvitaan sykkimättömällä pumpulla ja sopivalla ilmaisulaitteella varustettu nestekromatografi, jossa tulisi olla suihkusilmukoilla varustettu suihkuventtiili. Kiinteässä faasissa olevat polaariset ryhmät saattavat vakavasti häiritä HPCL-kolonnin tehokkuutta, minkä vuoksi polaaristen ryhmien määrä kiinteissä faaseissa (1) on minimoitava. Menetelmässä voidaan käyttää kaupallisesti saatavana olevia mikrohiukkas-vastafaasipakkauksia tai valmiiksi pakattuja kolonneja. Ruiskutusjärjestelmän ja analyyttisen kolonnin välissä voidaan pitää suojakolonnia.

Liikkuva faasi

Eluutioliuotin valmistetaan HPLC-laatuisesta metanolista ja HPLC-laatuisesta vedestä. Liuottimelle tehdään kaasunpoisto ennen käyttöä. On käytettävä isokraattista eluutiota. Metanoli-vesiseoksessa on oltava vähintään 25 % vettä. Yleensä seos, jossa on metanolia ja vettä tilavuussuhteessa 3:1, on tyydyttävä log P 6 -yhdisteiden eluoimiseksi yhdessä tunnissa, kun virtausnopeus on 1 ml/min. Jos yhdisteiden log P -arvo on suuri, saattaa olla tarpeen lyhentää eluointiaikaa (myös vertailuaineiden kohdalla) vähentämällä liikkuvan faasin polaarisuutta tai kolonnin pituutta.

Aineilla, jotka liukenevat n-oktanoliin hyvin heikosti, on yleensä poikkeavan alhainen HPLC-menetelmällä saatu log P_{ow} -arvo. Joskus tällaisten yhdisteiden tuottamat kärjet eivät ylitä liuottimen tasoa. Syynä on todennäköisesti se, että jakaantumisprosessi on liian hidas, eikä tasapaino ehdi asettua HPLC-erotteluun normaalisti käytetyssä ajassa. Tulosten luotettavuutta voidaan yleensä parantaa pienentämällä virtausnopeutta tai metanolin ja veden välistä suhdetta.

▼B

Näytteiden ja vertailuaineiden liukoisuuden liikkuvaan faasiin on oltava tarpeeksi suuri niiden havaitsemista varten. Vain poikkeustapauksissa voidaan käyttää lisäaineita metanoli-vesiseoksen yhteydessä, koska lisäaineet muuttavat kolonnin ominaisuuksia. Jos käytetään lisäaineita kromatogrammin tuottamiseen, on ehdottomasti käytettävä erillistä, samantyyppistä kolonnia. Jos metanoli-vesiseos ei sovellu tarkoitukseen, voidaan käyttää muita orgaanisen liuottimen ja veden seoksia, esimerkiksi etanoli-vesi- tai asetonitriili-vesiseosta.

Ionisoivien yhdisteiden osalta eluentin pH on kriittinen. Sen on oltava kolonnin pH-alueella, yleensä 2-8. Puskurointia suositellaan. On varottava suolan saostumista ja kolonnin huononemista, mitä voi tapahtua eräiden orgaanisten faasi-puskuriseosten yhteydessä. HPLC-mittauksia, joissa piidioksidipohjaisen kiinteän faasin pH on yli 8, ei suositella, koska emäksinen liikkuva faasi voi aiheuttaa kolonnin suorituskyvyn nopeaa huononemista.

Liuokset

Vertailuaineiden on oltava mahdollisimman puhtaita. Testi- ja kalibrointitarkoituksiin käytettävät yhdisteet liuotetaan liikkuvaan faasiin mahdollisuuksien mukaan.

Testiolosuhteet

Mittausten aikana lämpötila saa vaihdella enintään ± 2 K.

1.6.3.2 **Mittaukset**

Viiveen t_o laskeminen

Viive t_o voidaan määrittää käyttämällä homologista sarjaa (esimerkiksi n-alkyylimetyyliketoneja) tai kolonnin läpi pidättymättä kulkevia orgaanisia yhdisteitä (esimerkiksi tiokarbamidia tai formamidia). Ensimmäistä vaihtoehtoa käytettäessä kolonniin ruiskutetaan vähintään seitsenosainen homologinen sarja ja vastaavat retentiot määritetään. Suoraan saadut retentiot $t_{r(nc+1)}$ piirretään ajan $t_{r(nc)}$ funktiona, ja regressioyhtälön

$t_{r(nc+1)} = a + b\backslash;\ t_{r(nc)}$

poikkeama ja kaltevuus b määritetään (n_c = hiiliatomien määrä). Viive t_o saadaan tämän jälkeen seuraavasta yhtälöstä:

$t_o = a/(1 - b)$

▼B

Kalibrointikäyrä

Seuraavaksi laaditaan korrelaatiokäyrä, joka esittää soveltuvien vertailuaineiden log k -arvot log P -arvojen funktiona. Tätä varten ruiskutetaan samanaikaisesti sarja, jossa on 5–10 vakiovertailuainetta, joiden log P kattaa odotetun alueen. Retentiot on suositeltavaa määrittää ilmaisinjärjestelmään kytketyllä tallentavalla integraattorilla. Käyttökertoimen k vastaavat logaritmit lasketaan ja merkitään käyrään ravistuspullomenetelmällä saatujen log P -arvojen funktiona. Kalibrointi tehdään määrätyin välein, vähintään kerran päivässä, jotta kolonnin suorituskyvyn mahdolliset muutokset voidaan havaita.

Näytteen käyttökertoimen määritys

Näytettä ruiskutetaan mahdollisimman pieneen määrään liikkuvaa faasia. Retentio määritetään kaksi kertaa. Tuloksen perusteella voidaan laskea käyttökerroin k. Näytteen jakaantumiskerroin voidaan interpoloida vertailuaineiden korrelaatiokäyrästä. Jos jakaantumiskerroin on hyvin pieni tai hyvin suuri, on käytettävä ekstrapolointia. Tällöin on erityisesti otettava huomioon regressiosuoran luottamusrajat.

2. **TIEDOT**

Ravistuspullomenetelmä

Määritettyjen log P -arvojen luotettavuus voidaan tarkistaa vertaamalla kaksoismääritysten keskiarvoa kokonaiskeskiarvoon.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet),

— jos menetelmiä ei voida soveltaa (esimerkiksi aineen pinta-aktiivisuuden vuoksi), laskettu arvo tai arvio, joka perustuu yksittäisiin n-oktanoli- tai vesiliukoisuuksiin,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta, erityisesti epäpuhtauksien ja aineen fysikaalisen olomuodon osalta.

Ravistuspullomenetelmän osalta:

— alustavan arvioinnin tulos (jos sellainen on tehty),

— määrityslämpötila,

— tiedot pitoisuuden määritykseen käytetyistä analyyttisista menetelmistä,

— sentrifugointiaika ja -nopeus (jos sentrifugointia on käytetty),

▼B

— kummastakin faasista mitatut pitoisuudet (eli raportoidaan yhteensä 12 pitoisuutta) jokaista määritystä kohti,

— näytteen paino, yksittäisten testausastioiden faasien tilavuudet ja näytteen laskettu kokonaismäärä jokaisessa faasissa tasapainon saavuttamisen jälkeen,

— jakaantumiskertoimen (P) lasketut arvot, keskiarvo ja kaikkien määritysten keskiarvo jokaista testiolosuhdetta kohti. Jos on havaittu merkkejä jakaantumiskertoimen vaihtelusta pitoisuuden mukaan, tästä on oltava maininta raportissa,

— yksittäisten P-arvojen keskihajonta keskiarvon suhteen,

— kaikkien määritysten P-keskiarvo ilmoitetaan kymmenkantaisena logaritmilukuna,

— laskettu teoreettinen P_{ow} kun tällainen on määritetty tai kun mittausten perusteella saatu arvo on $> 10^4$,

— käytetyn veden ja vesifaasin pH,

— jos on käytetty puskureita veden sijasta, on ilmoitettava syy, puskureiden kokoonpano, pitoisuus ja pH sekä vesifaasin pH ennen testiä ja sen jälkeen.

HPLC-menetelmän osalta:

— alustavan arvioinnin tulos (jos sellainen on tehty),

— näytteet ja vertailuaineet sekä niiden puhtausaste,

— määritysten lämpötila-alue,

— pH, jossa määritykset on tehty,

— analyyttisen kolonnin, suojakolonnin, liikkuvan faasin ja ilmaisumenetelmän tiedot,

— retentiotiedot ja lähdekirjallisuudesta saadut, kalibroinnissa käytettyjen vertailuaineiden log P -arvot,

— regressiosuoran tiedot (log k:n riippuvuus log P:stä),

— retentiotietojen keskiarvo ja näytteen interpoloitu log P -arvo,

— laitteen ja käyttöolosuhteiden kuvaus,

— eluointiprofillit,

— kolonniin pantujen näytteiden ja vertailuaineiden määrät,

— viiveet ja niiden mittaustavat.

▼B

4. **VIITTEET**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

▼B

Liite 1

Laskenta- ja arviointimenetelmät

JOHDANTO

Julkaisussa Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) on yleinen johdatus aiheeseen (laskentamenetelmiä, tietoja ja esimerkkejä).

Laskettuja P_{ow}-arvoja voidaan käyttää seuraviin tarkoituksiin:

— päättäminen soveltuvasta kokeellisesta menetelmästä (ravistuspullomenetelmän alue: log P_{ow}: - 2...4, HPLC-menetelmän alue: log P_{ow}: 0...6),

— sopivien testiolosuhteiden (esimerkiksi HPLC-menetelmän vertailuaineiden ja ravistuspullomenetelmän n-oktanoli-vesisuhteen) valinta,

— laboratorion sisäiset tarkistukset menetelmävirheiden löytämiseksi,

— P_{ow}-arvion antaminen tapauksissa, joissa kokeellisia menetelmiä ei voida soveltaa teknisistä syistä.

ARVIOINTIMENETELMÄ

Jakaantumiskertoimen alustava arviointi

Jakaantumiskertoimen arvo voidaan arvioida näytteen liukoisuudesta puhtaisiin liuottimiin, joka voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$P_{arvio} = \frac{\text{kyllästys } c_{n-\text{oktanoli}}}{\text{kyllästys } c_{vesi}}$$

LASKENTAMENETELMÄT

Laskentamenetelmien periaate

Kaikki laskentamenetelmät perustuvat molekyylin muodolliseen fragmentointiin sopiviin alarakenteisiin, joille on tiedossa luotettavat log P_{ow} -differentiaalit. Koko molekyylin log P_{ow} -arvo voidaan tämän jälkeen laskea fragmenttiarvojensa summana lisättynä korjaustermeillä, jotka perustuvat molekyylin sisäisiin vuorovaikutuksiin.

Luettelot fragmenttivakioista ja korjaustermeistä ovat saatavana lähteistä (b), (c), (d) ja (e). Joitakin niistä päivitetään säännöllisesti.

Laatukriteerit

Yleisesti ottaen laskentamenetelmien luotettavuus heikkenee tutkittavan yhdisteen monimutkaisuuden kasvaessa. Kun tutkitaan yksinkertaisia molekyyleja, joilla on alhainen molekyylipaino ja yksi tai kaksi funktionaalista ryhmää, voidaan odottaa, että poikkeama fragmentaatiomenetelmien ja mitatun arvon välillä on 0,1 - 0,3 log P_{ow} -yksikköä. Kun käsitellään monimutkaisempia molekyyleja, virhemarginaali voi olla tätä suurempi. Tämä vaihtelee fragmenttivakioiden luotettavuuden ja saatavuuden mukaan sekä sen mukaan, miten hyvin molekyylin sisäiset vuorovaikutukset (esimerkiksi vetysidokset) ovat tunnistettavissa ja miten hyvin korjaustermejä osataan käyttää (ongelma pienenee käytettäessä tietokoneohjelmaa CLOGP-3) (b). Kun käsitellään ionisoivia yhdisteitä, on tärkeää, että lataus tai ionisointiaste otetaan huomioon oikealla tavalla.

▼B

Laskentamenetelmät

Hanschin π-menetelmä

Alkuperäinen hydrofobinen substituenttivakio, π, jonka ovat esittäneet Fujita et al. (f), määritetään seuraavasti:

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

jossa P_{ow} (PhX) on aromaattisen johdannaisen jakaantumiskerroin ja P_{ow} (PhH) on emoyhdisteen jakaantumiskerroin. Esimerkki:

$$(\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5Cl) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71.$$

Tämän määritelmän mukaan p-menetelmä soveltuu lähinnä aromaattiseen substituutioon, p-arvot suurelle määrälle substituentteja on yhdistetty taulukkomuotoon (b), (c), (d). Arvoja käytetään aromaattisten molekyylien tai alarakenteiden log P_{ow} -arvojen laskentaan.

Rekker-menetelmä

Rekkerin mukaan (g) log P_{ow} -arvo lasketaan seuraavasti:

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

jossa f_1 edustaa eri molekyylifragmenttivakioita ja a_1 niiden esiintymistaajuutta tutkittavassa molekyylissa. Korjaustermit voidaan esittää yhden ainoan vakion C_m integraalikerrannaisina (niin sanottuna maagisena vakiona). Fragmenttivakiot f_1 ja C_m on määritetty 1 054 kokeellista P_{ow}-arvoa (825 yhdistettä) sisältävän luettelon perusteella moninkertaista regressioanalyysiä (c), (h) käyttäen. Vuorovaikutustermin määritys tehdään lähdekirjallisuudessa kuvatun säännöstön mukaan (e), (h), (i).

Hansch-Leon menetelmä

Hanschin ja Leon mukaan (c) log P_{ow} lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

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

jossa f_1 edustaa eri molekyylifragmenttivakioita, F_j korjaustermejä ja a_i, b_j vastaavia esiintymistaajuuksia. Yrityksen ja erehdyksen kautta on koottu kokeellisista P_{ow}-arvoista johdettujen atomien ja ryhmien fragmenttiarvojen luettelo sekä korjaustermien F_j (niin sanottujen kertoimien) luettelo. Korjaustermit on jaettu useaan eri luokkaan (a), (c). Kaikkien näiden sääntöjen ja korjaustermien huomioonottaminen on melko monimutkaista ja hidasta. Tehtävää helpottavat markkinoilla myytävät erikoisohjelmat (b).

Yhdistetty menetelmä

Monimutkaisten molekyylien P_{ow}-laskentaa voidaan helpottaa huomattavasti jakamalla molekyylit suurehkoihin alarakenteisiin, joille on saatavana luotettavia P_{ow}-arvoja joko taulukoista (b), (c) tai omista mittauksista. Tällaiset fragmentit (esimerkiksi heterosykliset renkaat, antrakinoni ja atsobentseeni) voidaan sen jälkeen yhdistää Hanschin π-arvoihin tai Rekkerin tai Leon fragmenttivakioihin.

Huomautuksia

i) Laskentamenetelmiä voidaan soveltaa vain osittain tai kokonaan ionisoituihin yhdistelmiin, edellyttäen, että tarpeelliset korjauskertoimet voidaan ottaa huomioon.

▼B

ii) Jos voidaan olettaa, että molekyylin sisällä on vetysidoksia, on lisättävä vastaavat korjaustermit (noin + 0,6...+ 0,1 log P_{ow} -yksikköä). Indikaatiot vetysidosten olemassaolosta saadaan stereomalleista tai molekyylin spektroskooppisista tiedoista.

iii) Jos useat tautomeeriset muodot ovat mahdollisia, todennäköisintä muotoa käytetään laskennan perustana.

iv) Fragmenttivakioluetteloiden päivityksiä on seurattava huolella.

Raportti

Kun käytetään laskenta- tai arviointimenetelmiä, testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen kuvaus (seos, epäpuhtaudet jne.),

— indikaatiot mahdollisten vetysidosten olemassaolosta, dissosiaatiosta, latauksesta tai muista epätavallisista ilmiöistä (esimerkiksi tautomeria),

— laskentamenetelmän kuvaus,

— tietokannan nimi tai lähde,

— fragmenttivalinnan erikoispiirteitä,

— yksityiskohtainen selvitys laskennasta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Liite 2

Suositeltavia vertailuaineita HPLC-menetelmää varten

Nro	Vertailuaine	log P_{ow}	pKa
1	2-butanoni	0,3	
2	4-asetyylipyridini	0,5	
3	Aniliini	0,9	
4	Asetanilidi	1,0	
5	Bentsyylialkoholi	1,1	
6	p-metoksifenoli	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoksietikkahappo	1,4	pKa = 3,12
8	Fenoli	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenoli	1,5	pKa = 3,96
10	Bentsonitriili	1,6	
11	Fenyyliasetonitriili	1,6	
12	4-metyylibentsyylialkoholi	1,6	
13	Asetofenoni	1,7	
14	2-nitrofenoli	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobentsoehappo	1,8	pKa = 3,47
16	4-kloorianiliini	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobentseeni	1,9	
18	Kanelihappo	1,9	
19	Bentsoehappo	1,9	pKa = 4,19
20	p-kresoli	1,9	pKa = 10,17
21	Kanelihappo	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisoli	2,1	
23	Metyylibentsoaatti	2,1	
24	Bentseeni	2,1	
25	3-metyylibentsoehappo	2,4	pKa = 4,27
26	4-klorofenoli	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloroetyleeni	2,4	
28	Atrasiini	2,6	
29	Etyylibentsoaatti	2,6	
30	2,6-diklorobentsonitriili	2,6	
31	3-klorobentsoehappo	2,7	pKa = 3,82
32	Tolueeni	2,7	
33	1-naftoli	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dikloroanilini	2,8	
35	Klorobentseeni	2,8	
36	Allyylifenyylieetteri	2,9	
37	Bromobentseeni	3,0	

▼B

Nro	Vertailuaine	log P_{ow}	pKa
38	Etyylibentseeni	3,2	
39	Bentsofenoni	3,2	
40	4-fenyylifenoli	3,2	pKa = 9,54
41	Tymoli	3,3	
42	1,4-diklorobentseeni	3,4	
43	Difenyyliamiini	3,4	pKa = 0,79
44	Naftaleeni	3,6	
45	Fenyylibentsoaatti	3,6	
46	Isopropyylibentseeni	3,7	
47	2,4,6-trikloorifenoli	3,7	pKa = 6
48	Bifenyyli	4,0	
49	Bentsyylibentsoaatti	4,0	
50	2,4-dinitro-6 sek. butyylifenoli	4,1	
51	1,2,4-triklooribentseeni	4,2	
52	Dodekaanihappo	4,2	
53	Difenyylieetteri	4,2	
54	n-butyylibentseeni	4,5	
55	Fenantreeni	4,5	
56	Fluoranteeni	4,7	
57	Dibentsyyli	4,8	
58	2,6-difenyylipyridiini	4,9	
59	Trifenyyliamiini	5,7	
60	DDT	6,2	
	Muita vertailuaineita, joilla on pieni log P_{ow} -arvo		
1	Nikotiinihappo	- 0,07	

▼B

A.9 LEIMAHDUSPISTE

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää tutkittavan aineen syttyvyys ennen testauksen aloittamista. Testimenetelmää voidaan soveltaa nestemäisiin aineisiin, joiden höyryt ovat sytytettävissä sytytyslähteen avulla. Tässä luetellut testimenetelmät ovat luotettavia vain menetelmien yhteydessä mainituilla leimahduspistealueilla.

Menetelmän valinnassa on otettava huomioon mahdolliset kemialliset reaktiot tutkittavan aineen ja näytteenpitimen välillä.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Leimahduspiste on alin lämpötila, korjattuna 101,325 kPa:n paineeseen, jossa neste testimenetelmässä kuvatuissa olosuhteissa muodostaa niin paljon höyryä, että testausastiassa muodostuu syttyvä höyryn ja ilman seos.

Yksiköt: ^{o}C

$t = T - 273,15$

(t annetaan Celsius-asteina ja T kelvineinä)

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Näyte pannaan testausastiaan ja se kuumennetaan tai jäähdytetään testilämpötilaan testimenetelmän ohjeiden mukaan. Tämän jälkeen selvitetään syttymiskokeiden avulla, leimahtaako näyte testilämpötilassa vai ei.

1.5 LAATUKRITEERIT

1.5.1 **Toistettavuus**

Toistettavuus vaihtelee leimahduspistealueen ja testimenetelmän mukaan. Maksimiarvo on 2 ^{o}C.

1.5.2 **Herkkyys**

Herkkyys vaihtelee testimenetelmän mukaan.

1.5.3 **Spesifisyys**

Joidenkin testimenetelmien spesifisyys rajoittuu määrättyyn leimahduspistealueeseen ja vaihtelee aineen ominaisuuksien (esimerkiksi viskositeetin) mukaan.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelutoimet**

Näyte asetetaan laitteeseen kohdan 1.6.3.1 tai 1.6.3.2. mukaan.

Turvallisuussyistä suositellaan, että voimakkaasti reagoivien tai myrkyllisten aineiden kohdalla valitaan menetelmä, jossa näyte on pieni, noin 2 cm^3.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Turvallisuusmääräysten mukaan laite on pidettävä paikassa, jossa ei ole vetoa.

1.6.3 **Työjärjestys**

1.6.3.1 *Tasapainomenetelmä*

Katso seuraavia standardeja: ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 *Tasapainottomuusmenetelmä*

Abelin laite:

Katso seuraavia standardeja: BS 2000 osa 170, NF M07.011, NF T66-009.

Abel-Penskyn laite:

Katso seuraavia standardeja: EN 57, DIN 51755 osa 1 (lämpötila-alue 5-65 °C), DIN 51755 osa 2 (lämpötilat alle 5 °C), NF M07-036.

Tagin laite:

Katso standardia ASTM D 56.

Pensky- Martensin laite:

Katso seuraavia standardeja: ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

Huomautuksia:

Jos kohdan 1.6.3.2 mukaisen tasapainottomuusmenetelmän tuloksena saadaan leimahduspiste, joka on 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C tai 55 ± 2 °C, tulos on vahvistettava tasapainomenetelmän avulla samaa laitetta käyttäen.

Ilmoituskelpoisia ovat vain sellaiset menetelmät, joilla saadaan leimahduspisteen lämpötila.

Nesteiden, jotka sisältävät liuotinta ja joiden viskositeetti on suuri (esimerkiksi maalien ja kumien) leimahduspisteen määritykseen saa käyttää ainoastaan laitteita ja testimenetelmiä, jotka soveltuvat suuren viskositeetin omaavien nesteiden leimahduspisteen määritykseen.

Katso seuraavia standardeja: ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 osa 1.

▼B

2. **TIEDOT**

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet),

— käytetty menetelmä ja mahdolliset poikkeamat,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

Viitteitä ei ole.

▼B

A.10 SYTITVYYS (KIINTEÄT AINEET)

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

On suositeltavaa selvittää tutkittavan aineen mahdolliset räjähtävät ominaisuudet ennen testiä.

Testimenetelmää tulee soveltaa vain jauhemaisiin, rakeisiin tai pastamaisiin aineisiin.

Koska ei ole käytännöllistä testata kaikkia syttyviä aineita, vaan vain sellaisia, jotka palavat nopeasti tai joiden palamisominaisuudet ovat joltakin osalta erityisen vaaralliset, herkästi syttyväksi aineeksi luokitellaan vain sellaiset, joiden palamisnopeus ylittää määrätyn raja-arvon.

Hehku, joka etenee metallijauheessa, voi olla erityisen vaarallinen palon sammutusvaikeuksien vuoksi. Metallijauheita on pidettävä herkästi syttyvinä, jos hehku etenee niissä massan läpi määrätyssä ajassa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Palamisaika sekunteina.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Aine muotoillaan yhteneväksi nauhaksi tai jauhelinjaksi, jonka pituus on noin 250 mm. Alustavan seulontatestin avulla määritetään, eteneekö kyteminen tai liekki, kun aine sytytetään kaasuliekillä. Jos liekki tai kyteminen etenee yli 200 mm annetun ajan kuluessa, aineen palamisnopeus määritetään kattavan testiohjelman avulla.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Alustava seulontatesti**

Aine muotoillaan yhteneväksi nauhaksi tai jauhelinjaksi, jonka pituus on noin 250 mm, leveys 20 mm ja korkeus 10 mm, palamattomalle, ei-huokoiselle ja heikosti lämpöä johtavalle alustalle.

Kaasupolttimen kuumaa liekkiä (vähimmäishalkaisija 5 mm) pidetään jauhelinjan toisessa päässä, kunnes jauhe syttyy tai enintään 2 minuuttia (5 minuuttia metallien ja metalliseosten kohdalla). Seurataan, eteneekö palaminen 200 mm linjaa pitkin 4 minuutin testijakson aikana (40 minuuttia metallijauheiden kohdalla). Jos aine ei syty eikä liekki tai kyteminen etene 200 mm:ä 4 minuutin testijakson aikana (40 minuuttia metallijauheiden kohdalla), ainetta ei pidetä herkästi syttyvänä, eikä lisätestausta tarvita. Jos aineen palaminen etenee jauhelinjaa pitkin 200 mm alle 4 minuutissa (tai alle 40 minuutissa metallijauheiden kohdalla), testausta on jatkettava jäljempänä kuvatun menetelmän mukaan (jatka kohdasta 1.6.2).

1.6.2 **Palamisnopeuden testaus**

1.6.2.1 *Valmistelutoimet*

Jauhemaista tai rakeista ainetta pannaan kevyelti 250 mm pitkään muottiin, jonka kolmionmuotoisen läpileikkauksen sisäkorkeus on 10 mm ja leveys 20 mm. Muotin pituussuunnassa on molemmille sivuille kiinnitetty kaksi metallilevyä siten, että levyjen yläreuna on 2 mm muotin reunan yläpuolella (katso kuvaa). Muotti pudotetaan kolme kertaa 2 cm:n korkeudelta kiinteälle pinnalle. Tarvittaessa ainetta lisätään muottiin. Tämän jälkeen sivulevyt poistetaan ja ylimääräinen aines kaavitaan pois. Muotille asetetaan palamaton, ei-huokoisesta ja heikosti lämpöä johtavasta aineesta valmistettu aluslevy, laite käännetään ja muotti poistetaan.

Pastamaiset aineet levitetään nauhana, jonka pituus on 250 mm ja läpileikkaus noin 1 cm^2, palamattomalle, ei-huokoiselle ja lämpöä heikosti johtavalle alustalle.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Jos aine on herkkä kosteudelle, testi on tehtävä mahdollisimman pian aineen säilöstä ottamisen jälkeen.

1.6.2.3 *Työjärjestys*

Aseta näyte vetokaappiin.

Veto on säädettävä sellaiseksi, ettei laboratoriotiloihin pääse savua. Vedon voimakkuus ei saa vaihdella testin aikana. Laitteen ympärille pystytetään suojaseinä vetoa vastaan.

Näytenauha sytytetään toisesta päästä kaasupolttimen kuumalla liekillä, jonka halkaisija on vähintään 5 mm. Kun palaminen on edennyt

▼B

80 mm:n verran, mitataan palamisnopeus seuraavalla 100 mm:n osuudella. Testi tehdään kuusi kertaa käyttäen aina puhdasta ja kylmää alustaa, ellei positiivista tulosta saavuteta aiemmin.

2. **TIEDOT**

Arvioinnissa käytetään alustavasta seulontatestistä saatua palamisaikaa (1.6.1) ja enintään kuudesta testistä saatua lyhyintä palamisaikaa (1.6.2.3).

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet),

— testattavan aineen kuvaus, sen fysikaalinen olomuoto ja kosteuspitoisuus,

— tulokset alustavasta seulonta- ja palamisnopeustestistä, jos tällaiset on tehty,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Jauhemaisia, rakeisia tai pastamaisia aineita pidetään herkästi syttyvinä, jos niiden palamisaika minkä tahansa kohdassa 1.6.2 kuvatun testin tuloksena on lyhyempi kuin 45 sekuntia. Metalli- tai metalliseosjauheita pidetään herkästi syttyvinä, jos ne voidaan sytyttää ja liekin tai reaktioalueen leviäminen koko näytteeseen kestää enintään kymmenen minuuttia.

4. **VIITTEET**

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

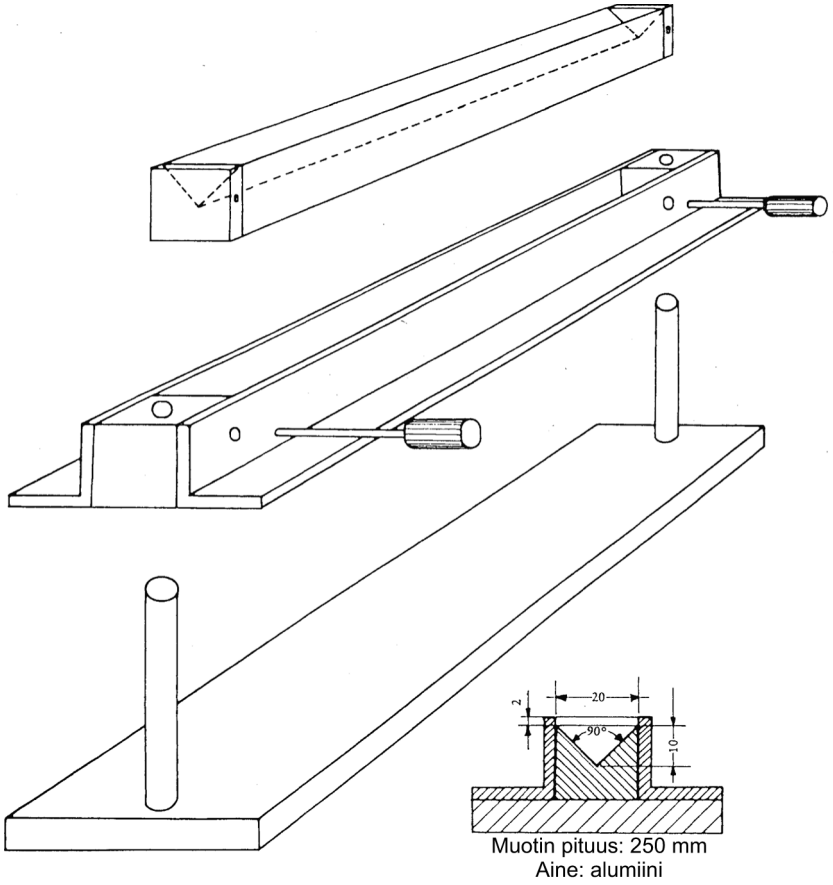
▼B

Liite

Kuva

Muotti ja tarvikkeet näytteen valmistelua varten

(Kaikki mitat ovat millimetreinä)



▼B

A.11 SYTTYVYYS (KAASUT)

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä voidaan määrittää pitoisuusalueet, joilla ilma-kaasuseos syttyy huoneenlämpötilassa (noin 20 °C:ssa) ja normaalissa ilmanpaineessa. Tutkittavan kaasun ja ilman seoksia altistetaan kaasupitoisuuksia suurentaen sähkökipinälle ja tarkkaillaan, syttyykö seos vai ei.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Syttyvyysalue on alimman ja ylimmän räjähdysrajan välinen pitoisuusalue. Alin ja ylin räjähdysraja ovat ne syttyvän kaasun ja ilman seoksen pitoisuudet, joissa ei synny leimahdusta.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Ilman kaasupitoisuutta suurennetaan asteittain ja jokaisen vaiheen pitoisuuden seos altistetaan sähkökipinälle.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

Testausastia on pystysuora lasisylinteri, jonka sisähalkaisija on vähintään 50 mm ja korkeus vähintään 300 mm. Sytytyselektrodit sijaitsevat 3–5 mm:n etäisyydellä toisistaan ja 60 mm:n korkeudella sylinterin pohjasta. Sylinterissä on paineentasausaukko. Laitteen ympärillä on oltava suoja mahdollisten räjähdysvahinkojen estämiseksi.

Kipinälähteenä käytetään 0,5 sekunnin induktiokipinää, joka saadaan korkeajännitemuuntajasta, jonka lähtöjännite on 10-15 kV (tehontarve enintään 300 W). Esimerkki soveltuvasta laitteesta on viitteessä (2).

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Testi tehdään huoneenlämpötilassa (noin 20 °C:ssa).

▼B

1.6.3 **Työjärjestys**

Lasisylinteriin pumpataan annostuspumpulla kaasu-ilmaseosta, jonka pitoisuus tunnetaan. Seoksen läpi johdetaan kipinä ja liekin mahdollista irtaantumista kipinälähteestä sekä sen itsenäistä etenemistä tarkkaillaan. Kaasupitoisuutta muutetaan yhden tilavuusprosentin askelin, kunnes syttyminen tapahtuu edellä kuvatulla tavalla.

Jos kaasun kemiallisen rakenteen perusteella voidaan olettaa, että kaasu ei ole syttyvää, ja kaasun ja ilman seoksen stökiometrimen koostumus voidaan testata 1 %:n askelin, tarvitsee testata vain seokset, joiden pitoisuus on enintään 10 % suurempi tai pienempi kuin tämä koostumus.

2. **TIEDOT**

Määrityksen ainoa merkitsevä tieto on liekin eteneminen.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet),

— käytetyn laitteen kuvaus mittatietoineen,

— testilämpötila,

— testatut pitoisuudet ja saadut tulokset,

— testin tulos: syttyvä kaasu tai herkästi syttyvä kaasu,

— jos kaasu todetaan syttymättömäksi, on ilmoitettava, millä pitoisuusalueella kaasua on testattu 1 %:n askelin,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

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

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

▼B

A.12 SYTTYVYYS (KOSKETUS VEDEN KANSSA)

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä testimenetelmällä voidaan määrittää, kehittääkö testattava aine veden tai kostean ilman kanssa kosketuksiin joutuessaan vaarallisia määriä kaasua tai kaasuja, jotka voivat olla herkästi syttyviä.

Testimenetelmää voidaan soveltaa sekä kiinteisiin että nestemäisiin aineisiin. Menetelmää ei voi soveltaa aineisiin, jotka syttyvät itsestään joutuessaan kosketuksiin ilman kanssa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Herkästi syttyviä ovat aineet, jotka veden tai kostean ilman kanssa kosketuksiin joutuessaan muodostavat vaarallisia määriä herkästi syttyviä kaasuja miniminopeudella 1 l/kg/h.

1.3 MENETELMÄN PERIAATE

Ainetta testataan jäljempänä kuvatun vaiheittaisen sarjan mukaan. Jos syttymistä esiintyy, sarjaa ei tarvitse jatkaa. Jos tiedetään, että aine ei reagoi voimakkaasti veden kanssa, voidaan edetä vaiheeseen 4 (1.3.4).

1.3.1 Vaihe 1

Näyte pannaan kaukaloon, jossa on 20-celsiusasteista tislattua vettä. Todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei.

1.3.2 Vaihe 2

Näyte pannaan suodatinpaperille, joka kelluu 20-celsiusasteisen tislatun veden pinnalla sopivassa astiassa. Todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei. Suodatinpaperia tarvitaan vain pitämään näyte koossa mahdollisen syttymisen helpottamiseksi.

1.3.3 Vaihe 3

Näyte muotoillaan keoksi, jonka korkeus on noin 2 cm ja läpimitta noin 3 cm. Keolle kaadetaan muutama tippa vettä, ja todetaan, syttyykö muodostunut kaasu vai ei.

1.3.4 Vaihe 4

Näytettä sekoitetaan 20-celsiusasteiseen tislattuun veteen ja kaasun muodostumisnopeus mitataan tunnin välein seitsemän tunnin ajan. Jos muodostumisnopeus on epäsäännöllinen tai kasvava seitsemän tunnin jälkeen, mittausaika voidaan pidentää enintään viideksi päiväksi. Testi voidaan keskeyttää, jos nopeus missä tahansa vaiheessa ylittää arvon 1 l/kg/h.

▼B

1.4 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritetty.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

1.6.1 **Vaihe 1**

1.6.1.1 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.1.2 *Työjärjestys*

Pieni määrä näytettä, jonka läpimitta on noin 2 mm, pannaan tislattua vettä sisältävään kaukaloon. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testiä ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

1.6.2 **Vaihe 2**

1.6.2.1 *Laite*

Sopivassa astiassa, esimerkiksi 100 ml:n haihdutusastiassa, pidetään 20-celsiusasteista tislattua vettä. Veden pinnalla kelluu suodatinpaperi.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.2.3 *Työjärjestys*

Pieni määrä näytettä (läpimitta noin 2 mm) asetetaan suodatinpaperin keskelle. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testausta ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

1.6.3 **Vaihe 3**

1.6.3.1 *Testiolosuhteet*

Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa).

1.6.3.2 *Työjärjestys*

Näyte muotoillaan keoksi, jonka korkeus on noin 2 cm ja läpimitta noin 3 cm. Keon huipulle tehdään kuoppa, johon kaadetaan muutama tippa vettä. Todetaan, (i) muodostuuko kaasua ja (ii) syttyykö kaasu. Jos kaasu syttyy, testausta ei tarvitse jatkaa, koska aine luokitellaan tällöin vaaralliseksi.

▼B

1.6.4 **Vaihe 4**

1.6.4.1 *Laite*

Laite rakennetaan kuvan mukaisesti.

1.6.4.2 *Testiolosuhteet*

Katsotaan, onko näytesäiliössä jauhetta (hiukkaskoko < 500 μm). Jos tällaisen jauheen paino-osuus ylittää 1 % tai jos näyte on murenevaa, koko näyte on jauhettava ennen testausta, jotta hiukkaskoko olisi pienempi varastoinnin ja käsittelyn aikana. Muuten näytettä testataan vastaanotetussa muodossa. Testi tehdään huoneenlämmössä (noin 20 °C:ssa) ja yhden ilmakehän paineessa.

1.6.4.3 *Työjärjestys*

Laitteen tiputussuppiloon kaadetaan 10–20 ml vettä ja erlenmeyerpulloon pannaan 10 g näytettä. Muodostuneen kaasun tilavuus voidaan mitata millä tahansa sopivalla menetelmällä. Tiputussuppilon hana avataan ja samalla käynnistetään sekuntikello. Kaasunmuodostus mitataan kerran tunnissa seitsemän tunnin ajan. Jos muodostumisnopeus on epäsäännöllinen tai kasvava seitsemän tunnin jälkeen, mittausaikaa voidaan pidentää enintään viideksi päiväksi. Testi voidaan keskeyttää, jos nopeus ylittää arvon 1 l/kg/h missä tahansa vaiheessa. Testi tehdään kolme kertaa.

Jos kaasun kemiallista koostumusta ei tunneta, kaasu on analysoitava. Jos kaasu sisältää herkästi syttyviä osia eikä tiedetä, onko koko seos herkästi syttyvä, on valmistettava koostumukseltaan samanlainen seos, joka testataan menetelmän A. 11 mukaisesti.

2. **TIEDOT**

Aine katsotaan vaaralliseksi, jos:

— se syttyy itsestään testin jossakin vaiheessa, tai

— jos syttyvää kaasua muodostuu nopeudella, joka ylittää arvon 1 l/kg/h.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot, epäpuhtaudet),

— selvitys mahdollisista aineen valmistelutoimista,

▼B

— testitulokset (vaiheet 1, 2, 3 ja 4),

— muodostuneen kaasun kemiallinen koostumus,

— kaasun muodostumisnopeus, jos vaihe 4 suoritetaan (1.6.4),

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

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

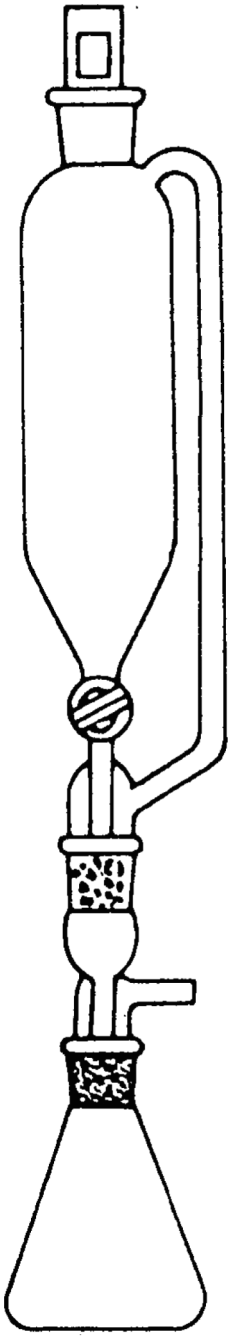
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Liite

Kuva

Laite



▼B

A.13 **KIINTEIDEN AINEIDEN JA NESTEIDEN ITSESYTTYVYYS**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Testimenetelmää voidaan soveltaa kiinteisiin ja nestemäisiin aineisiin, jotka pieninä määrinä syttyvät itsestään nopeasti jouduttuaan kosketuksiin huoneenlämpöisen (20 °C) ilman kanssa.

Testimenetelmä ei kata aineita, jotka syttyvät vain siinä tapauksessa, että niitä pidetään huoneenlämpöisessä ilmassa useita tunteja tai päiviä tai jos lämpötilaa korotetaan.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Aine luokitellaan itsestään syttyväksi, jos se syttyy tai aiheuttaa hiiltymistä kohdassa 1.6 kuvatuissa olosuhteissa.

Nesteiden itsesyttyvyyden testauksessa voidaan myös tarvita menetelmää A.15 Itsesyttymislämpötila (nesteet ja kaasut).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole määritetty.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Näyte (kiinteä tai nestemäinen) pannaan inertille alustalle ja saatetaan kosketuksiin huoneenlämpöisen ilman kanssa viideksi minuutiksi. Jos neste ei syty tässä ajassa, se imeytetään suodatinpaperiin ja pannaan huoneenlämpöiseen (20 °C) ilmaan viideksi minuutiksi. Jos kiinteä aine tai neste syttyy tai jos neste sytyttää suodatinpaperin tai aiheuttaa sen hiiltymisen, aine luokitellaan itsestään syttyväksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Toistettavuus: koska itsesyttyvyysominaisuus on tärkeä turvallisuustekijä, yksi positiivinen tulos riittää aineen luokittelemiseksi itsestään syttyväksi.

1.6 MENETELMÄKUVAUKSET

1.6.1 **Laite**

Posliinikuppiin, jonka läpimitta on noin 10 cm, pannaan noin 5 mm:n kerros huoneenlämpöistä (noin 20 °C) piimaata.

Huomautus:

Piimaa tai muu vastaava inertti, yleisesti saatavilla oleva aine katsotaan esimerkiksi aineesta, johon testattavaa ainetta voi kaataa vahingon sattuessa.

Kuivaa suodatinpaperia tarvitaan sellaisten nesteiden testaukseen, jotka inertillä alustalla pidettyinä eivät syty joutuessaan ilman kanssa kosketuksiin.

▼B

1.6.2 **Testin suorittaminen**

a) *Jauhemaiset kiinteät aineet*

1–2 cm^3 testattavaa jauhetta kaadetaan noin 1 m:n korkeudelta palamattomalle alustalle. Samalla tarkkaillaan, syttyykö aine palamaan pudotessaan tai viiden minuutin kuluessa alustalle asettumisesta.

Ellei syttymistä tapahdu, koe tehdään kuusi kertaa.

b) *Nesteet*

Noin 5 cm^3 testattavaa nestettä kaadetaan preparoituun posliinikuppiin. Samalla tarkkaillaan, syttyykö neste viiden minuutin kuluessa.

Ellei neste syty kuuden kokeen aikana, jatketaan seuraavilla kokeilla:

0,5 ml näytenestettä annostellaan ruiskusta suodatinpaperille. Samalla tarkkaillaan, syttyykö suodatinpaperi palamaan tai hiiltyykö se viiden minuutin kuluessa nesteen lisäyksen jälkeen. Ellei syttymistä tai hiiltymistä tapahdu, testi tehdään kolme kertaa.

2. **TIEDOT**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Testi voidaan keskeyttää heti kun mistä tahansa testin osasta saadaan myönteinen tulos.

2.2 ARVIOINTI

Jos aine syttyy viiden minuutin kuluessa siitä, kun sitä on pantu inertille alustalle ja saatettu kosketuksiin ilman kanssa, tai jos neste sytyttää suodatinpaperin tai aiheuttaa sen hiiltymisen viiden minuutin kuluessa, aine luokitellaan itsestään syttyväksi.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— aineen tarkka spesifikaatio (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet),

— testitulokset,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

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

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

▼B

A.14 **RÄJÄHTÄVYYS**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Menetelmä koostuu testiohjelmasta, jonka avulla voidaan määrittää, onko kiinteä tai pastamainen aine räjähdysaltis, kun se altistetaan liekille (lämpöherkkyys) tai iskulle tai kitkalle (mekaaninen herkkyys) ja onko neste räjähdysaltis, kun se altistetaan liekille tai iskulle.

Menetelmä on kolmiosainen:

a) lämpöherkkyyden testaus (1);

b) iskuherkkyyden testaus (1);

c) kitkaherkkyyden testaus (1).

Menetelmän avulla voidaan selvittää todennäköisyys sille, että aine räjähtää, kun se altistetaan määrätyille tavallisille ärsykkeille. Menetelmää ei ole tarkoitettu käytettäväksi sen selvittämiseen, voiko aine yleensä räjähtää.

Menetelmällä voidaan määrittää, liittyykö aineeseen lämpöherkkyydestä ja mekaanisesta herkkyydestä aiheutuvaa räjähdysvaaraa direktiivin kuvaamissa erikoisolosuhteissa. Menetelmä perustuu joukkoon laitetyyppejä, joita käytetään yleisesti monissa maissa (1) ja joilla yleensä saadaan selkeitä tuloksia. Todettakoon, että menetelmä ei ole lopullinen. Myös muita laitteita voidaan käyttää, edellyttäen, että ne ovat kansainvälisesti tunnustettuja ja että tulokset ovat riittävän hyvin korreloitavissa.

Testiä ei tarvitse suorittaa, jos käytettävissä olevien termodynaamisten tietojen (esimerkiksi muodostumis- tai hajoamislämmön) tai määrättyjen reaktiivisten ryhmien (2) rakennekaavasta puuttumisen perusteella avulla voidaan täysin varmasti osoittaa, että aine ei voi hajota nopeasti muodostaen kaasuja tai lämpöä, eikä siihen näin ollen liity minkäänlaista räjähdysvaaraa. Nesteiden kohdalla ei vaadita kitkaherkkyyden testausta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Räjähtävä:

Aineet, jotka voivat räjähtää liekin vaikutuksesta tai jotka ovat herkkiä iskulle tai kitkalle spesifioidussa laitteessa (tai ovat mekaanisesti herkempiä kuin 1,3-dinitrobentseeni vaihtoehtoisessa laitteessa).

1.3 VERTAILUAINEET

1,3-dinitrobentseeni, tekninen kiteinen tuote, joka on läpäissyt 0,5 mm:n seulan, käytetään kitka- ja iskumenetelmissä.

Perhydro-l,3,5-trinitro-l,3,5-triatsiini (RDX, heksogeeni, sykloniini — CAS 121-82-4); uudelleenkiteytetty vesipitoisesta sykloheksanonista, märkäseulottu 250 mm:n tarkkuudella ja pidätetty 150 µm:n seulaan sekä kuivattu 130 ± 2 °C:ssa (4 tuntia) toista kitka- ja iskutestisarjaa varten.

▼B

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

On tarpeen tehdä alustavat testit, joiden avulla voidaan määrittää turvalliset olosuhteet kolmelle herkkyystestille.

1.4.1 **Käsittelyturvallisuustestit (3)**

Ennen varsinaisen testin aloittamista on turvallisuussyistä altistettava hyvin pieniä näytemääriä (noin 10 mg) kuumentamiselle avoimessa kaasuliekissä tai vasaran ja alasimen tai sopivan kitkakoneen avulla aikaansaatavalle kitkalle. Tarkoituksena on selvittää, onko aineen herkkyys ja räjähtävyys sellaista luokkaa, että kuvatut herkkyystestit, etenkin lämpöherkkyyden kohdalla, on henkilövahinkojen välttämiseksi suoritettava erityistä varovaisuutta noudattaen.

1.4.2 **Lämpöherkkyys**

Näytettä kuumennetaan teräsputkessa, joka on suljettu sopivalla reiällä varustetulla mittauslaipalla. Testin avulla selvitetään, onko aine räjähdysherkkä hyvin kuumissa olosuhteissa ja ahtaassa tilassa.

1.4.3 **Mekaaninen herkkyys (isku)**

Näyte altistetaan iskulle pudottamalla sen päälle määrätty massa määrätyltä korkeudelta.

1.4.4 **Mekaaninen herkkyys (kitka)**

Kiinteä tai pastamainen näyte altistetaan kitkalle vakiopintojen välillä käyttäen annettua kuormaa ja suhteellista liikettä.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole määritelty.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Lämpöherkkyys (liekin vaikutus)**

1.6.1.1 *Laite*

Laitteessa on kuumennus- ja suojaosaan asennettu kertakäyttöinen teräsputki, jossa on uudelleen käytettävä suljinosa (kuva 1). Syvävedetystä teräslevystä (katso liitettä) valmistettujen putkien sisähalkaisija on 24 mm, pituus on 75 mm ja seinän paksuus 0,5 mm. Putken avoimessa päässä on laippaliitos mittauslaippaa varten. Paineenkestävä mittauslaippa kiinnitetään putkeen kaksiosaisella ruuviliitännällä (mutterilla ja kierrelaipalla). Mutteri ja kierrelaippa on valmistettu kromi-mangaaniteräksestä (katso liitettä), joka on kipinöimätöntä 800 ^{o}C:een asti. Lämmönkestävästä teräksestä valmistettujen, useilla eri reiänhalkaisijoilla varustettujen mittauslaippojen paksuus on 6 mm.

▼B

1.6.1.2 *Testiolosuhteet*

Yleensä aine testataan sellaisenaan. Joissakin tapauksissa (esimerkiksi jos aine on puristetussa, valetussa tai muulla tavoin tiivistetyssä muodossa) aine on murskattava ennen testiä.

Kiinteiden aineiden kussakin testauksessa käytettävä massa määritetään kaksivaiheisen kuiva-ajon avulla. Taarattuun putkeen pannaan 9 cm^3 ainetta, joka sullotaan putkeen tämän koko poikkileikkauspinta-alaan kohdistuvalla 80 N:n voimalla. Turvallisuussyistä ja tapauksissa, joissa näytteen fyysinen muoto voi muuttua puristuksen vaikutuksesta, voidaan käyttää muuntyyppistä täyttömenetelmää (sullomista ei voi käyttää esimerkiksi hyvin kitkaherkkien aineiden kohdalla). Jos aine kestää puristamista, täyttöä ja sullomista jatketaan, kunnes aineen yläpinnan etäisyys putken reunasta on 55 mm. Määritetään kokonaismassa, joka on käytetty putken täyttämiseen 55 mm:iin asti, minkä jälkeen tehdään vielä kaksi lisäystä, kumpikin 80 N:n voimalla sulloen. Tämän jälkeen ainetta joko lisätään sulloen tai poistetaan niin paljon, että aineen yläpinta on 15 mm:n etäisyydellä putken reunasta. Tehdään toinen kuiva-ajo, joka aloitetaan sullotulla massalla, joka on kolmasosa ensimmäisen ajon kokonaismassasta. Kaksi tällaista määrää lisätään sulloen 80 N:n voimalla, ja aineen yläpinta säädetään ainetta lisäämällä tai poistamalla 15 mm:n tasolle putken yläpinnasta. Kussakin kokeessa käytetään toisessa ajossa määritettyä massaa; täyttö tehdään kolmella yhtä suurella määrällä, joista jokainen puristetaan 9 cm^3:iin tarpeellista voimaa käyttäen (apuna voidaan käyttää välirenkaita).

Nesteet ja geelit täytetään putkeen 60 mm:n korkeuteen. Täytössä on erityisesti varottava tyhjien kohtien muodostumista. Kierrelaippa ohjataan putkeen yläkautta, valittu mittauslaippa asetetaan paikoilleen, hieman molybdeeni-disulfidipohjaista voiteluainetta lisätään ja mutteri kiristetään. On tärkeää tarkistaa, että mitään aineista ei ole jäänyt laipan ja levyn väliin tai kierteisiin.

Kuumennus tehdään propaanilla, joka otetaan kaasupullosta. Sylinterissä on oltava paineensäädin (60–70 mbar). Kaasun on kuljettava mittarin ja jakotukin kautta tasaisesti (virtauksen tasaisuus voidaan todeta pohtimien liekeistä) neljään polttimeen, Pohtimien sijoitus testauskammion ympärille ilmenee kuvasta 1. Polttimet kuluttavat yhteensä noin 3,2 litraa propaania minuutissa. Myös muita polttokaasuja tai muita polttimia voidaan käyttää, mutta kuumennusnopeuden on tällöin oltava sama kuin kuvassa 3. Kaikkien laitteiden kuumennusnopeus on tarkistettava säännöllisesti kuvasta 3 ilmenevällä tavalla dibutyyliftalaatilla täytettyjen putkien avulla.

1.6.1.3 *Testin suorittaminen*

Jokaista testiä jatketaan, kunnes putki hajoaa tai kunnes sitä on kuumennettu viiden minuutin ajan. Jos testin tuloksena on putken hajoaminen vähintään kolmeen osaan, jotka joissakin tapauksissa voivat olla vielä kiinni toisissaan kapeilla metallikaistaleilla (katso kuvaa 2), aineen katsotaan räjähtäneen. Jos hajoamisosien määrä on pienempi tai jos hajoamista ei tapahdu, katsotaan, että räjähdystä ei ole tapahtunut.

▼B

Ensin tehdään kolmen testin sarja, jossa mittauslaipan aukon halkaisija on 6,0 mm. Ellei räjähdystä tapahdu, tehdään toinen kolmen testin sarja, jossa mittauslaipan aukon halkaisija on 2,0 mm. Jos jommankumman sarjan tuloksena on räjähdys, testejä ei tarvitse jatkaa.

1.6.1.4 *Arviointi*

Testitulos katsotaan positiiviseksi, jos jommankumman edellä kuvatun testisarjan aikana tapahtuu räjähdys.

1.6.2 **Mekaaninen herkkyys (isku)**

1.6.2.1 *Laite (kuva 4)*

Tyypillisen vasaralaitteen tärkeimmät osat ovat teräsvalukappale alustoineen, alasin, pylväs, ohjaimet, pudotuspainot, irrotuslaite ja näytteenpidin. Teräsalasin (halkaisija 100 mm ja korkeus 70 mm) on kiinnitetty ruuveilla teräskappaleeseen (pituus 230 mm, leveys 250 mm ja korkeus 200 mm). Teräskappale on teräsvalualustalla (pituus 450 mm, leveys 450 mm ja korkeus 60 mm). Pylväs on tehty saumattomasta teräksestä vedetystä putkesta, ja se sijaitsee pitimessä, joka on kiinnitetty ruuveilla teräskappaleen taakse. Laite on ankkuroitu massiiviseen sementtikappaleeseen (60 x 60 x 60 cm) ruuveilla siten, että ohjainkiskot ovat ehdottomasti pystysuorassa ja pudotuspaino pääsee putoamaan vapaasti. Painot (5 kg ja 10 kg) on valmistettu umpiteräksestä. Kummankin painon pää on karkaistua terästä (HRC 60-63), iskuhalkaisijaltaan vähintään 25 mm.

Näyte suljetaan iskulaitteeseen, jossa on kaksi päällekkäistä, konsentrista, umpiteräksistä sylinteriä, jotka sijaitsevat ontossa, sylinterinmuotoisessa teräsrenkaassa. Umpiterässylintereiden on oltava halkaisijaltaan 10 (- 0,003, - 0,005) mm ja korkeudeltaan 10 mm ja niissä on oltava kiillotettu pinta sekä pyöristetyt reunat (kaarevuussäde 0,5 mm). Sylintereiden kovuusarvon on oltava HRC 58-65. Onton sylinterin ulkohalkaisijan on oltava 16 mm, sisähalkaisijan 10 (+ 0,005, + 0,10) mm (kiillotettu sisäpinta) ja korkeuden 13 mm. Iskulaite on asennettu teräksiseen välialasimeen (halkaisija 26 mm ja korkeus 26 mm), joka on keskitetty renkaan avulla. Renkaassa on reiät savunpoistoa varten.

1.6.2.2 *Testiolosuhteet*

Näytettä käytetään 40 mm^3 tai muu, vaihtoehtoiselle laitteelle sopiva määrä. Kiinteät aineet testataan kuivina ja valmistellaan seuraavasti;

a) Jauhetut aineet seulotaan (seulakoko 0,5 mm). Kaikki seulan läpäissyt aines käytetään.

b) Puristetut tai muulla tavoin tiivistetyt aineet murskataan ja seulotaan. Testissä käytetään seulontafraktiota 0,5–1 mm, jonka on edustettava alkuperäistä ainetta.

Aineet, jotka toimitetaan yleensä pastamuodossa, on mahdollisuuksien mukaan testattava kuivina tai vasta mahdollisimman täydellisen laimennusaineen poiston jälkeen. Nestemäisten aineiden testauksessa ylemmän ja alemman teräs sylinterin väliin on jätettävä 1 mm:n aukko.

▼B

1.6.2.3 *Testin suorittaminen*

Tehdään kuuden testin sarja pudottamalla 10 kg:n massa 0,40 m:n korkeudelta (40 J). Jos näiden testien aikana syntyy räjähdys, tehdään toinen kuuden testin sarja pudottamalla 5 kg:n massa 0,15 m:n korkeudelta (7,5 J). Jos käytetään muuntyyppistä laitetta, näytettä verrataan valittuun vertailuaineeseen käyttämällä hyväksyttyä menetelmää (esimerkiksi ylös-alas-tekniikkaa).

1.6.2.4 *Arviointi*

Testitulos katsotaan positiiviseksi, jos räjähdys (liekkeihin leimahtaminen tai muu raportti katsotaan räjähdykseksi) tapahtuu vähintään kerran määritetyllä iskulaitteella suoritetussa testissä tai jos näyte on vaihtoehtoisessa iskutestissä herkempi kuin 1,3-dinitrobentseeni tai RDX.

1.6.3 **Mekaaninen herkkyys (kitka)**

1.6.3.1 *Laite (kuva 5)*

Kitkalaitteen muodostavat valettu teräslaatta ja sille asennettu kitkayksikkö. Kitkayksikkö koostuu kiinteästä posliinitapista ja liikkuvasta posliinilaatasta, joka on kiinnitetty kahdessa ohjaimessa liikkuvaan vaunuun. Vaunu on kytketty sähkömoottoriin kytkentäsauvan, epäkeskoakselin ja sopivan vaihteiston kautta siten, että posliinilaatta liikkuu kerran edestakaisin 10 mm:n matkan posliinitapin alla. Posliinitappia voidaan kuormittaa esimerkiksi 120 tai 360 Newtonin voimalla.

Litteät posliinilaatat on valmistettu valkoisesta teknisestä posliinista (karheus 9–32 μm). Laattojen mitat ovat 25 mm (pituus) x 25 mm (leveys) x 5 mm (korkeus). Myös sylinterinmuotoinen posliinitappi on valkoista teknistä posliinia, pituudeltaan 15 mm ja halkaisijaltaan 10 mm. Tapin pää on pyöreä ja karhennettu (kaarevuussäde 10 mm).

1.6.3.2 *Testiolosuhteet*

Näytettä käytetään 10 mm^3 tai jokin muu vaihtoehtoiseen laitteeseen sopiva määrä.

Kiinteät aineet testataan kuivina ja valmistellaan seuraavasti:

a) Jauhetut aineet seulotaan (seulakoko 0,5 mm). Kaikki seulan läpäissyt aines käytetään.

b) Puristetut tai muulla tavalla tiivistetyt aineet murskataan ja seulotaan, Testissä käytetään alle 0,5 mm:n seulontafraktiota.

Aineet, jotka yleensä toimitetaan pastamuodossa, on mahdollisuuksien mukaan testattava kuivina. Jos ainetta ei voi valmistella kuivassa muodossaan, pasta (jolle tehdään ensin mahdollisimman täydellinen laimennusaineen poisto) muotoillaan kalvoksi, jonka paksuus on 0,5 mm, leveys 2 mm ja pituus 10 mm.

▼B

1.6.3.3 *Testin suorittaminen*

Posliinitappi asetetaan testattavan näytteen päälle ja kuormitus aktivoidaan. Testin aikana posiinilaatan karhennuksien on oltava poikittain liikkeen suuntaan nähden. On varmistettava, että tappi lepää näytteellä, että tarpeellinen määrä näyteainetta on tapin alla ja että laatta liikkuu oikealla tavoin tapin alla. Pastamaista ainetta pannaan laatalle käyttäen 2 × 10 mm:n uralla varustettua mittalevyä, jonka paksuus on 0,5 mm. Posliinilaatan on liikuttava posliinitapin alla 10 mm:n matka eteen ja taakse 0,44 sekunnissa. Laatan ja tapin pinnan osia saa käyttää vain kerran; kummankin tapin molempia päitä voidaan käyttää kahdessa testissä ja laatan kummankin pinnan pitää kestää kolme testiä.

Tehdään kuuden testin sarja 360 N:n kuormalla. Jos näiden testien aikana saadaan positiivinen tulos, tehdään toinen kuuden testin sarja 120 N:n kuormalla. Jos käytetään muuntyyppistä laitetta, näytettä verrataan valittuun vertailuaineeseen hyväksyttyä menetelmää (esimerkiksi ylös-alas-tekniikkaa) käyttäen.

1.6.3.4 *Arviointi*

Testin tulos katsotaan positiiviseksi, jos räjähdys (kuuluva rätinä, muu raportti tai leimahdus katsotaan räjähdykseksi) tapahtuu vähintään kerran määritetyllä kitkalaitteella suoritetuissa testeissä tai täyttää tätä vastaavan kriteerin vaihtoehtoisessa kitkatestissä.

2. **TIEDOT**

Periaatteessa aine katsotaan räjähdysvaaralliseksi direktiivin tarkoittamassa mielessä, jos lämpöherkkyys-, iskuherkkyys- tai kitkaherkkyystestistä saadaan positiivinen tulos.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot;

— näyteaineen tunnistustiedot, koostumus, puhtaus, kosteuspitoisuus jne.,

— aineen fyysinen muoto ja tiedot siitä, onko ainetta murskattu, rikottu tai seulottu,

— havainnot lämpöherkkyystesteistä (esimerkiksi näytteen massa ja sirpaleiden määrä),

— havainnot mekaanisista herkkyystesteistä (esimerkiksi huomattavan savumäärän muodostuminen tai raportoimaton täydellinen hajoaminen, liekit, kipinät, muu raportti ja rätinä),

— jokaisen testityypin tulokset,

— jos vaihtoehtoisia laitteita on käytetty, on esitettävä tieteellinen perustelu ja todisteet korrelaatiosta määritetyllä laitteella saatujen ja tätä vastaavalla laitteella saatujen tulosten välillä,

▼B

— kaikki käyttökelpoiset kommentit, kuten tulosten tulkinnan kannalta varten tärkeät viitteet vastaavien tuotteiden testauksiin,

— kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

3.2 TULOSTEN TULKINTA JA ARVIOINTI

Testiraportissa on mainittava kaikki tulokset, joita pidetään virheellisinä, epänormaaleina tai ei-edustavina. Jos jokin tulos hylätään, on annettava selitys ja esitettävä tulos vaihtoehtoisesta tai täydentävästä testistä. Ellei epänormaalia tulosta voida selittää, se on hyväksyttävä sellaisenaan ja sitä on käytettävä aineen luokitukseen tuloksen mukaan.

4. **VIITTEET**

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

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

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

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

▼B

Liite

Esimerkki ainespesifikaatiosta lämpöherkkyystestiä varten (katso standardia DIN 1623)

(1) Putki: ainespesifikaatio nro 1.0336.505 g

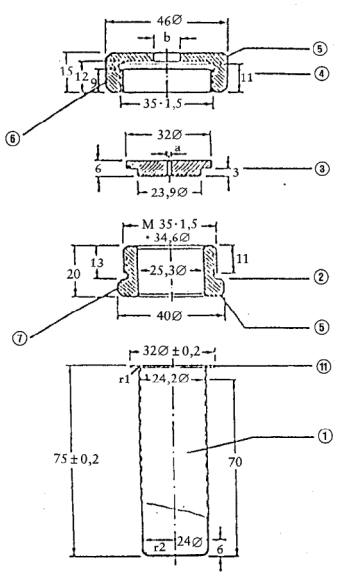
(2) Mittauslaippa: ainespesifikaatio nro 1.4873

(3) Kierrelaippa ja mutteri: ainespesifikaatio nro 1.3817

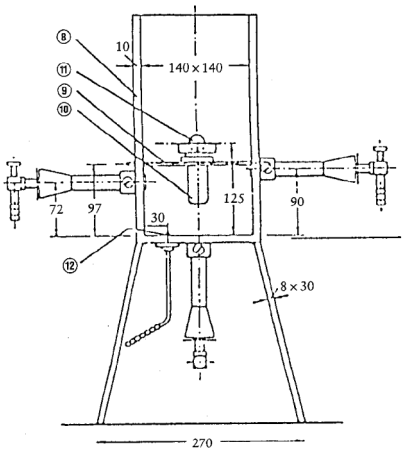
Kuva 1

Lämpöherkkyyden mittauslaite

(kaikki mitat ovat millimetreinä)



Kuva 1a Teräsputki varusteineen



Kuva 1b Kuumennus- ja suojalaite

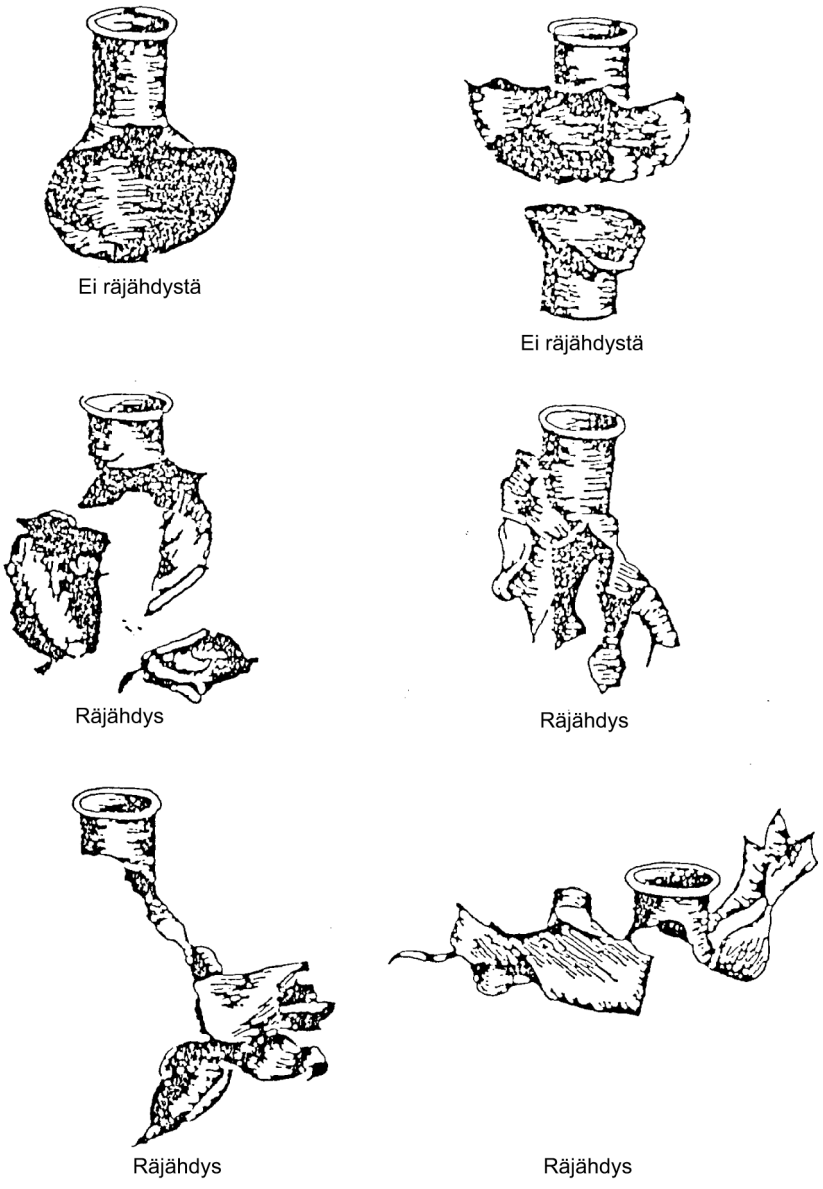
1. putki
1a. ulkolaippa
2. kierrelaippa; matalakitkakierre
3. mittauslaippa = halkaisija 2,0 tai 6,0 mm
4. mutteri b = halkaisija 10 mm
5. viistetty pinta
6. 2 upporuuvia, avainkoko 41
7. 2 upporuuvia, avainkoko 36
8. sirpaleenkestävä laatikko
9. putken 2 tukitankoa
10. asennettu putki
11. takapolttimen paikka; muut polttimet ovat näkyvissä
12. joutokäyntisuutin

▼B

Kuva 1a Teräsputki varusteineen

Kuva 2

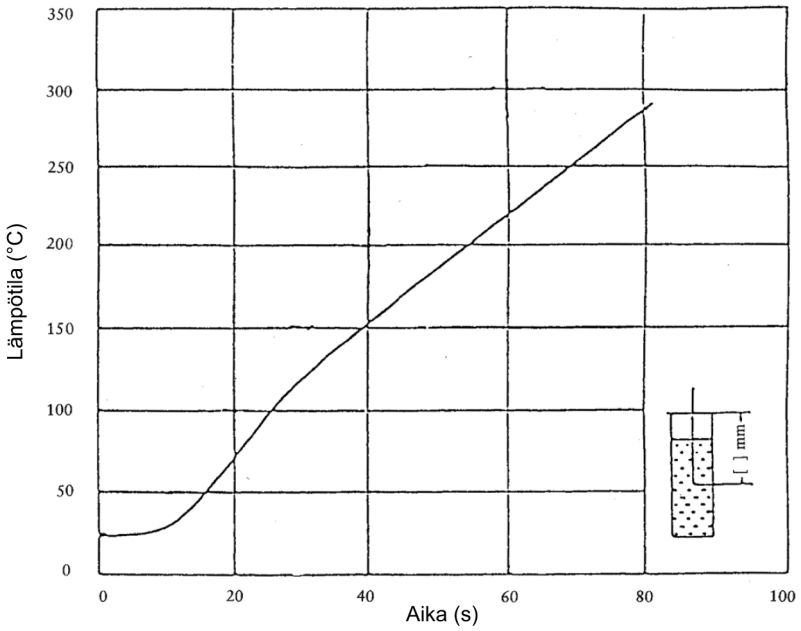
Lämpöherkkyystesti Esimerkkejä sirpaleenmuodostuksesta



▼B

Kuva 3

Kuumennusnopeuden kalibrointi lämpöherkkyystestiä varten



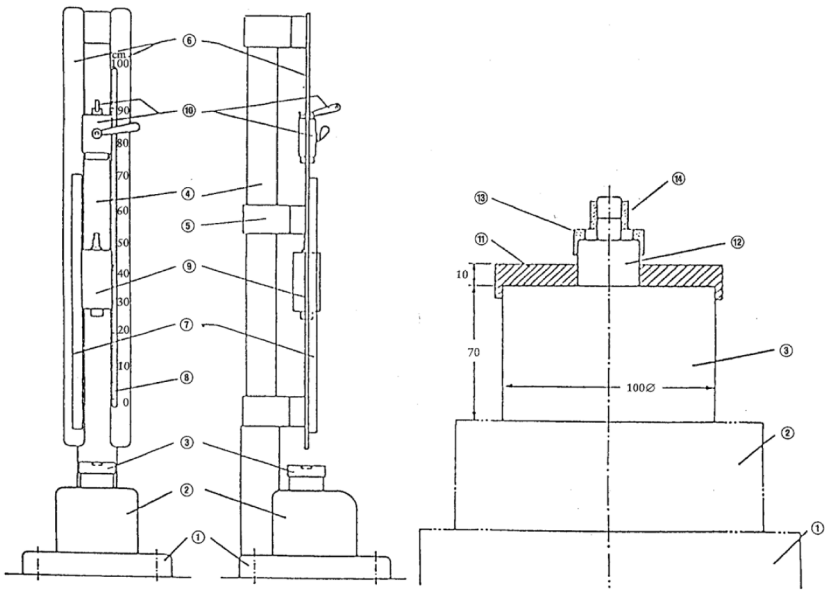
Lämpötila-aikakäyrä, joka on saatu kuumentamalla dibutyyliftalaattia (27 cm^3) suljetussa (1,5 mm:n mittauslaipalla varustetussa) putkessa käyttäen propaania ja virtausnopeutta 3,2 litraa minuutissa. Lämpötilan mittaukseen käytetään taipuisaa, ruostumattomasta teräksestä valmistettua kromi/alumiini-termoparia, jonka halkaisija on 1 mm ja joka on asetettu keskelle putkea 43 mmm etäisyydelle sen suusta. Alueella 135–285 ^oC kuumennusnopeuden on oltava välillä 185–215 K/min.

▼B

Kuva 4

Iskutestilaite

(kaikki mitat ovat millimetreinä)



Kuva 4a Pudotusvasara sivulta ja edestä, yleisnäkymä

(1) alusta 450 x 450 x 60
(2) teräskappale, 230 x 250 x 200
(3) alasin, 100 (halkaisija) x 70
(4) pylväs
(5) poikkikannatin
(6) 2 ohjainta
(7) hammastettu tanko

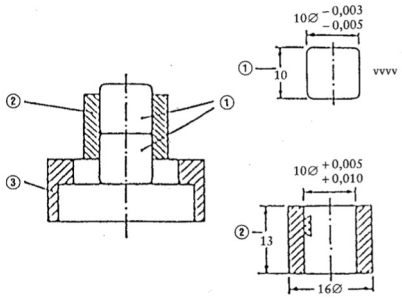
Kuva 4b Pudotusvasara, alaosa

(8) mitta-asteikko
(9) pudotusvasara (pudotusmassa)
(10) pito- ja irrotusosa
(11) kohdistuslaatta
(12) välialasin (vaihdettava), 26 halkaisija x 26
(13) aukoilla varustettu kohdistusrengas
(14) iskulaite

▼B

Kuva 4

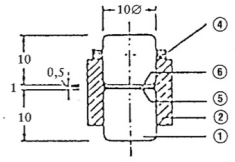
(Jatkuu)

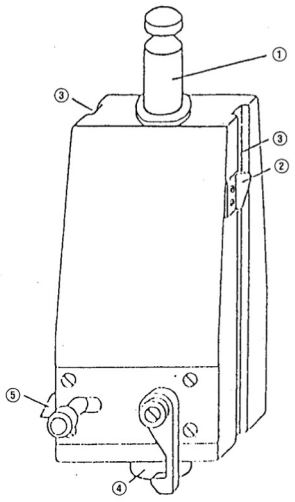


Kuva 4c Iskulaite jauhettuja tai pastamaisia aineita varten

Kuva 4d Iskulaite nestemäisiä aineita varten

1. terässylinterit
2. terässylintereiden ohjausrengas
3. aukoilla varustettu ohjausrengas
   (a) pystyleikkaus
   (b) pohjapiirros
4. kumirengas
5. nestemäinen aine (40 mm^3)
6. nesteetön tila





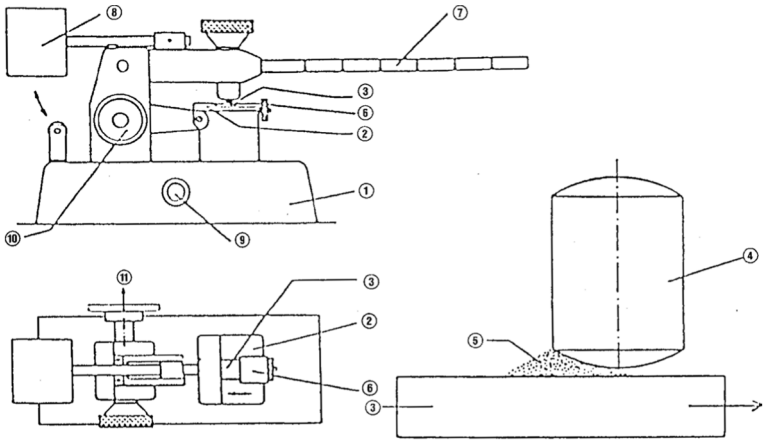
Kuva 4e Vasara (pudotusmassa: 5 kg)

1. jännitystappi
2. korkeusindikaatori
3. ohjausura
4. sylinterinmuotoinen iskupää
5. palautushaka

▼B

Kuva 5

Kitkaherkkyyslaite



Kuva 5a Kitkaherkkyyslaite, sivukuva ja pohjapiirros

1. teräsalusta
2. liikkuva vaunu
3. vaunulla oleva posliinilevy, 25 x 25 x 5 mm
4. kiinteä posliinitappi, 10 (halkaisija) x 15 mm
5. näyte, noin 10 mm^3

Kuva 5b Tapin alkuasento

6. tapinpidin
7. kuormitusvarsi
8. vastapaino
9. kytkin
10. pyörä, jolla vaunu asetetaan alkuasentoon
11. sähkömoottorin suunta

▼B

A.15 ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA (NESTEET JA KAASUT)

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tätä testiä ei pidä käyttää räjähdysaineiden ja itsestään ilmassa tai huoneenlämmössä syttyvien aineiden kohdalla. Testiä voidaan soveltaa kaasuihin, nesteisiin tai höyryihin, jotka kosketuksissa ilmaan voivat syttyä kuuman pinnan vaikutuksesta.

Itsesyttymislämpötila laskee huomattavasti katalyyttisten epäpuhtauksien, pinta-aineen tai testausastian suuremman tilavuuden vaikutuksesta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Itsesyttyvyysaste ilmaistaan itsesyttymislämpötilana. Itsesyttymislämpötila on alhaisin lämpötila, jossa näyte syttyy, kun se sekoitetaan ilmaan testimenetelmän määrittelemissä olosuhteissa.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineet mainitaan standardeissa (katso kohtaa 1.6.3). Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Menetelmällä määritetään suljetun astian sisäseinän alhaisin lämpötila, jossa astiaan ruiskutettu kaasu, höyry tai neste syttyy palamaan.

1.5 LAATUKRITEERIT

Toistettavuus vaihtelee itsesyttymislämpötila-alueiden ja käytetyn testimenetelmän mukaan.

Herkkyys ja spesifisyys vaihtelevat käytetyn testimenetelmän mukaan.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

Laite kuvataan kohdassa 1.6.3 mainituissa menetelmäkuvauksissa.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Näyte aineesta testataan kohdassa 1.6.3 mainitun menetelmäkuvauksen mukaan.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

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

▼B

2. **TIEDOT**

Pidetään kirjaa testilämpötilasta, ilmanpaineesta, käytetystä näytemäärästä ja syttymiseen kuluvasta ajasta.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tarkat tiedot (tunnistustiedot ja epäpuhtaudet),

— käytetty näytemäärä,

— ilmanpaine,

— käytetty laite,

— testitulokset (testilämpötilat, syttymistulokset ja viiveet),

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

4. **VIITTEET**

Viitteitä ei ole.

▼B

A.16 KIINTEIDEN AINEIDEN SUHTEELLINEN ITSESYTTYMISLÄMPÖTILA

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tätä testiä ei pidä käyttää räjähtävien aineiden ja itsestään ilmassa tai huoneenlämmössä syttyvien aineiden kohdalla. Testin avulla saadaan alustavaa tietoa kiinteiden aineiden itsesyttyvyydestä korkeissa lämpötiloissa.

Jos lämmön vapautuminen ympäristöön aineen reagoidessa hapen kanssa tai sen hajotessa eksotermisesti ei tapahdu tarpeeksi nopeasti, aineen kuumentaminen johtaa itsesyttymiseen. Näin ollen itsesyttyminen tapahtuu, kun lämmöntuotanto on nopeampaa kuin lämpöhäviö.

Testimenetelmä on käytännöllinen tapa saada alustavaa tietoa kiinteistä aineista. Koska kiinteiden aineiden syttyminen ja palaminen on monimutkainen tapahtuma, tällä menetelmällä määritettyjä itsesyttymislämpötiloja tulee käyttää vain vertailutarkoituksiin.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Tällä menetelmällä saatu itsesyttymislämpötila on alhaisin ympäristön lämpötila (^{o}C), jossa tunnettu tilavuus näyteainetta syttyy tunnetuissa olosuhteissa.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Tunnettu määrä näyteainetta pannaan huoneenlämpöiseen uuniin. Uunin lämpötila nostetaan 0,5 ^{o} C:n minuuttinopeudella arvoon 400 ^{o}C (tai sulamispisteeseen, jos tämä on alhaisempi), ja näytteen keskustan lämpötila kirjataan ajan funktiona. Tämän testin itsesyttymislämpötilaksi katsotaan se uunin lämpötila, jossa näytteen lämpötila on itsestään kuumenemisen seurauksena saavuttanut arvon 400 ^{o}C.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Laite**

1.6.1.1 *Uuni*

Uuni on termostaatilla varustettu laboratoriouuni (tilavuus noin 2 litraa), jossa on luonnollinen ilmanvaihto ja räjähdysventtiili. Räjähdysvaaran välttämiseksi hajoamiskaasuja ei saa päästää kosketuksiin sähkölämmityselementtien kanssa.

▼B

1.6.1.2 *Lankaverkkokuutio*

Ruostumattomasta teräslangasta valmistetusta verkosta (0,045 mm aukko) leikataan kuvan 1 mukainen kuvio. Verkko taivutetaan ylhäältä avoimeksi kuutioksi ja kiinnitetään teräslangalla.

1.6.1.3 *Termoparit*

Käytetään sopivia termopareja.

1.6.1.4 *Rekisteröintilaite*

Mikä tahansa kaksikanavainen rekisteröintilaite, joka on kalibroitu 0–600 °C:lle tai vastaavalle jännitteelle.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

Aineet testataan vastaanotetussa muodossa.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Verkkokuutioon pannaan näyteainetta, naputetaan kevyesti, ja lisätään ainetta, kunnes kuutio täyttyy. Tämän jälkeen kuutio ripustetaan huoneenlämpöisen uunin keskelle. Toinen termopari pannaan kuution keskustaan ja toinen kuution ja uunin seinän väliin mittaamaan uunin lämpötilaa.

Uunin lämpötila nostetaan 400 °C:seen (tai sulamispisteeseen, jos tämä on alhaisempi) 0,5 °C:n minuuttinopeudella. Uunin ja näytteen lämpötilaa rekisteröidään koko kuumennuksen ajan.

Kun aine syttyy, näytteessä olevan termoparin lämpötila nousee erittäin jyrkästi yli uunin lämpötilan.

2. **TIEDOT**

Arviointia varten käytetään sitä uunin lämpötilaa, jossa näytteen lämpötila on noussut 400 °C:seen itsesyttymisen vaikutuksesta (katso kuvaa 2).

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tiedot,

— mittaustulokset lämpötila-aikakäyrineen,

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta.

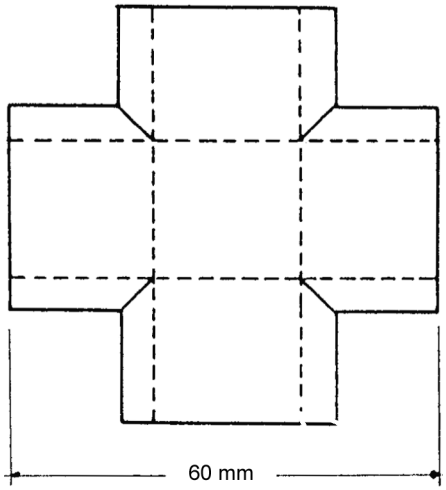
4. **VIITTEET**

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

▼B

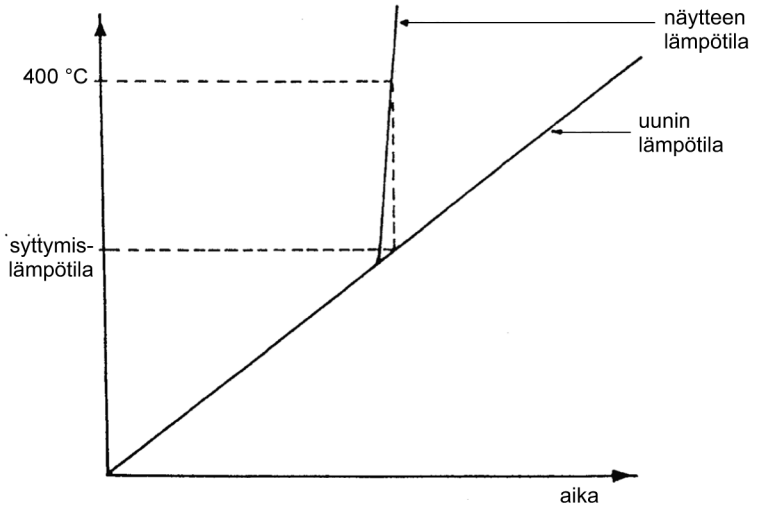
Kuva 1

20 mm:n näytekuution kaava



Kuva 2

Tyypillinen lämpötila-aikakäyrä



▼B

A.17 HAPETTAVAT OMINAISUUDET (KIINTEÄT AINEET)

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Ennen testiä on suositeltavaa hankkia alustavia tietoja aineen mahdollisista räjähdysominaisuuksista.

Menetelmää ei voi käyttää nesteiden, kaasujen, räjähdysalttiiden tai herkästi syttyvien aineiden tai orgaanisten peroksidien testaukseen.

Testiä ei tarvitse suorittaa, jos aineen rakennekaavasta voidaan täysin varmasti päätellä, että aine ei voi reagoida eksotermisesti syttyvien aineiden kanssa.

Alustavan testin avulla selvitetään, onko varsinaisessa testissä noudatettava erityistä varovaisuutta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Palamisaika sekunteina on se aika, jossa reaktiovyöhyke kulkee keon läpi, kun käytetään kohdassa 1.6 kuvattua menetelmää.

Palamisnopeus ilmaistaan millimetreinä sekunnissa.

Suurin palamisnopeus on se palamisnopeuden suurin arvo, joka saadaan kun ainetta sekoitetaan hapettimeen eri pitoisuuksina (10–90 painoprosenttia hapetinta).

1.3 VERTAILUAINEET

Analyyttisen puhdasta bariumnitraattia voidaan käyttää testin ja alustavan testin vertailuaineena.

Vertailuseoksena käytetään sitä kohdan 1.6 mukaan valmistettua bariumnitraatin ja jauhetun selluloosan seosta, jolla on suurin palamisnopeus (yleensä seos. jossa on 60 painoprosettia bariumnitraattia).

1.4 MENETELMÄN PERIAATE

Turvallisuussyistä tehdään alustava testi. Jos alustavasta testistä selvästi ilmenee, että aineella on hapettavia ominaisuuksia, testiä ei tarvitse jatkaa. Muussa tapauksessa aine testataan kattavan testiohjelman mukaan.

Kattavassa testissä testattavaa ainetta ja määritettyä syttyvää ainetta sekoitetaan eri suhteissa. Jokaisesta seoksesta valmistetaan pitkänomainen keko, joka sytytetään toisesta päästä. Suurinta palamisnopeutta verrataan vertailuseoksen suurimpaan palamisnopeuteen.

1.5 LAATUKRITEERIT

Tarvittaessa voidaan käyttää mitä tahansa jauhamis- ja sekoitusmenetelmää, edellyttäen, että kuudesta erillisestä testistä saadut suurimmat palamisnopeudet poikkeavat aritmeettisesta keskiarvosta enintään 10 %.

▼B

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelutoimet**

1.6.1.1 *Näyte*

Näytteen hiukkaskoko pienennetään alle 0,125 mm:iin seuraavasti: näyte seulotaan, jäännös jauhetaan ja seulonta toistetaan. Tätä jatketaan, kunnes koko näytemäärä on läpäissyt seulan.

Jauhamiseen ja seulontaan voidaan käyttää mitä tahansa laatukriteerit täyttävää menetelmää.

Ennen seoksen valmistelua näytettä kuivataan 105 °C:ssa, kunnes paino vakiintuu. Jos testattavan aineen hajoamislämpötila on alle 105 °C, kuivaus on tehtävä sopivassa, alhaisemmassa lämpötilassa.

1.6.1.2 *Syttyvä aine*

Syttyvänä aineena käytetään jauhettua selluloosaa. Selluloosan on oltava ohutkerroskromatografiaan tai pylväskromatografiaan tarkoitettua tyyppiä. Selluloosatyyppi, jossa yli 85 % kuiduista on pituudeltaan 0,020–0,075 mm, on osoittautunut sopivaksi. Selluloosajauhe seulotaan 0,125 mm:n silmäkoon läpi. Testiin on käytettävä saman erän selluloosaa.

Jauhettua selluloosaa kuivataan ennen seoksen valmistelua 105 °C:ssa, kunnes paino vakiintuu.

Jos alustavaan testiin käytetään puujauhoa, vaimistetaan havupuujauhe keräämällä talteen 1,6 mm:n seulan läpäissyt osa. Jauhe sekoitetaan huolellisesti ja sitä kuivataan 105 °C:ssa neljä tuntia enintään 25 mm:n paksuisena kerroksena. Kuivauksen jälkeen puujauhe jäähdytetään ja pannaan ilmatiiviiseen säiliöön, joka pakataan mahdollisimman täyteen. Jauhe tulisi käyttää 24 tunnin kuluessa kuivauksesta.

1.6.1.3 *Sytytyslähde*

Sytytyslähteenä käytetään kaasupolttimen kuumaa liekkiä (minimihalkaisija 5 mm). Jos käytetään toista sytytyslähdettä (esimerkiksi kun testi tapahtuu inertissä ilmakehässä), on annettava tilanteen kuvaus ja perustelu.

1.6.2 **Testin suorittaminen**

Huomaulus:

Hapettimien ja selluloosan tai puujauheen seoksia on pidettävä räjähdysvaarallisina ja niitä on käsiteltävä varoen.

1.6.2.1 *Alustava testi*

Kuivattua näytettä ja kuivattua selluloosaa tai puujauhetta sekoitetaan huolella suhteessa 2 paino-osaa näytettä ja 1 paino-osa selluloosaa tai puujauhetta. Seos muotoillaan pieneksi kartionmuotoiseksi keoksi, jonka pohjan halkaisija on 3,5 cm ja korkeus 2,5 cm. Keko tehdään täyttämällä (ilman tiivistämistä) kartionmuotoinen muotti (esimerkiksi lasisuppilo, jonka varsi on suljettu).

▼B

Keko asetetaan kylmälle, palamattomalle ja ei-huokoiselle aluslevylle, jonka lämmönjohtavuus on heikko. Testi on suoritettava vetokaapissa (katso 1.6.2.2).

Kartiota kosketetaan sytytystähteellä. Sytytystä seuraavan reaktion voimakkuutta ja kestoa tarkkaillaan ja tulos kirjataan.

Jos reaktio on voimakas, ainetta pidetään hapettavana.

Jos tuloksen suhteen on epäilyjä, on tarpeen tehdä jäljempänä kuvattu kattava testi.

1.6.2.2 *Sarjatesti*

Valmistetaan hapettimen ja selluloosan seoksia, joissa hapettimen painoprosentti on 10–90 ja vaihteluväli 10 %. Rajatapauksissa on valmistettava seoksia, joilla on pienemmät vaihteluvälit, jotta suurin palamisnopeus voitaisiin määrittää mahdollisimman tarkasti.

Keko muotoillaan muotin avulla. Metallista valmistetun muotin pituus on 250 mm. Muotin kolmionmuotoisen läpileikkauksen sisäkorkeus on 10 mm ja leveys 20 mm. Muotin pituussuunnassa on molemmille sivuille kiinnitetty kaksi metallilevyä siten, että levyjen yläreuna on 2 mm muotin reunan yläpuolella (katso kuvaa). Lisätään seosta kevyelti hiukan muotin reunojen yli. Muotti pudotetaan kerran 2 cm korkeudelta kiinteälle pinnalle. Ylimääräinen aines kaavitaan pois, sivulevyt poistetaan ja muottiin jäävä aines tasoitetaan rullalla. Muotille asetetaan palamaton, ei-huokoisesta ja lämpöä heikosti johtavasta aineesta valmistettu aluslevy, laite käännetään ja muotti poistetaan.

Aseta näyte vetokaappiin.

Veto on säädettävä sellaiseksi, ettei savua pääse laboratoriotiloihin. Vedon voimakkuus ei saa vaihdella testin aikana. Laitteen ympärille pystytetään suojaseinä vetoa vastaan.

Koska selluloosa ja eräät testattavat aineet ovat hygroskooppisia, testi on suoritettava mahdollisimman nopeasti.

Keon toinen pää sytytetään koskettamalla sitä liekillä.

Kun reaktiovyöhyke on edennyt 30 mm, mitataan aika, joka kuluu seuraavan 200 mm:n etenemiseen.

Testi tehdään vertailuaineella ja vähintään kerran näyte-selluloosaseosarjan jokaisella osalla.

Jos todetaan, että näyteseoksen palamisnopeus on huomattavasti suurempi kuin vertailuseoksen palamisnopeus, testi voidaan keskeyttää. Muussa tapauksessa testi toistetaan viisi kertaa kolmelle nopeimmin palavalle seokselle.

▼B

Jos epäillään, että positiivinen tulos on virheellinen, testi toistetaan käyttäen selluloosan sijasta inerttiä ainetta, jolla on sama hiukkaskoko (esimerkiksi piimaata). Vaihtoehtoisesti nopeimmin palava näyte-selluloosaseos voidaan testata uudelleen inertissä ilmakehässä (< 2 tilavuusprosenttia happea).

2. **TIEDOT**

Turvallisuussyistä suurinta palamisnopeutta — ei keskiarvoa — pidetään näyteaineen tunnusomaisena hapettavana ominaisuutena.

Arviointia varten käytetään kuuden kokeen sarjan suurinta palamisnopeutta.

Laaditaan käyrä, johon jokaista seosta kohden merkitään suurin palamisnopeus hapettimen pitoisuuden funktiona. Tältä käyrältä luetaan suurin palamisnopeus.

Testattaessa suurimman palamisnopeuden omaava seos, testisarjan kuusi palamisnopeuden arvoa saavat poiketa aritmeettisesta keskiarvosta enintään 10 %. Muussa tapauksessa jauhamis- ja sekoitusmenetelmiä on parannettava.

Suurinta saatua palamisnopeutta verrataan vertailuseoksen palamisnopeuteen (katso 1.3).

Jos testit tehdään inertissä ilmakehässä, suurinta saatua reaktionopeutta verrataan inertissä ilmakehässä testatun vertailuaineen tulokseen.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— näyteaineen tunnistetiedot, koostumus, puhtausaste, kosteuspitoisuus jne.,

— näyteaineen mahdolliset käsittelyt (esimerkiksi jauhaminen ja kuivaus),

— testeissä käytetty sytytyslähde,

— mittaustulokset,

— havaitun reaktion luonne (esimerkiksi liekki näytteen pinnalla, palaminen koko massan läpi, tiedot palamistuotteista,...),

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulkinnan kannalta mukaan lukien kuvaus reaktion voimakkuudesta (liekit, kipinät, savunmuodostus, kyteminen, jne.) ja likimääräinen kesto alustavan testin yhteydessä sekä näytteen että vertailuaineen osalta,

— tulokset inertin aineen testauksesta, jos tuloksia on käytettävissä,

— inertissä ilmakehässä tehtyjen testien tulokset, jos tuloksia on käytettävissä.

▼B

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Aineen katsotaan olevan hapettava seuraavissa tapauksissa:

a) jos alustavassa testissä tapahtuu voimakas reaktio;

b) jos seosten palamisnopeus kattavassa testissä on vähintään yhtä suuri kuin selluloosasta ja bariumnitraatista valmistetun vertailuseoksen suurin palamisnopeus.

Väärän positiivisen tuloksen välttämiseksi tulosten tulkinnassa on otettava huomioon myös tulokset, jotka on saatu testattaessa näytteen ja inertin aineen seosta tai suoritettaessa testiä inertissä ilmakehässä.

4. **VIITTEET**

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

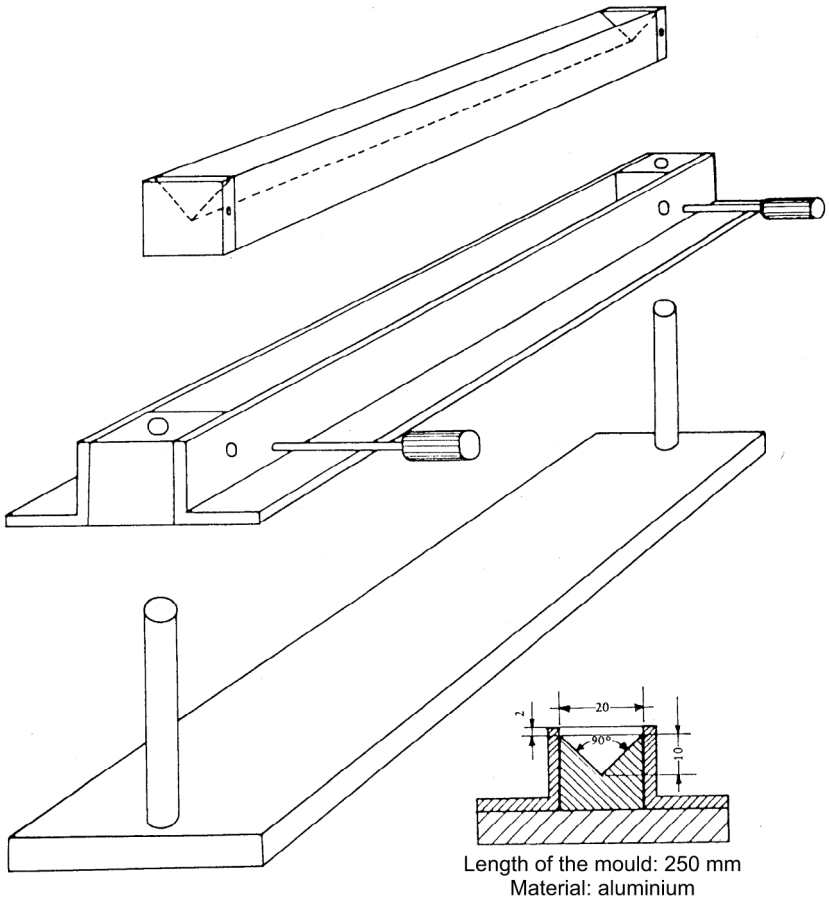
▼B

Liite

Kuva

Muotti ja tarvikkeet näytteen valmistelua varten

(Kaikki mitat ovat millimetreinä)



▼B

A.18. POLYMEERIEN LUKUKESKIMÄÄRÄINEN MOLEKYYLIPAINO JA MOLEKYYLIPAINOJAKAUMA

1. MENETELMÄ

Tämä geelipermeaatiokromatografiamenetelmä (GPC) on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 118 (1996). Menetelmän periaatteet ja teknisiä lisätietoja on viitteessä 1.

1.1 JOHDANTO

Koska polymeerien ominaisuudet ovat hyvin vaihtelevia, on mahdotonta antaa yhtä ainoaa menetelmää ja täsmällisiä erotus- ja arviointiohjeita, jotka sopisivat kaikkiin polymeerien erotuksessa mahdollisesti esiintyviin tapauksiin. Erityisesti monimutkaisia polymeeriseoksia voi olla mahdoton erottaa geelipermeaatiomenetelmällä. Jos GPO:tä ei voi käyttää, voidaan molekyylipaino määrittää muilla tavoilla (katso liite). Tällaisissa tapauksissa on käytetystä menetelmästä annettava yksityiskohtaiset tiedot ja perustelut on esitettävä.

Jäljempänä esitettävä menetelmä perustuu DIN-standardiin 55672 (1). Yksityiskohtaiset ohjeet kokeiden suorittamiseksi ja tulosten arvioimiseksi annetaan kyseisessä DIN-standardissa. Jos koeolosuhteita täytyy muuttaa, on muutokset perusteltava. Muita standardeja saa käyttää, jos niistä annetaan täydelliset viitteet. Tässä menetelmässä käytetään kalibrointiin polystyreeninäytteitä, johon sisältyvien polymeerien koot tunnetaan, ja menetelmää voi joutua muuttamaan, jotta sitä voitaisiin käyttää tietyille polymeereille, esim. vesiliukoisille ja pitkäketjuisille haaraantuville polymeereille.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Lukukeskimääräinen molekyylipaino M ja painokeskimääräinen molekyylipaino M_w määritetään seuraavilla yhtälöillä:

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

joissa

H_i on detektorisignaalin korkeus perustasosta retentiotilavuudelle V_i,

M_i on retentiotilavuutta V_i vastaava polymeerifraktion molekyylipaino ja

n on mittauspisteiden lukumäärä.

Molekyylipainojakauman leveys, joka kuvastaa seoksen dispersiivisyyttä, saadaan suhteesta M_w/M_n.

▼B

1.3 VERTAILUAINEET

Koska GPC on suhteellinen menetelmä, on tehtävä kalibrointi. Tähän käytetään tavallisesti kokojakaumaltaan kapeita lineaarisia polystyreenistandardeja, joiden keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w sekä molekyylipainojakauma tunnetaan. Kalibrointikäyrää voidaan käyttää tuntemattoman näytteen molekyylipainon määritykseen vain, jos näytteen ja standardin erotusolosuhteet on valittu samalla tavalla.

Molekyylipainon ja eluutiotilavuuden suhde on validi ainoastaan tietyn kokeen tietyissä koeolosuhteissa. Tärkeitä tekijöitä ovat ennen kaikkea lämpötila, liuotin (tai liuotinseos), kromatografiajärjestely sekä erotuspylväs tai pylväsjärjestelmä.

Tällä tavoin määritetyt näytteen molekyylipainot ovat suhteellisia arvoja ja niistä käytetään nimitystä ”polystyreeniekvivalenttimolekyylipaino”. Tämä tarkoittaa sitä, että riippuen näytteen ja standardien rakenne-eroista ja kemiallisista eroista molekyylipainot voivat poiketa absoluuttisista arvoista enemmän tai vähemmän. Jos käytetään muita standardeja, esim. polyetyleeniglykolia, polyetyleemoksidia, polymetyylimetakrylaattia tai polyakryylihappoa, on syy ilmoitettava.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Sekä näytteen molekyylipainojakauma että keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w voidaan määrittää GPC:llä. GPC on erityinen nestekromatografian laji, jossa näytteen erottaminen perustuu seoksen yksittäisten aineiden hydrodynaamisiin tilavuuksiin (2).

Erottuminen tapahtuu, kun näyte kulkee huokoisella aineella, tyypillisesti orgaanisella geelillä täytetyn pylvään läpi. Pienet molekyylit tunkeutuvat huokosiin, kun taas suuret molekyylit jäävät huokosten ulkopuolelle. Isojen molekyylien kulkema tie on siten lyhyempi, ja ne tulevat ensimmäisenä ulos pylväästä. Keskikokoiset molekyylit tunkeutuvat joihinkin huokosiin ja eluoituvat myöhemmin. Pienimmät molekyylit, joiden keskimääräinen hydrodynaaminen säde on pienempi kuin geelin huokoset, voivat tunkeutua kaikkiin huokosiin. Ne eluoituvat viimeisinä.

Ihanteellisessa tilanteessa erottumiseen vaikuttaa ainoastaan molekyylilajin koko, mutta käytännössä on vaikea välttää ainakin jonkin verran adsorptiosta aiheutuvaa haittaa. Epätasaisesti pakattu pylväs ja kuolleet tilavuudet voivat pahentaa tilannetta (2).

Detektorina käytetään esim. taitekerroin- tai UV-detektoria, ja tuloksena saadaan yksinkertainen jakaumakäyrä. Jotta käyrästä voidaan lukea oikeita molekyylipainoja, on pylväs kalibroitava molekyylipainoltaan tunnetuilla polymeereillä, joilla on mieluiten suunnilleen samanlainen rakenne, esim. erilaiset polystyreenistandardit. Tuloksena on tyypillisesti Gaussin käyrä, joka on joskus vääristynyt siten, että pienen molekyylipainon puolella on ”häntä”; pystysuoralla akselilla on eluoitujen molekyylilajien määrät painomitoissa ja vaaka-akselilla molekyylipainon logaritmi.

▼B

1.5 LAATUKRITEERIT

Eluutiotilavuuden toistettavuuden (keskihajonnan keskivirhe: RSD) olisi oltava parempi kuin 0,3 %. Määrityksen vaadittu toistettavuus on varmistettava sisäistä standardia käyttämällä, jos kromatogrammin arviointi on aikariippuvainen eikä täytä edellä mainittuja kriteerejä (1). Polydispersiivisyys riippuu standardien molekyylipainoista. Polystyreenistandardien osalta tyypillisiä arvoja ovat:

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

(M_p on standardin molekyylipaino piikin maksimissa)

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Polystyreenistandardiliuosten valmistus**

Polystyreenistandardit liuotetaan sekoittamalla huolellisesti haluttuun eluointiliuokseen. Valmistajan ohjeet on otettava huomioon liuosten valmistuksessa.

Valittujen standardien pitoisuudet riippuvat eri tekijöistä, esim. injektiotilavuudesta, liuoksen viskositeetistä ja detektorin herkkyydestä. Suurin injektiotilavuus on sovitettava pylvään pituuden mukaan, ettei pylvästä kuormiteta liikaa. Tyypilliset injektiotilavuudet käytettäessä GPC:tä analyyttisiin erotuksiin pylväässä, jonka koko on 30 cm x 7,8 mm, ovat tavallisesti 40–100 µl. Suuremmat tilavuudet ovat mahdollisia, mutta eivät saisi olla enemmän kuin 250 µl. Injektiotilavuuden ja aineen pitoisuuden paras suhde on määritettävä ennen pylvään varsinaista kalibrointia.

1.6.2 **Näyteliuoksen valmistus**

Periaatteessa samat vaatimukset koskevat näyteliuosten valmistamista. Näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen (esim tetrahydrofuraaniin (THF)) ravistamalla huolellisesti. Sitä ei saa missään tapauksessa liuottaa ultraäänihauteessa. Tarpeen vaatiessa näyte puhdistetaan suodattamalla kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2–2 µm.

Jos näytteessä on liukenemattomia hiukkasia, on tämä kirjattava loppuraporttiin, koska se saattaa johtua suurikokoisista molekyyleistä. Liukenemattomien hiukkasten painoprosenttiosuus on määritettävä jollakin sopivalla menetelmällä. Liuokset on käytettävä vuorokauden sisällä.

1.6.3 **Laitteisto**

— liuotinsäiliö

— kaasunpoistolaite (tarvittaessa)

— pumppu

▼B

— pulssinvaimennin (tarvittaessa)

— injektiojärjestelmä

— kromatografiapylväät

— ilmaisin (detektori)

— virtausmittari (tarvittaessa)

— tulosten tallennus/prosessointilaite

— jäteastia

On varmistettava, että GPC-laitteisto ei reagoi käytettävien liuottimien kanssa (esim. THF:n kanssa on käytettävä teräskapillaareja).

1.6.4 **Injektiojärjestelmä ja liuottimen annostelujärjestelmä**

Määrätty näytetilavuus syötetään pylvääseen joko automaattisella näytteensyöttölaitteella tai käsin tarkasti määriteltyyn vyöhykkeeseen, jos ruiskun mäntää vedetään tai työnnetään liian nopeasti, se voi aiheuttaa muutoksia havaitussa molekyylipainojakaumassa. Liuotinta pumppaavien pumppujen olisi oltava mahdollisimman tasaisia ja niissä saisi mieluiten olla pulssinvaimennin. Virtausnopeuden pitäisi olla noin 1 ml/min.

1.6.5 **Pylväs**

Näytteestä riippuen polymeerin ominaisuudet määritetään käyttäen joko yhtä pylvästä tai useita peräkkäin kytkettyjä pylväitä. Kaupallisesti on saatavilla lukuisia pylväsmateriaaleja, joiden ominaisuudet on määritelty (esim. huokoskoko, ekskluusiorajat). Erotusgeelin ja pylvään pituuden valinta riippuu sekä näytteen ominaisuuksista (hydrodynaamiset tilavuudet, molekyylipainojakauma) että erotuksen erityisvaatimuksista kuten liuottimesta, lämpötilasta ja virtausnopeudesta (1) (2) (3).

1.6.6 **Teoreettiset levyt**

Käytettävästä pylväästä tai pylväsyhdistelmästä on tiedettävä teoreettisten levyjen lukumäärä. Tätä varten syötetään pituudeltaan tunnettuun pylvääsen — jos THF on eluutioliuotin — etyylibentseeniliuosta tai muuta sopivaa ei-polaarista liuotinta. Teoreettisten levyjen lukumäärä saadaan seuraavasta yhtälöstä:

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

jossa

N on teoreettisten levyjen lukumäärä

V_e on eluutiotilavuus piikin maksimin kohdalla

▼B

W on piikin leveys perusviivalla

$W_{1/2}$ on piikin leveys piikin korkeuden puolivälissä.

1.6.7 **Erotusteho**

Teoreettisten levyjen lukumäärän lisäksi, joka on vyöhykkeen leveyden määräävä suure, myös erotusteholla on osansa. Erotustehon määrää kalibraatiokäyrän jyrkkyys. Pylvään erotusteho saadaan seuraavasta yhtälöstä:

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

jossa

$V_{e,\ Mx}$ = on sellaisen polystyreenin, jonka molekyylipaino on M_x, eluutiotilavuus

$V_{e,(10Mx)}$ = on molekyylipainoltaan kymmenen kertaa suuremman polystyreenin eluutiotilavuus.

Järjestelmän erotuskyky määritellään yleensä seuraavasti:

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

jossa

V_{el}, V_{e2} = ovat kahden polystyreenistandardin eluutiotilavuudet piikin maksimissa

W_1, W_2 = ovat piikin leveydet perusviivalla

M_l, M_2 = ovat molekyylipainot piikin maksimissa (niiden ero pitäisi olla vähintään 10-kertainen).

Pylvään R-arvon olisi oltava suurempi kuin 1,7 (4).

1.6.8 **Liuottimet**

Kaikkien liuottimien on oltava korkeaa puhtauslaatua (THF:n puhtaus 99,5 %). Liuotinastian (tarvittaessa inertissä kaasussa) on oltava riittävän iso pylvään kalibroimiseen ja useiden näytteiden määrittämiseen. Liuottimesta on poistettava kaasut ennen kuin sitä pumpataan pylvääseen.

1.6.9 **Lämpötilansäätö**

Tärkeiden laitteiston sisäisten osien (injektiosilmukka, pylväät, detektori ja letkut/putket) lämpötilan olisi oltava vakaa ja valitulle liuottimelle sopiva.

▼B

1.6.10 **Detektori**

Detektorin tarkoitus on mitata pylväästä tulevan näytteen pitoisuus. Jotta piikit eivät leviäisi tarpeettomasti, on detektorin mittauskyvetin tilavuuden oltava mahdollisimman pieni. Se ei saisi olla suurempi kuin 10 µl paitsi valon sirontaa tai viskositeettia mittaavilla detektoreilla. Detektorina käytetään tavallisesti differentiaalirefraktometriä. Muitakin detektoreja, esim. UV/VIS-, IR- ja viskositeettidetektoreja voidaan käyttää, mikäli näytteen tai eluutioliuottimen erityiset ominaisuudet edellyttävät sitä.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Yksityiskohtaisten arviointiperusteiden samoin kuin määritystulosten keräämisen ja käsittelyn osalta on noudatettava DIN-standardin (1) määrityksiä.

Kustakin näytteestä tehdään kaksi erillistä koetta, jotka on analysoitava erikseen.

M_n, M_w, M_w/M_n ja M_p on ilmoitettava jokaisesta mittauksesta. On ilmoitettava selvästi, että mitatut arvot ovat suhteellisia arvoja, jotka ovat suhteessa käytettyjen standardien molekyylipainoihin.

Kun retentiotilavuudet tai retentioajat (mahdollisesti korjattuina sisäisten standardien suhteen) on määritetty, esitetään log M -arvot (M on kalibrointistandardin piikin korkein kohta) jonkin edellä mainitun suureen funktiona. Kutakin molekyylipainon kymmentä potenssia kohti tarvitaan vähintään kaksi kalibrointipistettä ja koko käyrällä on oltava vähintään viisi mittauspistettä, joiden pitäisi kattaa näytteen arvioitu molekyylipainoalue. Kalibrointikäyrän loppupiste pienen molekyylipainon päässä määritetään n-heksyylibentseenin tai jonkin muun sopivan ei-polaarisen liuottimen avulla M_n ja M_w määritetään tavallisesti tietokoneella osastossa 1.2 esitettyjen kaavojen perusteella. Jos käytetään manuaalista digitointia, voidaan ohjeeksi katsoa menetelmää ASTM D 3536-91 (3).

Jakaumakäyrä on esitettävä taulukon tai kuvan muodossa (differentiaalinen taajuus tai summaprosenttiosuudet log M:n funktiona). Graafisessa esityksessä yksi molekyylipainon kymmenen potenssi pitäisi olla tavallisesti noin 4 cm leveä ja piikin maksimin pitäisi olla noin 8 cm korkea. Koko jakaumakäyrän osalta y-akselin korkeuden 0 ja 100 %:n välillä olisi oltava noin 10 cm.

2.2 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat asiat:

2.2.1 **Testattava aine**

— saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet);

▼B

— näytteen käsittelyn kuvaus, mahdolliset huomiot ja ongelmat.

2.2.2 **Laitteisto**

— eluenttisäiliö, inertti kaasu, kaasun poisto eluentista, eluentin koostumus, epäpuhtaudet,

— pumppu, pulssinvaimennin, injektiojärjestelmä,

— erotuspylväät (valmistaja, kaikki tiedot pylväiden ominaisuuksista kuten huokoskoko, erotusmateriaalin tyyppi jne., käytettävien pylväiden lukumäärä, pituus ja järjestys),

— pylvään (tai pylväsyhdistelmän) teoreettisten levyjen lukumäärä, erotusteho (järjestelmän erotuskyky),

— piikkien symmetriaa koskevat tiedot,

— pylvään lämpötila, lämpötilan säätötapa,

— detektori (mittausperiaate, tyyppi, kyvetin tilavuus),

— mahdollinen virtausmittari (valmistaja, mittausperiaate),

— mittaustulosten tallennus- ja käsittelyjärjestelmä (laitteet ja ohjelmat).

2.2.3 **Järjestelmän kalibrointi**

— kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyn menetelmän tarkka kuvaus

— tiedot menetelmän laatukriteereistä (esim. korrelaatiokerroin, jäännösneliösumma jne.)

— tiedot kaikista kokeen aikana sekä tulosten arvioinnissa ja käsittelyssä suoritetuista ekstrapolaatioista, oletuksista ja aproksimaatioista,

— kaikki kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyt mittaukset on esitettävä taulukossa, jossa esitetään myös seuraavat tiedot kustakin kalibrointipisteestä:

  — näytteen nimi,

  — aineen valmistaja,

  — valmistajan ilmoittamat tai mittauksista johdetut standardien M_p, M_n, M_w ja M_w/M_n ominaisarvot sekä tarkat tiedot niiden määritysmenetelmästä,

  — injektiotilavuus ja injektoitavan liuoksen pitoisuus,

▼B

— kalibrointiin käytetty M_p-arvo

— eluutiotilavuus tai piikin maksimissa mitattu korjattu retentioaika,

— piikin maksimissa laskettu M_p

— laskemalla saadun M_p:n ja kalibrointiarvon prosenttivaihe.

2.2.4 **Arviointi**

— aikaperusteinen arviointi: toistettavuuden varmistamiseen käytetyt menetelmät (korjausmenetelmä, sisäinen standardi jne.),

— suoritetaanko arviointi eluutiotilavuuden vai retentioajan perusteella,

— tiedot arvion rajoituksista, jos piikkiä ei analysoida täydellisesti,

— mahdollisten tasoitusmenetelmien kuvaus,

— näytteen valmistus ja esikäsittely,

— mahdolliset liukenemattomat hiukkaset,

— injektiotilavuus (µl) ja injektoitavan näytteen pitoisuus (mg/ml),

— huomiot seikoista, joista aiheutuu poikkeamista ihanteellisesta GPC-käyttäytymisestä,

— tarkka kuvaus kaikista testausmeneteimien muutoksista,

— virherajoja koskevat yksityiskohtaiset tiedot,

— kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomiot.

3. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Liite

Esimerkkejä muista menetelmistä polymeerien lukukeskimääräisen molekyylipainon (M_n) määrittämiseksi

Geelipermeaatiokromatografia (GPC) on paras menetelmä M_n:n määrittämiseksi, erityisesti, jos on käytettävissä sarja standardeja, joiden rakenne vastaa polymeerin rakennetta. Jos kuitenkin GPC:n käytössä on käytännön hankaluuksia tai on odotettavissa, että aine ei täytä säädettyä M-kriteeriä (joka on varmistettava), voidaan käyttää muita menetelmiä, kuten

1. **Kolligatiivisten ominaisuuksien käyttö**

1.1 Ebullioskopia/kryoskopia

Tässä mitataan kiehumispisteen ylenemä (ebullioskopia) tai jäätymispisteen alenema (kryoskopia), kun liuokseen lisätään tutkittavaa polymeeriä. Menetelmä perustuu siihen, että liuenneen polymeerin vaikutus nesteen kiehumis/jäätymispisteeseen riippuu polymeerin molekyylipainosta (1) (2).

Soveltamisala: $M_n < 20\,000$.

1.2 Höyrynpaineen aleneminen

Tässä mitataan valitun vertailuaineen höyrynpaine ennen ja jälkeen, kun on lisätty tunnettu määrä polymeeriä (1) (2).

Soveltamisala: $M_{ri} < 20\,000$ (teoreettisesti; käytännössä tästä menetelmästä on vähän hyötyä).

1.3 Kalvo-osmometria

Tämä menetelmä perustuu osmoosiin, ts. liuotinmolekyylien luonnolliseen taipumukseen diffundoitua puoliläpäisevän kalvon läpi laimeasta väkevään liuokseen päin tasapainon saavuttamiseksi. Testin laimeassa liuoksessa ei ole lainkaan polymeeriä, ja väkevä liuos sisältää polymeeriä. Kun liuos menee kalvon läpi, muodostuu paine-ero, joka riippuu polymeerin konsentraatiosta ja molekyylipainosta (1) (3) (4).

Solveltamisala: $M_n < 20\,000$–$200\,000$.

1.4 Höyryfaasiosmometria

Tässä menetelmässä verrataan puhtaan liuotinaerosolin haihtumisnopeutta vähintään kolmeen aerosoliin, joissa polymeerin pitoisuus vaihtelee (1) (5) (6).

Soveltamisala: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Pääteryhmäanalyysi**

Jotta tätä menetelmää voitaisiin käyttää, on tunnettava sekä polymeerin koko rakenne että ketjujen päissä olevien ryhmien laatu (joka pitää voida olla erotettavissa päärakenteesta esim. NMR:llä tai titraamalla/derivatisoimalla). Kun määritetään polymeerissä olevien pääteryhmien molekulaarinen konsentraatio, voidaan johtaa arvo molekyylipainolle (7) (8) (9).

Soveltamisala: M_n korkeintaan 50 000 (luotettavuus vähenee molekyylipainon noustessa).

Kirjallisuusviitteet

(1) Billmeyer, F.W. Jr, (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn, John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed, Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25–52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E, Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139–2146.

▼B

A.19. **PIENIMOLEKYYLISTEN AINEIDEN PITOISUUS POLYMEERISSÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä geelipermeaatiokromatografiamenetelmä on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 119 (1996). Perusperiaatteet ja teknisiä lisätietoja saa kirjallisuusviitteistä.

1.1 JOHDANTO

Koska polymeerien ominaisuudet vaihtelevat suuresti, on mahdotonta kuvata yhtä ainoaa menetelmää, jossa selitettäisiin täsmällisesti kaikki polymeerien erotuksessa mahdollisesti esiintyvät erityiset seikat kattavat erotus- ja analysointiedellytykset. Erityisesti kompleksiset polymeerijärjestelmät eivät useinkaan sovi geelipermeaatiokromatografiaan. Kun GPC:tä ei voida käyttää, molekyylipaino voidaan määrittää muilla menetelmillä (katso Liite). Tällöin on esitettävä käytettyä menetelmää koskevat yksityiskohdat ja perustelut.

Seuraavassa kuvattava menetelmä perustuu DIN-standardiin 55672 (1). Tässä standardissa esitetään yksityiskohtaisesti, miten kokeet suoritetaan ja tulokset arvioidaan. Jos koeolosuhteita täytyy muuttaa, on muutokset perusteltava. Muita standardeja voi käyttää, jos niistä annetaan täydelliset viitteet. Tässä kuvattavassa menetelmässä käytetään tunnetun polydispersiivisyyden omaavia polystyreeninäytteitä kalibrointiin, ja menetelmää on mahdollisesti muutettava tiettyjä polymeerejä varten, esim. vesiliukoisia ja pitkäketjuisia haaraisia polymeerejä varten.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Matalaksi molekyylipainoksi määritellään pienempi kuin 1 000 (daltonia).

M_n (lukukeskimääräinen molekyylipaino) ja M_w (painokeskimääräinen molekyylipaino) määritellään seuraavilla yhtälöillä:

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

joissa

H_1 = on detektorisignaalin korkeus perustasosta retentiotilavuudelle V_i,

M_j = on polymeerifraktion molekyylipaino retentiotilavuudessa V_i, ja n on mittauspisteiden lukumäärä.

Molekyylipainojakauman leveys, joka on suhteessa järjestelmän dispersiivisyyteen, saadaan suhteesta M_w/M_n

▼B

1.3 VERTAILUAINEET

Koska GPC on suhteellinen menetelmä, on tehtävä kalibrointi. Tähän käytetään tavallisesti kokojakaumaltaan kapeita lineaarisia polystyreenistandardeja, joiden keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w sekä molekyylipainojakauma tunnetaan. Kalibrointikäyrää voidaan käyttää tuntemattoman näytteen molekyylipainon määritykseen vain, jos näytteen ja standardin erotusolosuhteet on valittu samalla tavalla.

Molekyylipainon ja eluutiotilavuuden suhde on validi ainoastaan tietyn kokeen tietyissä koeolosuhteissa. Tärkeitä tekijöitä ovat ennen kaikkea lämpötila, liuotin (tai liuotinseos), kromatografiajärjestely sekä erotus pylväs tai pylväsjärjestelmä.

Tällä tavoin määritetyt näytteen molekyylipainot ovat suhteellisia arvoja ja niistä käytetään nimitystä ”polystyreeniekvivalenttimolekyylipaino”. Tämä tarkoittaa sitä, että riippuen näytteen ja standardien rakenne-eroista ja kemiallisista eroista molekyylipainot voivat poiketa absoluuttisista arvoista enemmän tai vähemmän. Jos käytetään muita standardeja, esim. polyetyleeniglykolia, polyetyleenioksidia, poly-metyylimetakrylaattia tai polyakryylihappoa, on syy ilmoitettava.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Sekä näytteen molekyylipainojakauma että keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w voidaan määrittää GPC:llä. GPC on erityinen nestekromatografian laji, jossa näytteen erottaminen perustuu seoksen yksittäisten aineiden hydrodynaamisiin tilavuuksiin (2).

Erottuminen tapahtuu, kun näyte kulkee huokoisella aineella, tyypillisesti orgaanisella geelillä täytetyn pylvään läpi. Pienet molekyylit tunkeutuvat huokosiin, kun taas suuret molekyylit jäävät huokosten ulkopuolelle. Isojen molekyylien kulkema tie on siten lyhyempi, ja ne tulevat ensimmäisenä ulos pylväästä. Keskikokoiset molekyylit tunkeutuvat joihinkin huokosiin ja eluoituvat myöhemmin. Pienimmät molekyylit, joiden keskimääräinen hydrodynaaminen säde on pienempi kuin geelin huokoset, voivat tunkeutua kaikkiin huokosiin. Ne eluoituvat viimeisinä.

Ihanteellisessa tilanteessa erottumiseen vaikuttaa ainoastaan molekyylilajin koko, mutta käytännössä on vaikea välttää ainakin jonkin verran adsorptiosta aiheutuvaa haittaa. Epätasaisesti pakattu pylväs ja kuolleet tilavuudet voivat pahentaa tilannetta (2).

Detektorina käytetään esim. taitekerroin- tai UV-detektoria, ja tuloksena saadaan yksinkertainen jakaumakäyrä. Jotta käyrästä voidaan lukea oikeita molekyylipainoja, on pylväs kalibroitava molekyylipainoltaan tunnetuilla polymeereillä, joilla on mieluiten suunnilleen samanlainen rakenne, esim. erilaiset polystyreenistandardit. Tuloksena on tyypillisesti Gaussin käyrä, joka on joskus vääristynyt siten, että pienen molekyylipainon puolella on ”häntä”; pystysuoralla akselilla on eluoitujen molekyylilajien määrät painomitoissa ja vaaka-akselilla molekyylipainon logaritmi.

▼B

1.5 LAATUKRITEERIT

Eluutiotilavuuden toistettavuuden (keskihajonnan keskivirhe: RSD) olisi oltava parempi kuin 0,3 %, Määritvksen vaadittu toistettavuus on varmistettava sisäistä standardia käyttämällä, jos kromato-grammin arviointi on aikariippuvainen eikä täytä edellä mainittuja kriteerejä (1). Polydispersiivisyys riippuu standardien molekyylipainoista. Polystyreenistandardien osalta tyypillisiä arvoja ovat:

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

(M_p on standardin molekyylipaino piikin maksimissa).

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Polystyreenistandardiliuosten valmistus**

Polystyreenistandardit liuotetaan sekoittamalla huolellisesti haluttuun eluointiliuokseen. Valmistajan ohjeet on otettava huomioon liuosten valmistuksessa.

Valittujen standardien pitoisuudet riippuvat eri tekijöistä, esim. injektiotilavuudesta, liuoksen viskositeetistä ja detektorin herkkyydestä, Suurin injektiotilavuus on sovitettava pylvään pituuden mukaan, ettei pylvästä kuormiteta liikaa. Tyypilliset injektiotilavuudet käytettäessä GPC:tä analyyttisiin erotuksiin pylväässä, jonka koko on 30 cm x 7,8 mm, ovat tavallisesti 40–100 µl. Suuremmat tilavuudet ovat mahdollisia, mutta eivät saisi olla enemmän kuin 250 µl. Injektiotilavuuden ja aineen pitoisuuden paras suhde on määritettävä ennen pylvään varsinaista kalibrointia.

1.6.2 **Näyteliuoksen valmistus**

Periaatteessa samat vaatimukset koskevat näyteliuosten valmistamista. Näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen (esim. tetrahydrofuraaniin (THF) ravistamalla huolellisesti. Sitä ei saa missään tapauksessa liuottaa ultraäänihauteessa. Tarpeen vaatiessa näyte puhdistetaan suodattamalla kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2–2 µm.

Jos näytteessä on liukenemattomia hiukkasia, on tämä kirjattava loppuraporttiin, koska se saattaa johtua suurikokoisista molekyyleistä. Liukenemattomien hiukkasten painoprosenttiosuus on määritettävä jollakin sopivalla menetelmällä. Liuokset on käytettävä vuorokauden sisällä.

▼B

1.6.3 **Epäpuhtauksista ja lisäaineista johtuvat korjaukset**

Molekyylipainoltaan alle 1 000 olevien molekyylien suhteen on yleensä tehtävä korjaus, joka aiheutuu ei-polymeerisistä komponenteista (esim. epäpuhtaudet ja/tai lisäaineet), ellei pitoisuus jo ole pienempi kuin 1 %. Tämä tehdään analysoimalla suoraan polymeeriliuos tai GPC-eluaatti.

Jos eluaatti on pylväästä tultuaan liian laimea analysoitavaksi edelleen, se on konsentroitava. Voi olla tarpeen haihduttaa se kuiviin ja liuottaa uudelleen. Konsentroiminen on tehtävä siten, ettei eluaatissa tapahdu muutoksia. Eluaatin käsittely GPC-vaiheen jälkeen riippuu kvantitatiiviseen määritykseen käytettävästä analyyttisestä menetelmästä.

1.6.4 **Laitteisto**

GPC-laitteistoon kuuluu seuraavat osat:

— liuotinsäiliö

— kaasunpoistolaite (tarvittaessa)

— pumppu

— pulssinvaimennin (tarvittaessa)

— injektiojärjestelmä

— kromatografiapylväät

— ilmaisin (detektori)

— virtausmittari (tarvittaessa)

— tulosten tallennus/prosessointilaite

— jäteastia.

On varmistettava, että GPC-laitteisto ei reagoi käytettävien liuottimien kanssa (esim. THF:n kanssa on käytettävä teräskapillaareja).

1.6.5 **Injektiojärjestelmä ja liuottimen annostelujärjestelmä**

Määrätty näytetilavuus syötetään pylvääseen joko automaattisella näytteensyöttölaitteella tai käsin tarkasti määriteltyyn vyöhykkeeseen. Jos ruiskun mäntää vedetään tai työnnetään liian nopeasti, se voi aiheuttaa muutoksia havaitussa molekyylipainojakaumassa. Liuotinta pumppaavien pumppujen olisi oltava mahdollisimman tasaisia ja niissä saisi mieluiten olla pulssinvaimennin. Virtausnopeuden pitäisi olla noin 1 ml/min.

1.6.6 **Pylväs**

Näytteestä riippuen polymeerin ominaisuudet määritetään käyttäen joko yhtä pylvästä tai useita peräkkäin kytkettyjä pylväitä. Kaupallisesti on saatavilla lukuisia pylväsmateriaaleja, joiden ominaisuudet on määritelty (esim. huokoskoko, ekskluusiorajat). Erotusgeelin ja pylvään pituuden valinta riippuu sekä näytteen ominaisuuksista (hydrodynaamiset tilavuudet, molekyylipainojakauma) että erotuksen erityisvaatimuksista kuten liuottimesta, lämpötilasta ja virtausnopeudesta (1) (2) (3).

▼B

1.6.7 **Teoreettiset levyt**

Käytettävästä pylväästä tai pylväsyhdistelmästä on tiedettävä teoreettisten levyjen lukumäärä. Tätä varten syötetään pituudeltaan tunnettuun pylvääseen — jos THF on eluutioliuotin — etyylibentseeniliuosta tai muuta sopivaa ei-polaarista liuotinta. Teoreettisten levyjen lukumäärä saadaan seuraavasta yhtälöstä:

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

jossa

N on teoreettisten levyjen lukumäärä

V_e on eluutiotilavuus piikin maksimin kohdalla

W on piikin leveys perusviivalla

W_{172} on piikin leveys piikin korkeuden puolivälissä.

1.6.8 **Erotusteho**

Teoreettisten levyjen lukumäärän lisäksi, joka on vyöhykkeen leveyden määräävä suure, myös erotusteholla on osansa. Erotustehon määrää kalibraatiokäyrän jyrkkyys. Pylvään erotusteho saadaan seuraavasta yhtälöstä:

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

jossa

$V_{e,\ M_x}$ on sellaisen polystyreenin, jonka molekyylipaino on M_x, eluutiotilavuus

$V_{e,(10Mx)}$ on molekyylipainoltaan kymmenen kertaa suuremman polystyreenin eluutiotilavuus.

Järjestelmän erotuskyky määritellään yleensä seuraavasti:

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

jossa

V_{e1}, V_{e2} ovat kahden polystyreenistandardin eluutiotilavuudet piikin maksimissa

W_1, W_2 ovat piikin leveydet perusviivalla

M_1, M_2, ovat molekyylipainot piikin maksimissa (niiden ero pitäisi olla vähintään 10-kertainen)

Pylvään R-arvon olisi oltava suurempi kuin 1,7 (4).

▼B

1.6.9 **Liuottimet**

Kaikkien liuottimien on oltava korkeaa puhtauslaatua (THF:n puhtaus 99,5 %). Liuotinastian (tarvittaessa inertissä kaasussa) on oltava riittävän iso pylvään kalibroimiseen ja useiden näytteiden määrittämiseen. Liuottimesta on poistettava kaasut ennen kuin sitä pumpataan pylvääseen.

1.6.10 **Lämpötilansäätö**

Tärkeiden laitteiston sisäisten osien (injektiosilmukka, pylväät, detektori ja letkut/putket) lämpötilan olisi oltava vakaa ja valitulle liuottimelle sopiva.

1.6.11 **Detektori**

Detektorin tarkoitus on mitata pylväästä tulevan näytteen pitoisuus. Jotta piikit eivät leviäisi tarpeettomasti, on detektorin mittauskyvetin tilavuuden oltava mahdollisimman pieni. Se ei saisi olla suurempi kuin 10 µl paitsi valon sirontaa tai viskositeettia mittaavilla detektoreilla. Detektorina käytetään tavallisesti differentiaalirefraktometriä. Muitakin detektoreja, esim. UV/VIS-, IR- ja viskositeettidetekto-reja voidaan käyttää, mikäli näytteen tai eluutioliuottimen erityiset ominaisuudet edellyttävät sitä.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Yksityiskohtaisten arviointiperusteiden samoin kuin määritystulosten keräämisen ja käsittelyn osalta on noudatettava DIN-standardin (1) määräväksiä.

Kustakin näytteestä tehdään kaksi erillistä koetta, jotka on analysoitava erikseen.

M_n, M_w, M_w /M_n ja M on ilmoitettava jokaisesta mittauksesta. On ilmoitettava selvästi, että mitatut arvot ovat suhteellisia arvoja, jotka ovat suhteessa käytettyjen standardien molekyylipainoihin.

Kun retentiotilavuudet tai retentioajat (mahdollisesti korjattuina sisäisten standardien suhteen} on määritetty, esitetään log M -arvot (M_p on kalibrointistandardin piikin korkein kohta) jonkin edellä mainitun suureen funktiona. Kutakin molekyylipainon kymmenen potenssia kohti tarvitaan vähintään kaksi kalibrointipistettä ja koko käyrällä on oltava vähintään viisi mittauspistettä, joiden pitäisi kattaa näytteen arvioitu molekyylipainoalue. Kalibrointikäyrän loppupiste pienen molekyylipainon päässä määritetään n-heksyylibentseenin tai jonkin muun sopivan ei-polaarisen liuottimen avulla. M_n ja M_w määritetään tavallisesti tietokoneella osastossa 1.2 esitettyjen kaavojen perusteella. Jos käytetään manuaalista digitointia, voidaan ohjeeksi katsoa menetelmää ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Jakaumakäyrä on esitettävä taulukon tai kuvan muodossa (differentiaalinen taajuus tai summaprosenttiosuudet log M:n funktiona). Graafisessa esityksessä yksi molekyylipainon kymmenen potenssi pitäisi olla tavallisesti noin 4 cm leveä ja piikin maksimin pitäisi olla noin 8 cm korkea. Koko jakaumakäyrän osalta y-akselin korkeuden 0 ja 100 %:n välillä olisi oltava noin 10 cm.

2.2 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat asiat:

2.2.1 **Testattava aine**

— saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet),

— näytteen käsittelyn kuvaus, mahdolliset huomiot ja ongelmat.

2.2.2 **Laitteisto**

— eluenttisailiö, inertti kaasu, kaasun poisto eluentista, eluentin koostumus, epäpuhtaudet

— pumppu, pulssinvaimennin, injektiojärjestelmä

— erotuspylväät (valmistaja, kaikki tiedot pylväiden ominaisuuksista kuten huokoskoko, erotusmateriaalin tyyppi jne, käytettävien pylväiden lukumäärä, pituus ja järjestys),

— pylvään (tai pylväsyhdistelmän) teoreettisten levyjen lukumäärä, erotusteho (järjestelmän erotuskyky),

— piikkien symmetriaa koskevat tiedot,

— pylvään lämpötila, lämpötilan säätötapa,

— detektori (mittausperiaate, tyyppi, kyvetin tilavuus),

— mahdollinen virtausmittari (valmistaja, mittausperiaate),

— mittaustulosten tallennus- ja käsittelyjärjestelmä (laitteet ja ohjelmat).

2.2.3 **Järjestelmän kalibrointi**

— kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyn menetelmän tarkka kuvaus,

▼B

— tiedot menetelmän laatukriteereistä (esim. korrelaatiokerroin, jäännösneliösumma jne.),

— tiedot kaikista kokeen aikana sekä tulosten arvioinnissa ja käsittelyssä suoritetuista ekstrapolaatioista, oletuksista ja aproksimaatioista,

— kaikki kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyt mittaukset on esitettävä taulukossa, jossa esitetään myös seuraavat tiedot kustakin kalibrointipisteestä:

  — näytteen nimi,

  — aineen valmistaja,

  — valmistajan ilmoittamat tai mittauksista johdetut standardien M_p, M_n, M_w ja M_w/M_n ominaisarvot sekä tarkat tiedot niiden määritysmenetelmästä,

  — injektiotilavuus ja injektoitavan liuoksen pitoisuus,

  — kalibrointiin käytetty M_p-arvo,

  — eluutiotilavuus tai piikin maksimissa mitattu korjattu retentioaika,

  — piikin maksimissa laskettu M_p,

  — laskemalla saadun M_p:n ja kalibrointiarvon prosenttivaihe.

2.2.4 **Tiedot pienimolekyylipainoisen polymeerin pitoisuudesta**

— käytettyjen analyysimenetelmien kuvaus ja kokeiden suoritustapa,

— tiedot pienimolekyylipainoisen aineen pitoisuusprosentista (w/w) suhteessa koko näytteeseen,

— tiedot epäpuhtauksista, lisäaineista ja muista ei-polymeerisistä aineista painoprosentteina kokonäytteestä.

2.2.5 **Arviointi**

— aikaperusteinen arviointi: toistettavuuden varmistamiseen käytetyt menetelmät (korjausmenetelmä, sisäinen standardi jne.),

— suoritetaanko arviointi eluutiotilavuuden vai retentioajan perusteella,

— tiedot arvion rajoituksista, jos piikkiä ei analysoida täydellisesti,

— mahdollisten tasoitusmenetelmien kuvaus,

— näytteen valmistus ja esikäsittely,

— mahdolliset liukenemattomat hiukkaset,

▼B

— injektiotilavuus (µl) ja injektoitavan näytteen pitoisuus (mg/ml),

— huomiot seikoista, joista aiheutuu poikkeamista ihanteellisesta GPC-käyttäytymisestä,

— tarkka kuvaus kaikista testausmenetelmien muutoksista,

— virherajoja koskevat yksityiskohtaiset tiedot,

— kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomiot.

3. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J, and Bly, D.D. eds (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Liite

Ohjeet pienimolekyylipainoisten aineiden pitoisuuden korjaamiseksi, jos näytteessä on liukenematonta polymeeriä

Jos näytteessä on liukenematonta polymeeriä, aiheuttaa se massakatoa GPC-analyysissä. Liukenematon polymeeri tarttuu pylvääseen tai näytesuodattimeen, kun taas näytteen liukoinen osa menee pylvään läpi. Jos polymeerin taitekerroindifferentiaali (inkrementti) (dn/dc) voidaan arvioida tai mitata, voidaan arvioida pylvääseen hävinnyt näytemassa. Tällöin tehdään korjaus ulkoisella kalibroinnilla käyttäen standardiaineita, joiden konsentraatio ja dn/dc tunnetaan, refraktometrin vasteen kalibroimiseksi. Seuraavassa esimerkissä käytetään poly(metyylimetakrylaatti) (pMMA) -stardardia.

Akryylipolymeerianalyysin ulkoisessa kalibroinnissa analysoidaan tetrahydrofuraanissa oleva, tietyn konsentraatin omaava pMMA-standardi GPC:llä, ja tuloksien avulla määritetään refraktometrivakio seuraavalla yhtälöllä:

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

jossa

K on refraktometrivakio (mikrovolttiasekunti/ml),

R on pMMA-standardin vaste (mikrovolttiasekunti),

C on pMMA-standardin konsentraatio (mg/ml),

V on injektiovolyymi (ml) ja

dn/dc on tetrahydrofuraanissa olevan pMMA-standardin taitekerroindifferentiaali (ml/mg).

Seuraavat tiedot ovat tyypillisiä pMMA-standardille:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Tulokseksi saatua K-arvoa ($3{,}05 \times 10^{11}$) käytetään sitten teoreettisen detektorivasteen laskemiseksi, kun oletetaan, että injisoitu polymeeri eluoituu detektorist 100-prosenttisesti.

▼B

A.20. **VESILIUOKSESSA OLEVIEN POLYMEERIEN LIUKENEMIS/ UUTTUMISOMINAISUUDET**

1. **MENETELMÄ**

Seuraava menetelmä on toisinto OECD:n ohjeen N:o 120 (1997) muutetusta versiosta. Teknisiä lisätietoja on viitteessä (1).

1.1 JOHDANTO

Tietyille polymeereille, kuten emulsiopolymeerit, on tehtävä esikäsittelyjä ennen kuin seuraavassa selostettua menetelmää voi käyttää. Menetelmä ei sovellu nestemäisiin polymeereihin eikä veden kanssa testausolosuhteissa reagoiviin polymeereihin.

Jos menetelmä ei ole kohtuullisesti tai lainkaan mahdollinen, liukenemis/uuttumisominaisuuksia voi tutkia muilla menetelmillä. Tällöin on esitettävä käytetyn menetelmän yksityiskohdat ja perustelut.

1.2. VERTAILUAINEET

Ei vertailuaineita.

1.3. TESTAUSMENETELMÄN PERIAATE

Vesiliuoksessa olevien polymeerien liukenemis/uuttumisominaisuudet määritetään pullomenetelmällä (katso A.6. Vesiliukoisuus, pullomenetelmä) seuraavin muutoksin.

1.4 LAATUKRITEERIT

Ei laatukriteerejä.

1.5 TESTAUSMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Laitteisto**

Menetelmässä tarvitaan seuraavat laitteet:

— murskauslaite, esim. jauhin, tietyn koon omaavien hiukkasten valmistamiseksi,

— ravistelulaite, jossa on lämpötilansäätö,

— kalvosuodatusjärjestelmä

— sopiva analyysilaitteisto

— standardisoidut seulat.

1.5.2 **Näytteen valmistus**

Edustava näyte on ensin saatettava hiukkaskokoon 0,125–0,25 mm sopivilla seuloilla. Näytteen stabiilisuuden varmistamiseksi tai jauhamisen aikana voidaan tarvita jäähdytystä. Kumimaisia aineita voi murskata neste typpilämpötilassa (1).

Jos vaadittua hiukkaskokoa ei voida saavuttaa, olisi pyrittävä saamaan hiukkaskoko mahdollisimman pieneksi, ja ilmoitettava tulos. Raportissa on selostettava, miten murskattua näytettä säilytettiin ennen testausta.

▼B

1.5.3 **Menetelmä**

Kolme 10 gramman näytettä testattavaa ainetta punnitaan kolmeen pulloon, joissa on lasitulpat, ja 1 000 ml vettä lisätään kuhunkin pulloon. Jos on hankala käsitellä 10:tä grammaa polymeeriä, käytetään suurempaa määrää ja lisätyn veden tilavuutta muutetaan vastaavasti.

Pullot suljetaan tiiviisti ja niitä ravistetaan 20 °C:ssa. Olisi käytettävä ravistelu- tai sekoituslaitetta, jonka lämpötila pysyy käytettäessä vakiona. Kunkin pullon sisältö sentrifugoidaan tai suodatetaan 24 tunnin kuluttua ja polymeerin pitoisuus kirkkaassa vesifaasissa määritetään sopivalla määritysmenetelmällä. Jos vesifaasille ei ole olemassa sopivaa määritysmenetelmää, kokonaisliukoisuus/uuttuvuus voidaan arvioida suodatusjäännöksen tai sentrifugoidun sakan kuivapainosta.

Tavallisesti on tehtävä kvantitatiivinen ero epäpuhtauksien ja lisäaineiden ja toisaalta pienimolekyylipainoisten aineiden välillä. Gravimetrisiä määrityksiä tehtäessä on tärkeää tehdä myös nollakoe ilman testattavaa ainetta, jotta voidaan määrittää koemenetelmästä johtuvat jäämät.

Polymeerien liukenemis/uuttumisominaisuuksia vedessä 37 °C:ssa pH:ssa 2 ja 9 voidaan määrittää samalla tavalla kuin 20 °C:n kokeessa. pH-arvot voidaan säätää lisäämällä joko sopivia puskureita tai sopivia happoja tai emäksiä kuten suolahappoa, etikkahappoa, pro analyysi -laatuista natrium- tai kaliumhydroksidia tai NH_3:a.

Määritysmenetelmästä riippuen on tehtävä yksi tai kaksi testiä. Jos on olemassa riittävän spesifinen menetelmä polymeerikomponentin määrittämiseksi suoraan vesiliuoksesta, pitäisi yhden edellä kuvatun kaltaisen testin riittää. Jos tällaista menetelmää ei kuitenkaan ole käytettävissä ja jos polymeerin liukenemis/uuttumisominaisuuksien määritys rajoittuu epäsuoraan analyysiin eli ainoastaan orgaanisen hiilen kokonaismäärän (TOC) määrittämiseen vesiuutteesta, pitäisi tehdä lisätesti. Tämä lisätesti pitäisi myös tehdä kolmoismäärityksenä käyttäen kymmenen kertaa pienempiä polymeerinäytteitä ja samaa määrää vettä kuin ensimmäisessä testissä.

1.5.4 **Määritys**

1.5.4.1 *Testi, jossa on yksi näytekoko*

Menetelmiä vesifaasissa olevan polymeerikomponentin suoraa määrittämistä varten voi olla olemassa. Vaihtoehtoisesti voidaan harkita myös liuenneiden/uuttuneiden polymeerikomponenttien epäsuoraa analyysiä, jolloin määritetään liukoisten osien kokonaispitoisuus ja korjataan ei-polymeerispesifisten komponenttien suhteen.

Kokonaispolymeeri voidaan määrittää vesiliuoksesta:

joko riittävän herkällä menetelmällä, esim.

— TOC käyttämällä persulfaatti- tai dikromaattidigestiota, jolloin muodostuva CO_2 määritetään IR:llä tai kemiallisesti;

▼B

— atomiabsorptiospektrometrialla (AAS) tai ICP (inductively coupled plasma) -emissiomenetelmällä, jos polymeeri sisältää piitä tai metallia;

— UV-absorptio- tai spektrofluorometrialla, jos on kyseessä aryylipolymeeri;

— LC-MS:llä, jos on kyseessä pienimolekyylipainoiset näytteet;

tai haihduttamalla vesiuute tyhjiössä kuiviin ja tekemällä jäännöksestä spektroskooppinen (IR, UV jne.) tai AAS/ICP-analyysi.

Jos vesifaasia ei voida sellaisenaan analysoida, pitäisi vesiuute uuttaa veteen sekoittuvalla orgaanisella liuottimella, esim. klooratulla hiilivedyllä. Liuotin haihdutetaan ja jäännöksestä määritetään ilmoitetun polymeerin pitoisuus kuten edellä on selostettu. Jos tässä jäännöksessä tunnistetaan epäpuhtauksia tai lisäaineita, on niiden osuus vähennettävä itse polymeerin liukenemis/uuttumisasteen määrittämiseksi.

Jos näytteessä on suhteellisen paljon tällaisia aineita, voi olla tarpeen tehdä jäännökselle esim. HPLC-tai GC-analyysi epäpuhtauksien erottamiseksi monomeeristä ja monomeeristä peräisin olevasta aineesta, jotta monomeerin todellinen pitoisuus voidaan määrittää.

Joskus voi riittää, että orgaaninen liuotin haihdutetaan kuiviin ja kuiva jäännös punnitaan.

1.5.4.2 *Testi, jossa on kaksi eri näytekokoa*

Kaikista vesiuutteista määritetään TOC.

Näytteen liukenemattomalle osalle (joka ei uuttunut) tehdään gravimetrinen analyysi. Jos kunkin pullon sisällön sentrifugoinnin tai suodattamisen jälkeen polymeerijäännöksiä on tarttunut pullon seinämiin, pitäisi pullo huuhtoa suodoksella, kunnes siinä ei enää näy mitään jäännöstä. Sen jälkeen suodos sentrifugoidaan tai suodatetaan uudelleen. Suodattimeen tai sentrifuugiputkeen jäänyt jäännös kuivataan 40 ^{o}C:ssa tyhjiössä ja punnitaan. Kuivaamista jatketaan, kunnes saavutetaan vakiopaino.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET**

2.1 TESTI, JOSSA ON YKSI NÄYTEKOKO

Ilmoitetaan erilliset tulokset kutakin kolmea pulloa kohti ja keskiarvot ilmaistuna massayksiköllä liuostilavuutta kohti (tyypillisesti mg/l) tai massayksiköllä polymeerinäytteen massaa kohti (tyypillisesti mg/g). Lisäksi pitäisi ilmoittaa näytteen painohävikki (liuenneen aineen paino jaettuna alkuperäisen näytteen painolla) Suhteelliset keskihajonnat (RSD) pitäisi laskea. Tulokset pitää antaa koko ainemäärää kohti (polymeeri + olennaiset lisäaineet jne.) ja pelkkää polymeeriä kohti (ts. sen jälkeen, kun on vähennetty tällaisten lisäaineiden vaikutus).

▼B

2.2 TESTI, JOSSA ON KAKSI NÄYTEKOKOA

Ilmoitetaan erilliset TOC-arvot kahden kolmenkertaisilla näytteillä tehdyn kokeen vesiliuosuutteille ja kunkin kokeen keskiarvo ilmaistuna massayksiköllä liuostilavuutta kohti (tyypillisesti mgC/l) sekä massayksikköinä alkuperäisen näytteen painoa kohti (tyypillisesti mgC/g).

Jos tuloksissa ei ole eroa, kun näytteen suhde vesimäärään on suuri tai pieni, tämä voi merkitä sitä, että kaikki uuttuvat komponentit ovat todella uuttuneet. Tällöin ei suora määritys ole yleensä tarpeen.

Kunkin jäännöksen painot olisi ilmoitettava erikseen ja ilmaistava prosentteina näytteiden alkuperäispainoista. Keskiarvot lasketaan koetta kohti. Erotus sadan prosentin ja havaittujen prosenttimäärien välillä on alkuperäisen näytteen liukoisen ja uuttuvan aineksen prosenttimäärä.

3. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

3.1.1 **Testattava aine:**

— saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet, pienimolekyylipainoisen aineen pitoisuus)

3.1.2 **Koeolosuhteet**

— kuvaus käytetyistä menetelmistä ja koeolosuhteista;

— kuvaus analyyttisistä ja detektiomenetelmistä.

3.1.3 **Tulokset:**

— liukoisuus/uuttuvuustulokset mg/l; yksittäiset arvot ja keskiarvot uuttumiskokeista eri liuoksissa, eritellen polymeeripitoisuus ja epäpuhtaudet, lisäaineet ym.,

— liukoisuus/uuttuvuustulokset mg/g polymeeriä,

— vesiliuosuutteiden TOC-arvot, liuenneen aineen paino ja lasketut prosenttiosuudet, jos ne on mitattu,

— kunkin näytteen pH,

— tiedot nollanäytteistä,

— tarvittaessa kirjallisuudesta saatavat tiedot testattavan aineen kemiallisesta epästabiilisuudesta sekä testausprosessin aikana että analyysin aikana,

— muut tiedot, jotka ovat tärkeitä tulosten tulkitsemisen kannalta.

4. KIRJALLISUUSVIITTEET

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

▼B

A.21. **HAPETTAVAT OMINAISUUDET (NESTEET)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tämän testimenetelmän tarkoituksena on mitata nestemäisen aineen kyky suurentaa palavan aineen palamisnopeutta tai -intensiteettiä tai sen kykyä muodostaa palavan aineen kanssa sellainen seos, joka voi syttyä itsestään, kun aineet sekoitetaan täydellisesti. Menetelmä perustuu YK:n testiin hapettaville nesteille (1) ja vastaa sitä täysin. Koska menetelmä A.21 on kuitenkin tarkoitettu pääasiassa täyttämään asetuksen 1907/2006 vaatimukset, testattavaa ainetta on tarpeen verrata vain yhteen vertailuaineeseen. Testaaminen ja aineen vertaaminen muihin vertailuaineisiin voi olla tarpeen, jos on odotettavissa, että testien tuloksia käytetään muihin tarkoituksiin ([1]).

Tätä testiä ei tarvitse tehdä, jos rakennekaavaa tarkastelemalla voidaan päätellä kohtuullisella varmuudella, että aine ei voi reagoida eksotermisesti palavan aineen kanssa.

On hyvä, jos aineen mahdollisista räjähdysominaisuuksista on saatavilla alustavaa tietoa ennen testin tekemistä.

Tätä testi ei sovellu kiinteille aineille, kaasuille, räjähtäville tai erittäin helposti syttyville aineille eikä orgaanisille peroksideille.

Tätä testiä ei mahdollisesti tarvitse tehdä, jos ainetta koskevia tuloksia on jo olemassa YK:n hapettavia nesteitä koskevasta testistä (1).

1.2 MÄÄRITELMÄT JA MITTAYKSIKÖT

Keskimääräinen paineennousuaika on niiden aikojen keskiarvo, jotka on mitattu, kun testattavan seoksen paine on nostettu 690 kPa:sta 2 070 kPa:an ilmanpaineen yläpuolella.

1.3 VERTAILUAINE

Vertailuaineeksi tarvitaan 65-painoprosenttista typpihappoa (vesiliuos; analyyttinen laatu) ([2]).

([1]) Esimerkiksi YK:n kuljetussäännösten yhteydessä.
([2]) Happo on titrattava ennen testausta sen konsentraation varmistamiseksi.

▼B

Jos kokeen tekijä kuitenkin arvelee, että testin tuloksia saatetaan käyttää muihin tarkoituksiin ([1]), muidenkin vertailuaineiden testaaminen voi olla aiheellista ([2]).

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattava neste sekoitetaan massasuhteessa 1:1 kuituselluloosan kanssa ja siirretään paineastiaan. Jos aineet syttyvät itsestään sekoitettaessa tai astiaa täytettäessä, ei testiä tarvitse jatkaa.

Jos testattava seos ei syty itsestään, tehdään koko testi. Seosta kuumennetaan paineastiassa ja määritetään keskimääräinen aika, joka tarvitaan, että paine nousee 690 kPa:sta 2 070 kPa:an ilmanpaineen yläpuolella. Tätä verrataan siihen keskimääräiseen aikaan, joka tarvitaan, että vertailuaine(id)en ja selluloosan 1:1-seos paine nousee saman verran.

1.5 LAATUKRITEERIT

Viiden kokeen sarjassa yhdellä aineella mikään tulos ei saa erota enempää kuin 30 % aritmeettisesta keskiarvosta. Tulokset, jotka eroavat yli 30 % keskiarvosta, on hylättävä, sekoitus- ja täyttömenetelmää on parannettava ja testi uusittava.

1.6 MENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Valmistelu**

1.6.1.1 *Palava aine*

Palavana aineena käytetään kuivattua kuituselluloosaa, jonka kuidun pituus 50–250 μm ja keskihalkaisuja 25 μm ([3]). Selluloosa kuivataan vakiopainoon kerroksena, joka on enintään 25 mm paksu, 105 °C:ssa 4 tuntia, ja sitä pidetään eksikkaattorissa kuivatusaineen kanssa, kunnes se on jäähtynyt ja kunnes sitä tarvitaan. Kuivatun selluloosan vesipitoisuuden pitäisi olla alle 0,5 % kuivasta massasta ([4]). Tarvittaessa kuivatusaikaa on pidennettävä, jotta tähän päästään ([5]). Koko testin aikana on käytettävä samaa selluloosaerää.

([1]) Esimerkiksi YK:n kuljetussäännösten yhteydessä.
([2]) Esimerkiksi 50-painoprosenttista perkloorihappoa ja 40-painoprosenttista natriumkloraattia on käytetty viitteessä 1.
([3]) Esimerkiksi Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, luettelon nro 4021 050.
([4]) Varmistetaan (esim.) Karl-Fisherin titrauksella.
([5]) Vesipitoisuus voidaan määrittää myös (esim.) kuumentamalla 105 °C:ssa tyhjiössä 24 h.

▼B

1.6.1.2 *Laitteet*

1.6.1.2.1 P a i n e a s t i a

Testiin tarvitaan lieriönmuotoinen teräksinen paineastia, jonka pituus on 89 mm ja ulkohalkaisija 60 mm (ks. kuva 1). Vastakkaisille sivuille työstetään kaksi tasaista pintaa (jolloin astian poikkileikkaus pienenee 50 mm:iin) kiinnipitämisen helpottamiseksi, kun sytytystulppaa ja ilmaustulppaa pannaan paikoilleen. Astian sisäläpimitta on 20 mm ja kummankin pään sisäpuoli on kyntetty 19 mm:n syvyydeltä ja siinä on kierteet, joihin sopii 1" British Standard Pipe (BSP) tai vastaava metrijärjestelmän mukainen osa. Paineastian pyöreään pintaan 35 mm:n päähän astian toisesta päästä ja 90 asteen kulmassa työstettyihin pintoihin on ruuvattu sivuhaara, jonka kautta paine voidaan päästää ulos. Sivuhaaraputken istukka porataan 12 mm:n syvyyteen siten, että siihen sopii 1/2":n BSP (tai metrijärjestelmän vastaava) kierre sivuhaaran päässä. Tarvittaessa lisätään inertti tiiviste, jotta liitos on kaasutiivis. Sivuhaara ulottuu 55 mm:n päähän paineastian ulkopuolelle, ja sen sisäläpimitta on 6 mm. Sivuhaaran pää on kyntetty ja sen kierteet ovat sellaiset, että niihin sopii kalvotyyppinen paineenmuunnin. Mitä tahansa paineenmittauslaitetta voidaan käyttää edellyttäen, etteivät kuumat kaasut tai hajoamisessa syntyvät yhdisteet vaikuta siihen ja että se pystyy mittaamaan paineennousunopeuksia 690–2 070 kPa:n välillä alle 5 ms:ssa.

Kauempana sivuhaarasta oleva paineastian pää suljetaan sytytystulpalla, jossa on kaksi elektrodia. Toinen niistä on eristetty tulpan pääosasta ja toinen on maadoitettu siihen. Paineastian toisessa päässä on varokalvo (murtumispaine noin 2 200 kPa), jota pitää paikallaan sisäläpimitaltaan 20 mm:n tulppa. Tarvittaessa sytytystulpan kanssa käytetään inerttiä tiivistettä, jotta liitos on kaasutiivis. Tukiteline (kuva 2) pitää kokoonpanon oikeassa asennossa käytön aikana. Siihen kuuluu tavallisesti pehmeää terästä oleva pohjalaatta, jonka mitat ovat 235 mm x 184 mm x 6 mm, ja 185 mm:n pituinen poikkileikkaukseltaan neliönmuotoinen onttotanko, jonka mitat ovat 70 mm x 70 mm x 4 mm.

Neliöonttotangon toisessa päässä siitä leikataan pala vastakkaisilta puolilta siten, että saadaan rakenne, jossa on kaksi litteäreunaista jalkaa, joiden yläpuolella on 86 mm koskematonta neliöonttotankoa. Jalat leikataan siten, että ne muodostavat 60^{o}:n kulman vaakatason kanssa, kun tanko on hitsattu pohjalaattaan. Pohjarakenteen yläosan yhdelle laidalle työstetään lovi, jonka leveys on 22 mm ja syvyys 46 mm, siten, että kun paineastiakokoonpano lasketaan onttotankotelineeseen sytytystulppa edellä, sivuhaara sopii loveen. Onttotangon alempaan sisäpintaan hitsataan 30 mm leveä ja 6 mm paksu teräspala, joka toimii välikkeenä. Kaksi vastakkaisilla pinnoilla olevaa 7 mm:n siipiruuvia pitää paineastian tukevasti paikallaan. Kaksi 12 mm leveää 6 mm:n paksuisesta teräksestä tehtyä nauhaa, jotka on hitsattu onttotangon pohjaosaan kiinnittyviin sivuosiin, tukee paineastiaa alhaalta päin.

▼B

1.6.1.2.2 Sytytysjärjestelmä

Sytytysjärjestelmä koostuu 25 cm pitkästä Ni/Cr-langasta, jonka halkaisija on 0,6 mm ja vastus 3,85 ohm/m. Lanka on kierretty halkaisijaltaan 5 mm:n tangon avulla kelaksi ja kiinnitetty sytytystulpan elektrodeihin. Kelan muodon pitäisi olla sellainen kuin kuvassa 3 esitetään. Astian pohjan ja sytytyskelan alapään välisen etäisyyden pitäisi olla 20 mm. Ellei elektrodeja voi säätää, pitäisi kelan ja astian pohjan välillä olevan sytytyslangan päät eristää keraamivaipalla. Lankaa kuumennetaan tasavirtatehonlähteellä, joka pystyy tuottamaan vähintään 10 A:n voimakkuista virtaa.

1.6.2 **Testin suoritusarvot** ([1])

Laitetta, joka on koottu täydellisesti ja jossa on paineenmuunnin ja kuumennusjärjestelmä, mutta johon ei ole asennettu varokalvoa, tuetaan sytytystulppapuoli alaspäin. 2,5 g testattavaa nestettä ja 2,5 g kuivattua selluloosaa sekoitetaan lasidekanterissa käyttäen lasista sekoitussauvaa ([2]). Turvallisuussyistä työntekijän ja seoksen välillä on oltava suojalevy sekoituksen aikana. Jos seos syttyy sekoituksen tai täytön aikana, ei testiä tarvitse jatkaa. Seos siirretään paineastiaan pieni määrä kerrallaan taputtaen, jotta seos pakkautuisi sytytyskelan ympärille ja olisi hyvin kosketuksissa sen kanssa. On tärkeää, ettei kela vääristy seoksen pakkaamisen aikana, koska se voisi aiheuttaa vääriä tuloksia ([3]). Varokalvo asetetaan paikalleen ja kiinnitystulppa kierretään tiukasti paikalleen. Täytetty astia asetetaan tukitelineeseen siten, että varokalvo on ylöspäin. Teline olisi sijoitettava sopivaan vahvistettuun vetokaappiin tai sytytyskammioon. Tehonlähde yhdistetään sytytystulpan ulompiin päihin ja annetaan 10 A:n virtaa. Aika, joka kuluu sekoituksen aloittamisesta tehon kytkemiseen, ei saisi olla pitempi kuin 10 min.

Paineenmuuntimen aikaansaama signaali rekisteröidään sopivalla järjestelmällä, joka mahdollistaa sekä arvioinnin että saadun aika-painekäyrän pysyvän rekisteröinnin (esim. transienttitallennin, joka on kytketty piirturiin). Seosta kuumennetaan, kunnes varokalvo murtuu tai ainakin 60 s. Jos varokalvo ei murru, seoksen on annettava jäähtyä ennen kuin laite puretaan varovasti ja varoen erityisesti mahdollista paineen vapautumista. Testattavalla aineella ja vertailuaineella (-aineilla) tehdään viisi koetta. Kirjataan aika, joka kuluu siihen, että paine nousee 690 kPa:sta 2 070 kPa:iin ilmanpaineen yläpuolella. Lasketaan paineennousuun kuluvien aikojen keskiarvo.

Joissakin tapauksissa aineet saattavat aiheuttaa paineen nousun (liian suuren tai liian pienen), joka aiheutuu sellaisista kemiallisista reaktioista, jotka eivät liity aineen hapettaviin ominaisuuksiin. Tällöin voi olla tarpeen toistaa testi inertillä aineella, esim. piimaalla (kieselguhr), selluloosan sijasta reaktion laadun selvittämiseksi.

([1]) Hapettimien ja selluloosan seoksia on pidettävä mahdollisesti räjähtävinä ja käsiteltävä asianmukaisella huolella.

([2]) Käytännössä tämä voidaan tehdä valmistamalla testattavasta nesteestä ja selluloosasta 1:1-seosta suurempi määrä kuin kokeeseen tarvitaan ja siirtämällä 5 ± 0,1 g seosta paineastiaan. Seos on valmistettava tuoreeltaan joka koetta varten.

([3]) Erityisesti on estettävä kelan vierekkäisten kierteiden välinen kosketus.

▼B

2. **MITTAUSTULOKSET**

Paineen nousuun kuluneet ajat sekä testiaineelle että vertailuaineelle (-aineille). Paineen nousuun kuluneet ajat mahdollisille inertin aineen kanssa tehdyille testeille.

2.1 TULOSTEN KÄSITTEY

Lasketaan paineen nousuun kuluneiden aikojen keskiarvot sekä testiaineelle että vertailuaineelle (-aineille).

Lasketaan paineen nousuun kuluneiden aikojen keskiarvot mahdollisille inertin aineen kanssa tehdyille testeille.

Taulukossa 1 esitetään joitakin esimerkkejä tuloksista.

Taulukko 1

Esimerkkejä tuloksista ([a])

Aine ([b])	Keskimääräinen paineen nousuun kulunut aika 1:1 -selluloosaseokselle (ms)
Ammoniumdikromaatti, kyllästetty vesiliuos	20 800
Kalsiumnitraatti, kyllästetty vesiliuos	6 700
Ferrinitraatti, kyllästetty vesiliuos	4 133
Litiumperkloraatti, kyllästetty vesiliuos	1 686
Magnesiumperkloraatti, kyllästetty vesiliuos	777
Nikkelinitraatti, kyllästetty vesiliuos	6 250
Typpihappo, 65 %	4 767 ([c])
Perkloorihappo, 50 %	121 ([c])
Perkloorihappo, 55 %	59
Kaliumnitraatti, 30 % vesiliuos	26 690
Hopeanitraatti, kyllästetty vesiliuos	— ([d])
Natriumkloraatti, 40 % vesiliuos	2 555 ([c])
Natriumnitraatti, 45 % vesiliuos	4 133
Inertti aine	
Vesi: selluloosa	— ([d])

([a]) Ks. viite (1), YK:n kuljetusjärjestelmän mukainen luokitus.
([b]) Kyllästetyt liuokset on valmistettava 20 °C:ssa.
([c]) Laboratorioidenvälisten vertailevien tutkimusten keskiarvo.
([d]) Maksimipainetta 2 070 kPa ei saavutettu.

▼B

3. **TESTISELOSTE**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

— testattavan aineen tunnistetiedot, koostumus, puhtausaste jne.

— testiaineen pitoisuus,

— selluloosan kuivausmenetelmä,

— käytetyn selluloosan vesipitoisuus,

— mittaustulokset,

— inertin aineen kanssa mahdollisesti tehtyjen testien tulokset,

— paineen nousuun kuluvista ajoista lasketut keskiarvot,

— mahdolliset poikkeamat tästä menetelmästä ja syyt niihin,

— kaikki lisätiedot ja huomautukset, jotka voivat vaikuttaa tulosten tulkintaan.

3.2 TULOSTEN TULKINTA ([1])

Testitulosten arvioinnissa

a) todetaan, syttyykö testiaineen ja selluloosan seos itsestään ja

b) verrataan paineen nousuun (690 kPa – 2 070 kPa) kuluneiden aikojen keskiarvoja vertailuaine(id)en vastaaviin arvioihin.

Nestemäisen aineen katsotaan olevan hapettava, kun

a) testattavan aineen ja selluloosan 1:1-seos (massana) syttyy itsestään tai

b) testattavan aineen ja selluloosan 1:1-seoksella (massana) on pienempi tai yhtä suuri keskimääräinen paineen nousuun kuuluva aika kuin 65-painoprosenttisen typpihapon ja selluloosan 1:1-seoksella (massana).

Väärien positiivisten tulosten välttämiseksi on tuloksia tulkittaessa tarkasteltava tarvittaessa myös tuloksia, jotka on saatu testattaessa ainetta inertin materiaalin kanssa.

([1]) Ks. viite 1, tulosten tulkinta YK:n kuljetusmäärysten mukaan käytettäessä useita vertailuaineita.

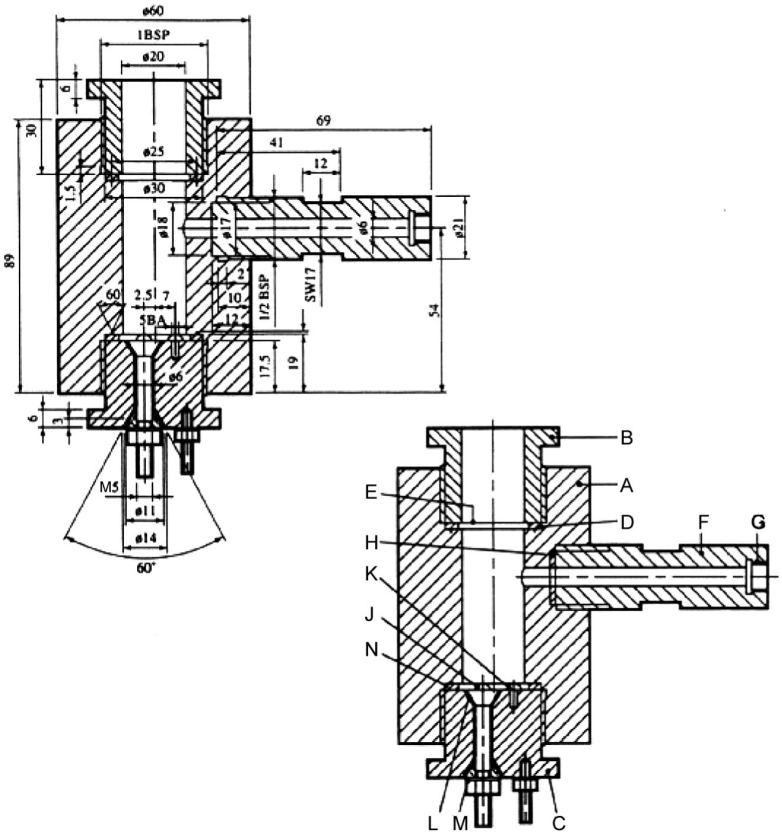
▼B

4. **KIRJALLISUUS**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3. tarkistettu painos. YK:n julkaisu nro ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, sivu 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Kuva1

Paineastia

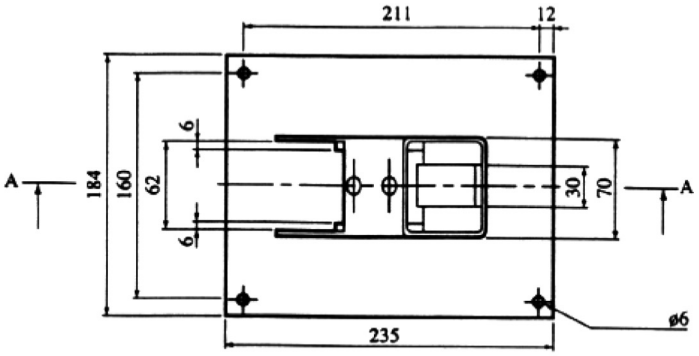


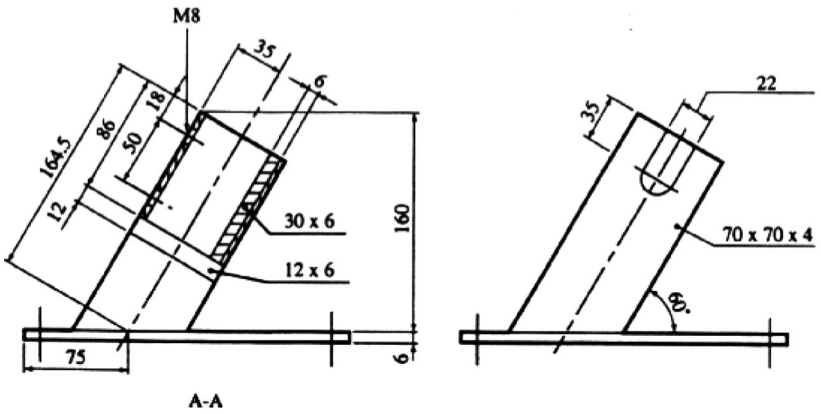
(A) Paineastian runko-osa	(B) Varokalvoa paikallaan pitävä tulppa	(C) Sytytystulppa
(D) Pehmeä lyijytiiviste	(E) Varokalvo	(F) Sivuhaara
(G) Paineenmuuntimen pää	(H) Tiivistysrengas	(J) Eristetty elektrodi
(K) Maadoitettu elektrodi	(L) Eristys	(M) Teräskartio
(N) Eristysrenkaan ura		

▼B

Kuva 2

Tukiteline

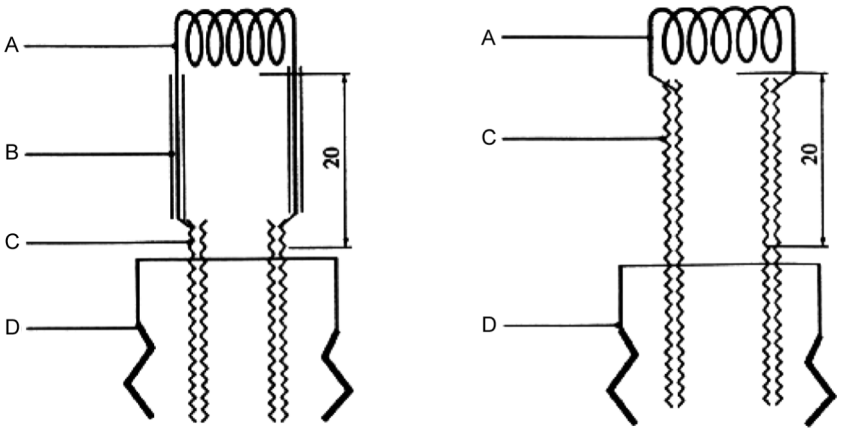




Kuva 3

Sytytysjärjestelmä

(A) Sytytyskela (B) Eristys (C) Elektrodit (D) Sytytystulppa



Huom: kokoonpanosta voidaan käyttää kumpaa hyvänsä.

▼M1

A.22. **KUITUJEN HALKAISIJAN PITUUSPAINOTETTU GEOMETRINEN KESKIARVO**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tässä testiohjeessa kuvataan menettely, jolla voidaan mitata bulkkimateriaalien tai -tuotteiden sisältämien keinotekoisten mineraalikuitujen halkaisijan pituuspainotettu geometrinen keskiarvo (LWGMD, Length Weighted Geometric Mean Diameter). Koska populaation LWGMD on 95 prosentin todennäköisyydellä 95 prosentin luottamustasojen välillä (LWGMD ± 2 x keskivirhe), kirjattu arvo (testin tulos) on näytteen alempi 95 prosentin luottamustaso (ts. LWGMD miinus kaksi keskivirhettä). Menetelmän perustana on tarkistettu versio (kesäkuu 1994) HSE:n (Health and Safety Executive, UK) teknisestä menetelmästä, josta sovittiin ECFIA:n (European Ceramic Fibres Industry Association) ja HSE:n välisessä kokouksessa Chesterissä 26.9.1993 ja joka kehitettiin toista laboratorioiden välistä koetta varten sekä kyseisen kokeen tulosten perusteella (1, 2). Kyseisellä mittausmenetelmällä voidaan määrittää kuidun halkaisija bulkkimateriaaleissa tai -tuotteissa, jotka sisältävät keinotekoisia mineraalikuituja, esimerkiksi tulenkestäviä keraamisia kuituja, keinotekoisia lasikuituja ja yksikide- tai monikidekuituja.

Pituuspainotuksella kompensoidaan vaikutusta, jonka pitkien kuitujen särkymisellä (näytteenoton tai käsittelyn yhteydessä) on halkaisijoiden kokojakaumaan. Keinotekoisten mineraalikuitujen kokojakaumaa määritettäessä käytetään geometrisia tilastomuuttujia (geometrista keskiarvoa), koska näiden halkaisijoiden kokojakaumat ovat yleensä lähellä logaritmista normaalijakaumaa.

Kaikkien kuitujen pituuden ja halkaisijan mittaaminen on pitkällistä ja aikaavievää, mutta jos vain ne kuidut mitataan, jotka koskettavat äärettömän ohutta viivaa pyyhkäisyelektronimikroskoopin tarkastelukentässä, määrätyn kuidun valinnan todennäköisyys on suhteessa kyseisen kuidun pituuteen. Koska pituus on tätä kautta otettu huomioon pituuspainotetuissa mittauksissa, ainoa tarvittava mittaus on halkaisijan mittaus, jotta voidaan määrittää LWGMD miinus kaksi keskivirhettä.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Hiukkanen: kappale, jonka pituus-leveyssuhde on alle 3:1

Kuitu: kappale, jonka pituus-leveyssuhde (muotosuhde) on vähintään 3:1.

1.3 SOVELTAMISALA JA RAJOITUKSET

Menetelmä on suunniteltu määrittämään halkaisijoiden kokojakaumat, kun keskihalkaisija on välillä 0,5 μm – 6 μm. Tätä suurempia halkaisijoita voidaan mitata käyttämällä pienempiä pyyhkäisyelektronimikroskoopin suurennuksia, mutta menetelmän tarkkuus vähenee siirryttäessä pienempiin halkaisijoihin. Jos keskihalkaisija on alle 0,5 μm, suositellaan läpäisyelektronimikroskoopin käyttöä.

▼M1

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Kuituhuovasta tai irtonaisesta bulkkikuidusta otetaan useita edustavia kairausnäytteitä. Näytteiden pituutta lyhennetään murskaamalla, ja edustava näyte dispergoidaan veteen. Näytteestä otetaan osanäytteet, jotka suodatetaan polykarbonaattisuodattimen läpi (huokoskoko 0,2 μm) ja preparoidaan pyyhkäisyelektronimikroskoopilla tehtävää tutkimusta varten. Kuitujen halkaisijat mitataan vähintään suurennuksella 10 000 x ([1]) käyttäen viivan leikkauspistettä käyttävää menetelmää, jotta keskihalkaisija voidaan estimoida harhattomasti. Alempi 95 prosentin luottamustaso määritetään (yksipuolisen testin perusteella), jotta saadaan estimaatti materiaalin kuitujen halkaisijan geometrisen keskiarvon alimmasta arvosta.

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Turvallisuus ja varotoimet**

Fyysinen altistus ilmassa leijuville kuiduille on minimoitava ja kuivien kuitujen käsittelyssä on käytettävä veto- tai hansikaskaappia. Fyysistä altistusta on seurattava määrävälein, jotta voidaan määrittää turvamenetelmien tehokkuus. Keinotekoisia mieneraalikuituja käsiteltäessä on käytettävä kertakäyttöhansikkaita ihoärsytyksen ehkäisemiseksi ja ristikontaminaation estämiseksi.

1.5.2 **Laitteet**

— Puristin ja puristusmuotit (paine 10 MPa)

— polykarbonaattisuodattimet, joiden halkaisija on 25 mm ja joissa on kapillaarihuokoset (huokoskoko 0,2 μm)

— selluloosaesterisuodatin (huokoskoko 5 μm) varasuodattimena

— lasinen suodatuslaite (tai kertakäyttösuodatinjärjestelmä), joka soveltuu halkaisijaltaan 25 mm:n kokosille suodattimille (esim. Milliporen lasinen mikroanalyysijärjestelmä, tyyppi XX10 025 00)

— vastatislattu vesi, joka on suodatettu (huokoskoko 0,2 μm) mikro-organismien poistamiseksi

— päällystyslaite (kulta tai kulta/palladium)

— pyyhkäisyelektronimikroskooppi, jonka erotuskyky 10 nm ja suurennus 10 000 x

— spaattelit, skalpelli (tyyppi 24), pinsetit, pyyhkäisyelektronimikroskoopin putket, hiililiima tai -teippi, kolloidinen hopea

— ultraäänisondi tai ultraäänihaude

— kairauslaite tai korkkipora kairausnäytteiden ottamiseksi kuituhuovasta.

([1]) Suurennus on tarkoitettu 3 μm:n kuiduille; 6 μm:n kuiduille voi soveltua paremmin suurennus 5 000 ×.

▼**M1**

1.5.3 **Testimenettely**

1.5.3.1 *Näytteenotto*

Kuituhuovasta tai -levystä otetaan näytteet 25 mm:n kairalla tai korkkiporalla. Näytteet pitäisi ottaa tasaisin välimatkoin, jos huopa on lyhyt, tai sattumanvaraisesti valituilta alueilta, jos huopa on pitkä. Samoja välineitä voidaan käyttää sattumanvaraisten näytteiden ottamiseksi irrallisesta kuidusta. Näytteitä on mahdollisuuksien mukaan otettava kuusi siten, että otetaan huomioon bulkkimateriaalin spatiaalinen vaihtelu.

Kaikki kuusi kairausnäytettä murskataan halkaisijaltaan 50:mm kokoisessa puristusmuotissa paineella 10 Mpa. Materiaali sekoitetaan spaattelilla ja puristetaan uudelleen paineella 10 MPa. Sen jälkeen materiaali poistetaan puristusmuotista ja varastoidaan sinetöityyn lasipulloon.

1.5.3.2 *Näytteiden preparointi*

Orgaaninen sideaine voidaan tarvittaessa poistaa panemalla kuitu uuniin (lämpötila 450 °C) noin tunniksi.

Näytteestä muodostetaan kartio, joka ositetaan neljään osaan (tämä olisi tehtävä vetokaapin sisällä).

Pieni määrä < 0,5 g) näytettä lisätään spaattelilla 100 ml:aan vastatislattua vettä, joka on suodatettu kalvosuodattimen läpi (huokoskoko 0,2 μm) (myös muulla tavalla valmistettua ultrapuhdasta vettä voidaan käyttää, jos sen voidaan osoittaa olevan tarkoitukseen sopivaa). Näyte dispergoidaan kokonaan ultraäänisondilla, jota käytetään 100 W:n teholla ja sellaisella säädöllä, että syntyy kavitaatiota. (Jos sondia ei ole käytettävissä, käytetään seuraavaa menetelmää: ravistellaan ja käännellään ylösalaisin 30 sekunnin ajan, pannaan viideksi minuutiksi ultraäänihauteeseen ja ravistellaan ja käännellään ylösalaisin uudelleen 30 sekunnin ajan.)

Välittömästi näytteen dispergoinnin jälkeen siitä otetaan osanäytteet (esim. kolme näytettä, 3, 6 ja 10 ml) käyttämällä leveäsuista pipettiä (kapasiteetti 2–5 ml).

Kukin osanäyte suodatetaan polykarbonaattivakuumisuodattimella (huokoskoko 0,2 μm), jonka yhteydessä on MEC-varmistussuodatin (huokoskoko 5 μm), käyttämällä 25 mm:n lasista suodatinsuppiloa, jossa on sylinterimäinen säiliö. Suppiloon pannaan noin 5 ml suodatettua tislattua vettä, ja osanäyte pipetoidaan hitaasti veteen pitäen pipetin päätä meniskuksen alla. Pipetti ja säiliö huuhdellaan perusteellisesti pipetoinnin jälkeen, koska ohuet kuidut jäävät usein pintoihin.

Suodatin poistetaan varovasti ja erotetaan varmistussuodattimesta ennen sen asettamista kuivumaan.

▼M1

Suodatinkalvolla olevasta saostumasta leikataan neljäsosa tai puolet skalpellilla (tyyppi 24) käyttämällä edestakaista liikettä. Leike kiinnitetään varovasti pyyhkäisyelektronimikroskoopin näytealustalle hiiliteipillä tai -liimalla. Kolloidihopeaa aplikoidaan vähintään kolmeen paikkaan, jotta sähkökontakti olisi parempi suodattimen ja näytealustan reunoilla. Kun liima tai kolloidinen hopea on kuivunut, kerroksen pinta päällystetään kullalla tai kulta-palladiumseoksella (paksuus noin 50 nm).

1.5.3.3 *Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kalibrointi ja käyttö*

1.5.3.3.1 K a l i b r o i n t i

Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kalibrointi on tarkistettava vähintään kerran viikossa (mieluiten kerran päivässä) käyttämällä sertifioitua kalibraattoria. Kalibrointi on tarkistettava sertifioituihin standardiarvoihin nähden, ja jos mitattu arvo ei ole ± 2 % sertifioidusta arvosta, kalibrointia on säädettävä ja se on tarkistettava uudelleen.

Pyyhkäisyelekronimikroskoopin erotuskyvyn on oltava vähintään sellainen, että sillä pystytään erottamaan 0,2 μm:n halkaisija (aito näytematriisi), kun suurennus on 2 000 x.

1.5.3.3.2 K ä y t t ö

Pyyhkäisyelektronimikroskooppia pitäisi käyttää suurennuksella 10 000 x olosuhteissa ([1]), jotka mahdollistavat hyvän erotuskyvyn hitailla pyyhkäisynopeuksilla (esim. 5 sekuntia/pyyhkäisy). Vaikka eri pyyhkäiselektronimikroskooppien käyttövaatimukset voivat vaihdella, parhaan näkyvyyden ja erotuskyvyn aikaansaamiseksi atomipainoltaan suhteellisen kevyillä materiaaleilla olisi käytettävä kiihdytysjännitettä 5–10 keV sekä pientä pyyhkäisypisteen kokoa ja lyhyttä työskentelyetäisyyttä. Suoritettaessa lineaarista pyyhkäisyä pitäisi käyttää 0^{o}:n kallistuskulmaa uudelleenfokusoinnin minimoimiseksi, tai jos pyyhkäisyelektronimikroskoopissa on eusentrinen objektipöytä, tulisi käyttää eusentristä työskentelyetäisyyttä. Pienempää suurennusta voidaan käyttää, jos materiaali sisältää ainostaan suuria kuituja (halkaisija > 5 μm).

1.5.3.4 *Koon määritys*

1.5.3.4.1 T u t k i m u s p i e n i l l ä s u u r e n n u k s i l l a n ä y t t e e n a r v i o i m i s e k s i

Näyte arvioidaan aluksi pienillä suurennuksilla. Tällöin tarkistetaan, onko näytteessä suurien kuitujen rykelmiä, ja arvioidaan kuitujen tiheys. Jos kuidut esiintyvät paljon rykelminä, suositellaan uuden näytteen ottamista.

Tilastotulosten luotettavuuden takaamiseksi on mitattava riittävästi kuituja. Suuri kuitujen tiheys voi näyttää tämän vuoksi tarpeelliselta, koska tyhjien kenttien tutkimimen on aikaavievää eikä tue analyysiä. Jos suodatin on kuitenkin ylikuormattu, on vaikea mitata kaikkia mitattavissa olevia kuituja, ja koska suuret kuidut voivat peittää näkyvistä pienemmät kuidut, pienemmät kuidut voivat jäädä mittaamatta.

([1]) 3 μm:n kuitujen osalta ks. edellinen alaviite.

▼**M1**

LWGMD-arvon yliarvioiminen voi johtua kuitujen tiheyksistä, jotka ovat yli 150 kuitua yhtä lineaarisen pyyhkäisyn millimetriä kohti. Toisaalta pienet tiheydet pidentävät analyysiin tarvittavaa aikaa. Siksi on usein kustannustehokkaampaa preparoida näyte, jossa kuitujen tiheys on lähempänä optimia, kuin jatkaa mittauksia tiheyden ollessa pieni. Optimitiheys on sellainen, että yhtä näkökenttää kohti on keskimäärin yksi tai kaksi mitattavissa olevaa kuitua suurennuksella 5 000 x. Optimitiheys riippuu kuitenkin kuitujen koosta (halkaisijasta), joten tutkijan on harkittava, onko kuitujen tiheys optimaalinen vai ei.

1.5.3.4.2 Kuitujen halkaisijan pituuspainotus

Vain ne kuidut lasketaan, jotka koskettavat (äärettömän) ohutta viivaa (tai leikkaavat sen) pyyhkäisyelektronimikroskoopin näkökentässä. Tätä varten näkökentän keskustan yli vedetään vaakasuora (tai pystysuora) viiva.

Vaihtoehtoisesti näkökentän keskelle asetetaan yksi piste ja käynnistetään jatkuva pyyhkäisy yhteen suuntaan suodattimen yli. Jokainen kuitu, jonka muotosuhde on yli 3:1 ja joka koskettaa tätä pistettä tai leikkaa sen, mitataan ja kirjataan.

1.5.3.4.3 Kuitujen koon määritys

Suositellaan, että vähintään 300 kuitua mitataan. Kukin kuitu mitataan vain kerran kohdassa, jossa se leikkaa kentässä olevan viivan tai pisteen (tai leikkauskohtaa lähellä olevassa kohdassa, jos kuidun reunat peittyvät näkyvistä). Jos kuidun poikkileikkaukset eivät ole kauttaaltaan samat, on käytettävä mittausta, joka edustaa kuidun keskiarvoa. Reuna on määriteltävä huolellisesti ja mitattava lyhyin välimatka kuidun reunojen välillä. Mittaukset voidaan tehdä suoraan tai (valo)kuvista. Käytettäväksi suositellaan puoliautomaattisia mittausjärjestelmiä, jotka lataavat tiedot suoraan laskentataulukkoon, koska ne säästävät aikaa, eliminoivat kopiointivirheiden mahdollisuuden, ja laskenta voidaan automatisoida.

On tarkistettava pienellä suurennuksella, että pitkien kuitujen päät eivät kierry takaisin mittauskenttään ja että ne mitataan vain kerran.

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Kuitujen halkaisijat eivät tavallisesti edusta normaalijakaumaa. Logaritmimuunnoksen avulla on kuitenkin mahdollista saada jakauma, joka on lähellä normaalijakaumaa.

Lasketaan n kuitujen halkaisijan (D) luonnollisten logaritmien (lnD) aritmeettinen keskiarvo (keskiarvo lnD) ja keskihajonta (SD_{lnD}).

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Keskihajonta jaetaan mittausten lukumäärän (n) neliöjuurella keskivirheen (SE_{lnD}) määrittämiseksi.

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Vähennetään keskiarvosta 2 x keskivirhe ja määritetään tämän arvon (keskiarvo miinus 2 x keskivirhe) eksponenttiarvo, mikä antaa geometrisen keskiarvon miinus 2 x geometrinen keskivirhe.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mittl. } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RAPORTOINTI**

TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava ainakin seuraavat tiedot:

— arvo LWGMD miinus 2 x keskivirhe

— mahdolliset poikkeamiset testimenettelystä (erityisesti ne, joilla voi olla vaikutusta tulosten tarkkuuteen tai luotettavuuteen) perusteluineen.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23 JAKAANTUMISKERROIN (1-OKTANOLI-VESI): HITAAN SEKOITUKSEN MENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 123 (2006). 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen (P_{ow}) arvot on määritetty tarkasti log P_{ow} 8,2 -arvoon asti hitaan sekoituksen menetelmällä (1). Näin ollen se on sopiva kokeellinen lähestymistapa erittäin hydrofobisten aineiden P_{ow}-arvon suoraan määrittämiseen.

2. Muita menetelmiä 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen (P_{ow}) määrittämistä varten ovat ravistuspullomenetelmä (2) sekä P_{ow}-arvon määrittäminen käänteisfaasi-HPLC:n retentiokäyttäytymisestä (3). Ravistuspullomenetelmä on altis virheille, mikä johtuu oktanolin mikropisaroiden siirtymisestä vesifaasiin. Suurenevien P_{ow}-arvojen yhteydessä näiden pisaroiden esiintyminen vesifaasissa johtaa siihen, että testiaineen pitoisuus vedessä arvioidaan liian suureksi Sen vuoksi tämän menetelmän käyttö on rajattu aineisiin, joiden log P_{ow} -arvo on pienempi kuin 4. Toinen menetelmä perustuu suoraan määritetyistä P_{ow}-arvoista saatuihin varmoihin tietoihin, jolloin HPLC-retentiokäyttäytymisen ja mitattujen P_{ow}-arvojen välinen suhde voidaan kalibroida. Saatavilla oli OECD:n ohjeluonnos ionisoituvien aineiden 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen määrittämiseen (4), mutta sitä ei tule enää käyttää.

3. Tämä testimenetelmä on kehitetty Alankomaissa. Tässä kuvattujen menetelmien tarkkuus on validoitu ja optimoitu laboratorioiden välisessä validointitutkimuksessa, johon osallistui 15 laboratoriota (5).

ALUSTAVAT HUOMIOT

Merkitys ja käyttö

4. Inerttien orgaanisten aineiden yhteydessä on löydetty erittäin merkittäviä suhteita 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimien (P_{ow}) ja niiden kaloihin kohdistuvan biokertyvyyden väliltä. Lisäksi on osoitettu, että P_{ow}-arvo korreloi kaloihin kohdistuvaan myrkyllisyyteen sekä kemikaalien imeytymiseen kiinteään ainekseen, kuten maaperään ja sedimentteihin. Viitteessä (6) on esitetty kattava yhteenveto näistä suhteista.

5. 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen ja aineen muiden, ympäristömyrkyllisyyden ja kemian kannalta tärkeiden ominaisuuksien väliltä on määritetty monia erityyppisiä suhteita. Tämän vuoksi 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimesta on tullut keskeinen parametri kemikaalien ympäristöriskien arvioinnissa sekä kemikaalien ympäristövaikutusten ennustamisessa.

Soveltamisala

6. Hitaan sekoituksen kokeen oletetaan vähentävän mikropisaroiden muodostumista 1-oktanolipisaroista vesifaasissa. Tämän vuoksi vesipitoisuutta, joka johtuu testiaineen tällaisiin pisaroihin liittyvistä molekyyleistä, ei arvioida liian suureksi. Näin ollen hitaan sekoituksen menetelmä sopii erityisesti sellaisten aineiden P_{ow}-arvon määrittämiseen, joiden oletetut log P_{ow} -arvot ovat vähintään 5, sillä tällaisten aineiden osalta ravistuspullomenetelmä (2) tuottaa helposti virheellisiä tuloksia.

▼M4

MÄÄRITELMÄ JA YKSIKÖT

7. Aineen jakaantumiskerroin veden ja lipofiilisen liuottimen (1-oktanolin) välillä kuvastaa kemikaalin tasapainon jakaantumista kahden faasin välillä. Määritelmän mukaan veden ja 1-oktanolin välinen jakaantumiskerroin (P_{ow}) on testiaineen tasapainopitoisuuksien välinen suhde vedellä kyllästetyssä 1-oktanolissa (C_O) ja 1-oktanolilla kyllästetyssä vedessä (C_W).

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

Pitoisuuksien suhteena se on paljas luku. Yleensä se ilmoitetaan kymmenkantaisena logaritmina (log P_{ow}). P_{ow} on lämpötilasta riippuvainen, ja raportoiduissa tiedoissa on oltava myös mittauslämpötila.

MENETELMÄN PERIAATE

8. Jakaantumiskertoimen määritystä varten vesi, 1-oktanoli ja testiaine tasapainotetaan toistensa kanssa vakiolämpötilassa. Sen jälkeen määritetään testiaineen pitoisuudet kahdessa faasissa.

9. Kokeellisia vaikeuksia, jotka liittyvät mikropisaroiden muodostumiseen ravistuspullokokeen aikana, voidaan vähentää hitaan sekoituksen menetelmällä, jota tässä luvussa kuvataan. Hitaan sekoituksen menetelmässä vesi, 1-oktanoli ja testiaine tasapainotetaan termostaatilla varustetussa sekoitusreaktorissa. Faasien vaihtumista nopeutetaan sekoittamalla. Sekoittaminen saa aikaan rajatun turbulenssin, joka parantaa 1-oktanolin ja veden vaihtumista ilman, että mikropisaroita (1) muodostuu.

TESTIN SOVELTUVUUS

10. Koska muiden aineiden kuin testiaineen läsnäolo saattaa vaikuttaa testiaineen aktiivisuuskertoimeen, testiaine on testattava puhtaana aineena. 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroinkoetta varten on käytettävä puhtainta kaupallisesti saatavilla olevaa ainetta.

11. Tätä menetelmää sovelletaan puhtaisiin aineisiin, jotka eivät dissosioidu tai assosioidu ja jotka eivät vaikuta merkittävästi pintojen väliseen toimintaan. Menetelmää voidaan käyttää tällaisten aineiden ja seosten 1-oktanoli-vesi-jakaantumissuhteen määrittämiseen. Kun menetelmää käytetään seosten yhteydessä, määritetyt 1-oktanoli-vesi-jakaantumissuhteet ovat ehdollisia, ja ne määräytyvät testatun seoksen kemiallisen koostumuksen ja vesifaasina käytetyn elektrolyytin koostumuksen mukaisesti. Lisävaiheita käyttämällä menetelmä soveltuu myös yhdisteiden dissosioimiseen tai assosioimiseen (12 kohta).

12. Koska dissosioituvien aineiden, kuten orgaanisten happojen ja fenoleiden, orgaanisten emästen ja organometallisten aineiden, 1-oktanoli-vesi-jakaantumiseen osallistuvassa vedessä ja 1-oktanolissa on monia tasapainotiloja, 1-oktanoli/vesi-jakaantumissuhde on ehdollinen, ja siihen vaikuttaa vahvasti elektrolyytin koostumus (7) (8). Sen vuoksi 1-oktanoli/vesi-jakaantumissuhteen määrittäminen edellyttää, että pH:ta ja elektrolyytin koostumusta seurataan kokeen aikana, ja niitä koskevat tiedot on raportoitava. Näiden jakaantumissuhteiden arvioinnissa on käytettävä asiantuntijoita. Sopivat pH-arvot on valittava dissosiaatiovakion (-vakioiden) arvoa käyttämällä, jotta jakaantumissuhde voidaan määrittää jokaista ionisaatiotilaa varten. Organometallisia yhdisteitä (8) käytettäessä on käytettävä ei-kompleksoivia puskureita. Kun otetaan huomioon nykyinen tietämys vesikemiasta (muodostumisvakiot, dissosiaatiovakiot), koeolosuhteet on valittava siten, että testiaineen spesifikaatio vesifaasissa voidaan arvioida. Ionivahvuuden on oltava sama kaikissa kokeissa, mikä saadaan aikaan käyttämällä taustaelektrolyyttiä.

▼M4

13. Testattaessa aineita, joiden vesiliukoisuus on huono tai P_{ow}-arvo suuri, voi ilmetä ongelmia, sillä kun pitoisuudet vedessä ovat hyvin pieniä, niiden määrittäminen tarkasti on vaikeaa. Tässä testimenetelmäkuvauksessa annetaan myös ohjeita tämän ongelman ratkaisemiseen.

TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

14. Kemiallisten reagenssien on oltava analyysilaatua tai sitä puhtaampia. On suositeltavaa käyttää merkitsemättömiä, koostumukseltaan tunnettuja ja mieluiten vähintään 99-prosenttisen puhtaita testiaineita tai koostumukseltaan ja radiokemialliselta puhtaudeltaan tunnettuja radioaktiivisesti merkittyjä testiaineita. Jos merkkiaineiden puoliintumisajat ovat lyhyitä, on tehtävä hajoamiskorjauksia. Radioaktiivisesti merkittyjen testiaineiden yhteydessä on käytettävä kemiallisesti tarkkaa analyysimenetelmää, jotta voidaan varmistaa, että mitattu radioaktiivisuus liittyy suoraan testiaineeseen.

15. Arvio log P_{ow} -arvosta voidaan hankkia käyttämällä kaupallisesti saatavia ohjelmia, jotka on tarkoitettu log P_{ow} -arvon estimointiin, tai käyttämällä liukoisuuksien suhdetta kummassakin liuottimessa.

16. Testiaineesta on oltava seuraavat tiedot saatavilla ennen P_{ow}-arvon määrittämiseen tarkoitetun hitaan sekoituksen kokeen toteuttamista:

a) rakennekaava

b) sopivat analyysimenetelmät aineen pitoisuuden määrittämiseen vedessä ja 1-oktanolissa

c) ionisoituvien aineiden dissosiaatiovakio(t) (OECD:n ohje 112 (9))

d) vesiliukoisuus (10)

e) abioottinen hydrolyysi (11)

f) biologinen hajoavuus (12)

g) höyrynpaine (13).

MENETELMÄN KUVAUS

Välineet ja laitteet

17. Kokeeseen tarvitaan vakiolaboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

— magneettisekoittimia ja teflonpäällysteisiä magneettisekoitinsauvoja vesifaasin sekoittamista varten

— analyysivälineet, jotka soveltuvat testiaineen konsentraation määrittämiseen oletettuina pitoisuuksina

— sekoitusastia, jossa on hana pohjassa. Testiyhdisteen arvioidun log P_{ow} -arvon ja havaitsemisrajan (LOD:n) mukaan on harkittava samanmuotoisen, tilavuudeltaan yli litran suuruisen reaktioastian käyttämistä, jotta kemiallista erottelua ja analyysia varten saadaan riittävästi vettä. Tällöin vesiuutteen pitoisuudet ovat suurempia, jolloin analyyttinen määrittäminen on luotettavampaa. Lisäyksessä 1 on taulukko, jossa esitetään arviot tarvittavasta vähimmäismäärästä, yhdisteen havaitsemisraja, sen arvioitu log P_{ow} sekä sen vesiliukoisuus. Taulukko perustuu log P_{ow} -arvon ja oktanoli- ja vesiliukoisuuksien väliseen suhteeseen Pinsuwanin ja muiden mukaan (14):

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

▼M4

kun

$SR = S_{oct}/S_w$ (yksikkönä molaarisuus);

sekä Lymanin (15) esittämään suhteeseen, joka liittyy vesiliukoisuuden ennustamiseen. Lisäyksessä 1 olevalla yhtälöllä laskettuja vesiliukoisuuksia on pidettävä alustavana arviona. Todettakoon, että käyttäjä voi laatia arvion vesiliukoisuudesta käyttämällä mitä tahansa suhdetta, jonka käyttäjä katsoo edustavan hydrofobisuuden ja liukoisuuden suhdetta paremmin. Esimerkiksi kiinteiden yhdisteiden osalta on suositeltavaa, että liukoisuuden ennustamisessa käytetään myös sulamispistettä. Kun käytetään muunnettua yhtälöä, on varmistettava, että oktanolissa liukoisuuden laskemisessa käytetty yhtälö on edelleen validi. Lisäyksessä 2 on kaaviokuva lasisesta sekoitusastiasta, jonka tilavuus on noin yksi litra. Lisäyksessä 2 olevan astian mittasuhteet ovat osoittautuneet suotuisiksi, ja ne on säilytettävä, jos käytetään erikokoista laitetta.

— On tärkeää, että lämpötila pidetään vakiona hitaan sekoituksen kokeen aikana jollakin tavalla.

18. Astioiden on oltava valmistettu inertistä materiaalista, jotta imeytyminen astian pintoihin on mahdollisimman vähäistä.

Testiliuosten valmisteleminen

19. P_{ow}-arvo on määritettävä puhtaimmalla 1-oktanolilla (vähintään + 99 prosenttia), jota on saatavilla kaupallisesti. 1-oktanolin puhdistaminen happo-, emäs- ja vesiuutolla ja sen jälkeinen kuivaaminen on suositeltavaa. 1-oktanolin puhdistamiseen voidaan käyttää myös tislausta. Puhdistettua 1-oktanolia käytetään testiaineiden standardiliuosten valmistamiseen. P_{ow}-arvon määrittämisessä käytettävän veden on oltava lasi- tai kvartsilaitteessa tislattua tai puhdistusjärjestelmästä hankittua. Myös HPLC-laatuista vettä voi käyttää. Tislattu vesi on suodatettava 0,22 mm:n suodattimen läpi, ja sokeanäytteillä on varmistettava, ettei konsentroiduissa uutteissa ole epäpuhtauksia, jotka voivat vaikuttaa testiaineeseen. Jos käytetään lasikuitusuodatinta, se on puhdistettava kuumentamalla sitä uunissa vähintään kolme tuntia 400 °C:ssa.

20. Molemmat liuottimet kyllästetään ennen koetta tasapainottamalla ne riittävän suuressa astiassa. Tämä tehdään sekoittamalla kaksifaasijärjestelmää hitaasti kahden päivän ajan.

21. Riittävä pitoisuus testiainetta valitaan ja liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä). 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin täytyy määrittää 1-oktanolin ja veden laimeissa liuoksissa. Sen vuoksi testiaineen pitoisuus saa olla kummassakin faasissa enintään 70 prosenttia sen liukoisuudesta, kun enimmäiskonsentraatio on 0,1 M (1). Kokeessa käytettävissä 1-oktanoliliuoksissa ei saa olla suspendoitunutta kiinteää testiainetta.

22. Riittävä pitoisuus testiainetta liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä). Jos log P_{ow} -arvon estimaatti on suurempi kuin viisi, on varmistettava huolella, ettei kokeessa käytetyissä 1-oktanoliliuoksissa ole suspendoitunutta kiinteää testiainetta. Tätä varten sovelletaan jäljempänä kuvattua menetelmää, joka koskee sellaisia kemikaaleja, joiden arvioitu log P_{ow} -arvo on suurempi kuin 5:

— Testiaine liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä).

▼M4

— Liuoksen annetaan seistä riittävä aika, jotta suspendoitunut kiinteä aines saostuu. Testiaineen pitoisuutta seurataan saostumisen aikana.

— Kun 1-oktanoliliuoksesta mitattujen pitoisuuksien arvot ovat vakiintuneet, kantaliuos laimennetaan sopivalla määrällä 1-oktanolia.

— Laimennetun kantaliuoksen pitoisuus mitataan. Jos mitattu pitoisuus on yhdenmukainen laimennuksen kanssa, laimennettua kantaliuosta voidaan käyttää hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävässä kokeessa.

Näytteiden uutto ja analysointi

23. Testiaineen määrityksissä on käytettävä validoitua analyysimenetelmää. Tutkijoiden on esitettävä todisteet siitä, että pitoisuudet vedellä kyllästetyssä 1-oktanolissa ja 1-oktanolilla kyllästetyssä vesifaasissa ovat kokeen aikana käytettyjen analyysimenetelmien määritysrajaa suuremmat. Testiaineen saanto on analysoitava vesifaasista ja 1-oktanolifaasista ennen kokeen suorittamista niissä tapauksissa, joissa tarvitaan uuttomenetelmiä. Analyyttiset signaalit on korjattava nollakokeita varten, ja on syytä varmistaa, ettei yhdestä näytteestä peräisin oleva analyytti voi kontaminoida toista analyyttia.

24. Vesifaasin uutto orgaanisella liuottimella ja uutteen esikonsentrointi on todennäköisesti tarpeen ennen analyysia, koska hydrofobisten testiaineiden pitoisuudet ovat melko pienet vesifaasissa. Samasta syystä mahdollisten nollanäytteiden pitoisuuksia täytyy pienentää. Siinä on käytettävä erittäin puhtaita liuottimia, ensisijaisesti sellaisia, jotka on tarkoitettu jäämien analysointiin. Myös työskentely huolellisesti esipuhdistetuilla (esimerkiksi liuotinpesulla tai korkeassa lämpötilassa kuumentamalla) lasivälineillä voi auttaa välttämään ristikontaminaatiota.

25. Estimaatti log P_{ow} -arvosta voidaan hankkia estimointiohjelman tai asiantuntija-arvion avulla. Jos arvo on suurempi kuin kuusi, nollakokeen korjauksia ja analyyttien siirtymistä on seurattava tiiviisti. Vastaavasti myös silloin, kun log P_{ow} -arvo on suurempi kuin kuusi, standardin (surrogaatin) käyttäminen saannon korjaamisessa on pakollista suurten esikonsentrointikertoimien saavuttamiseksi. Saatavilla on kaupallisia ohjelmia log Pow -arvon estimointiin ([1]), esimerkiksi Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) ja ACD log P (19). Erilaisia estimointitapoja on kuvattu viitteissä (20–22).

26. Testiaineen pitoisuuden määrittämisessä 1-oktanolissa ja vedessä käytettävät määritysrajat (LOQ) selvitetään hyväksytyillä menetelmillä. Pääsääntö on se, että määritysraja voidaan määrittää sellaiseksi pitoisuudeksi vedessä tai 1-oktanolissa, joka tuottaa signaali-kohinasuhteeksi kymmenen. On valittava sopiva uutto- ja esikonsentrointimenetelmä, ja myös analyyttiset saannot on täsmennettävä. On valittava myös sopiva esikonsentrointikerroin, jotta analyyttisen määrityksen perusteella saadaan vaaditun kokoinen signaali.

([1]) Näiden tietojen tarkoituksena on vain helpottaa käyttäjän työtä. Muita vastaavia tietokoneohjelmia voi käyttää, jos voidaan osoittaa, että ne antavat samat tulokset.

▼M4

27. Analyysimenetelmän parametrien ja oletettujen pitoisuuksien perusteella määritetään likimääräinen näytekoko, jota yhdisteen pitoisuuden tarkka määrittäminen edellyttää. On vältettävä käyttämästä sellaisia vesinäytteitä, jotka ovat liian pieniä riittävän analyyttisen signaalin tuottamiseksi. Toisaalta myös liian suurten vesinäytteiden käyttämistä on vältettävä, koska muuten voi jäädä liian vähän vettä käytettäväksi vaadittujen analyysien vähimmäismäärän toteuttamiseksi (n = 5). Lisäyksessä 1 vähimmäisnäytemäärä on ilmoitettu astian tilavuuden, testiaineen havaitsemisrajan ja testiaineen liukoisuuden funktiona.

28. Testiaineiden kvantifiointi tehdään vertailemalla kunkin yhdisteen kalibrointikäyriä. Analysoitujen näytteiden pitoisuuksien on oltava standardien pitoisuusalueella.

29. Sellaisten testiaineiden osalta, joiden log P_{ow} -estimaatti on suurempi kuin kuusi, surrogaattistandardi on lisättävä vesinäytteeseen ennen uuttoa, jotta voidaan kirjata vesinäytteiden uuton ja esikonsentroinnin aikana tapahtuvat hävikit. Jotta saanto voidaan korjata tarkasti, surrogaateilla on oltava hyvin samankaltaiset tai identtiset ominaisuudet kuin testiaineella. Tähän tarkoitukseen on käytettävä ensisijaisesti (vakaita) kyseisten aineiden isotooppimerkittyjä analogeja (esimerkiksi deuteroituja tai ^{13}C-leimattuja). Jos leimattuja vakaita isotooppeja, kuten ^{13}C:ta tai ^{2}H:ta ei voida käyttää, on osoitettava luotettavien kirjallisuustietojen perusteella, että surrogaatin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ovat hyvin samanlaiset kuin testiaineen. Vesifaasin neste-neste-uuton aikana voi muodostua emulsioita. Sitä voidaan vähentää lisäämällä suolaa ja antamalla emulsion seistä yön yli. Näytteiden uuttoon ja esikonsentrointiin käytetyt menetelmät on ilmoitettava.

30. 1-oktanolifaasista otetut näytteet voi tarvittaessa laimentaa sopivalla liuottimella ennen analyysia. Lisäksi on suositeltavaa käyttää surrogaattistandardeja saannon korjaamiseen sellaisten aineiden yhteydessä, joiden saantokokeet osoittivat, että kokeissa esiintyy suurta vaihtelua (suhteellinen keskihajonta > 10 %).

31. Analyysimenetelmä on kuvattava yksityiskohtaisesti. Tähän sisältyvät uuttomenetelmä, esikonsentrointi ja laimennuskertoimet, instrumenttiparametrit, kalibrointirutiini, kalibrointialue, testiaineen saanto vedestä analysoituna, saannon korjaamiseksi lisätyt surrogaattistandardit, nollanäytteet, havaitsemisraja ja määritysrajat.

Testin suorittaminen

Optimaaliset 1-oktanolin ja veden tilavuuden suhteet

32. Valittaessa veden ja 1-oktanolin tilavuuksia on otettava huomioon määritysraja l-oktanolissa ja vedessä, vesinäytteisiin sovelletut esikonsentrointikertoimet, 1-oktanolista ja vedestä kerättyjen näytteiden määrä sekä odotuksenmukaiset pitoisuudet. Kokeeseen liittyvistä syistä 1-oktanolin tilavuus hitaan sekoituksen menetelmässä on valittava siten, että 1-oktanolikerros on riittävän paksu (> 0,5 cm), jotta 1-oktanolifaasista voidaan ottaa näyte häiritsemättä sitä.

33. Tyypilliset faasien tilavuudet, joita käytetään sellaisten yhdisteiden määrityksissä, joiden log P_{ow} -arvot ovat vähintään 4,5, ovat 20–50 ml 1-oktanolia ja 950–980 ml vettä yhden litran astiassa.

▼M4

Testiolosuhteet

34. Testin aikana reaktioastiaa säädellään termostaatilla, jotta lämpötilan vaihtelu voidaan pitää pienempänä kuin 1 °C. Testi on tehtävä 25 °C:n lämpötilassa.

35. Koejärjestelmä on suojattava päivänvalolta joko tekemällä koe pimeässä huoneessa tai peittämällä reaktioastia alumiinifoliolla.

36. Koe on tehtävä pölyttömässä ympäristössä (mikäli mahdollista).

37. 1-oktanoli-vesi-järjestelmää sekoitetaan, kunnes tasapainotila saavutetaan. Pilottikokeessa tasapainotilan saavuttamiseen kuluvaa aikaa arvioidaan toteuttamalla hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävä koe ja ottamalla säännöllisesti näytteitä vedestä ja 1-oktanolista. Näytteet on otettava vähintään viiden tunnin mittaisen ajanjakson aikana.

38. Jokainen P_{ow}-arvo on määritettävä käyttämällä vähintään kolmea toisistaan riippumatonta hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävää koetta.

Tasapainotilan saavuttamisajan määrittäminen

39. Tasapainotila oletetaan saavutetuksi, kun 1-oktanolin ja veden pitoisuussuhde aikaan nähden neljän aikapisteen pituisella ajanjaksolla tuottaa tulokseksi kulmakertoimen, joka ei eroa merkittävästi nollasta, kun $p = 0,05$. Tasapainotilan saavuttamisessa vähimmäisaika on yksi päivä, ennen kuin näytteenoton voi aloittaa. Pääsääntö on se, että sellaisista aineista, joiden log P_{ow} -estimaatti on pienempi kuin viisi, voidaan ottaa näytteitä toisena ja kolmantena päivänä (päivät 2 ja 3). Tavallista hydrofobisempien yhdisteiden kohdalla tasapainotilan saavuttaminen saattaa kestää kauemmin. Yhdisteellä, jonka log P_{ow} -arvo oli 8,23 (dekaklorobifenyyli), tasapainotilan saavuttaminen kesti 144 tuntia. Tasapainotilaa arvioidaan ottamalla jokaisesta astiasta toistuvasti näytteitä.

Kokeen aloittaminen

40. Kokeen alussa reaktioastia täytetään 1-oktanolilla kyllästetyllä vedellä. Termostaatilla säädetyn lämpötilan saavuttamiseen on varattava riittävästi aikaa.

41. Haluttu määrä testiainetta (joka on liuotettu tarvittavaan määrään vedellä kyllästettyä 1-oktanolia) lisätään reaktioastiaan varovasti. Tämä on tärkeä vaihe kokeessa, koska on vältettävä sekoittamasta näitä kahta faasia siten, että syntyy pyörteisyyttä. Sitä varten 1-oktanolifaasi voidaan pipetoida hitaasti koeastian seinää vasten lähellä veden pintaa. Se valuu hitaasti lasiseinää pitkin ja muodostaa kalvon vesifaasin yläpuolelle. 1-oktanolin dekantointia suoraan pulloon on aina vältettävä, sillä 1-oktanolipisaroita ei saa tippua suoraan veteen.

42. Sekoittamisen aloituksen jälkeen sekoitusnopeutta on lisättävä hitaasti. Jos sekoitusmoottoreita ei voida säätää asianmukaisesti, on harkittava muuntajan käyttöä. Sekoitusnopeutta on mukautettava siten, että veden ja 1-oktanolin yhtymäkohtaan muodostuu vortex-ilmiö, jonka syvyys on vähintään 0,5 cm ja enintään 2,5 cm. Sekoitusnopeutta on pienennettävä, jos vortex-ilmiön syvyys ylittää 2,5 cm. Muutoin 1-oktanolipisaroista saattaa muodostua vesifaasiin mikropisaroita, jolloin testiaineen pitoisuus vedessä arvioidaan liian suureksi. Laboratorioiden välisen validointitutkimuksen (5) löydösten perusteella enimmäissekoitusnopeudeksi suositellaan 2,5 cm:ä. Se on kompromissi, jolla varmistetaan nopea tasapainottuminen ja rajoitetaan 1-oktanolin mikropisaroiden muodostumista.

▼M4

Näytteenotto ja näytteiden käsittely

43. Sekoitin on kytkettävä pois päältä ennen näytteenottoa, ja nesteiden liikkeen on annettava pysähtyä. Kun näytteet on otettu, sekoitin käynnistetään uudelleen hitaasti edellä kuvatun mukaisesti, ja sekoitusnopeutta lisätään vähitellen.

44. Vesifaasin näyte otetaan reaktioastian pohjassa olevan venttiilin kautta. Poista aina hanoissa oleva kuollut tilavuus vettä (lisäyksessä 2 kuvatussa astiassa noin 5 ml). Hanoissa olevaa vettä ei sekoiteta, joten se ei ole tasapainossa bulkin kanssa. Merkitse vesinäytteiden tilavuus ylös ja varmista, että poisheitetyssä vedessä olleen testiaineen määrä otetaan huomioon massatasetta laskettaessa. Haihtumishäviöt on minimoitava antamalla veden virrata hitaasti erotussuppiloon siten, ettei siitä aiheudu vesi-/1-oktanolikerrokseen kohdistuvaa häiriötä.

45. 1-oktanolinäytteet hankitaan ottamalla pieni alikvootti (noin 100 µl) 1-oktanolikerroksesta 100 mikrolitran lasikuitu-metalliruiskulla. Näyte on otettava varovasti siten, ettei rajakohta rikkoudu. Näytenesteen tilavuus merkitään muistiin. Pieni alikvootti riittää, koska 1-oktanolinäyte laimennetaan.

46. Näytteen käsittelyssä on vältettävä tarpeettomia siirtovaiheita. Sitä varten näytteen tilavuus on määritettävä gravimetrisesti. Vesinäytteiden osalta se voidaan tehdä keräämällä vesinäyte erotussuppiloon, jossa jo on tarvittava määrä liuotinta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

47. Nykyisen testimenetelmän mukaan P_{ow}-arvo määritetään tekemällä tutkittavalla yhdisteellä kolme hitaan sekoituksen koetta (kolme kokeellista yksikköä), joissa käytetään identtisiä olosuhteita. Tasapainotilan saavuttamisen osoittamisessa käytettävän regression on perustuttava vähintään neljän peräkkäisistä aikapisteistä tehtyjen Co-/Cw-määrityksen tuloksiin. Näin voidaan laskea varianssi kustakin kokeellisesta yksiköstä saadun keskiarvon epävarmuuden mittana.

48. P_{ow}-arvoa voidaan luonnehtia kustakin kokeellisesta yksiköstä saatujen tietojen varianssilla. Tämän tiedon avulla lasketaan P_{ow}-arvo yksittäisten kokeellisten yksikköjen tulosten painotettuna keskiarvona. Sitä varten painona käytetään kokeellisten yksikköjen tulosten varianssin käänteislukua. Tällä tavalla tiedot, joiden variaatio (joka ilmaistaan varianssina) on suuri ja jotka ovat siten vähemmän luotettavia, vaikuttavat tulokseen vähemmän kuin tiedot, joiden varianssi on pieni.

49. Samalla tavalla lasketaan painotettu keskihajonta. Se kuvaa P_{ow}-mittauksen toistettavuutta. Jos painotetun keskihajonnan arvo on pieni, se tarkoittaa, että P_{ow}-arvon määrittämisen toistettavuus oli hyvä yhdessä laboratoriossa. Tietojen muodollista tilastollista käsittelyä selostetaan jäljempänä.

▼M4

Tulosten käsittely

Tasapainotilan saavuttamisen osoittaminen

50. Testiaineen pitoisuuden suhteen logaritmi 1-oktanolissa ja vedessä (log (C_O/C_w)) lasketaan jokaiselta näytteenottokerralta. Kemiallisen tasapainotilan saavuttaminen osoitetaan esittämällä tämä suhde aikaan nähden. Tässä esitystavassa tasanne, joka perustuu vähintään neljään peräkkäiseen aikapisteeseen, osoittaa, että tasapainotila on saavutettu ja että yhdiste on liuennut 1-oktanoliin. Jos näin ei ole, testiä on jatkettava, kunnes neljä peräkkäistä aikapistettä antavat tulokseksi kulmakertoimen, joka ei eroa nollasta huomattavasti p-tason ollessa 0,05, mikä tarkoittaa sitä, että log C_o/C_w ei riipu ajasta.

Log P_{ow} -arvon laskeminen

51. Kokeellisen yksikön log P_{ow} -arvo lasketaan log C_o/C_w -arvon painotettuna keskiarvona log C_o/C_w -käyrän osalle siihen aikaan nähden, jonka osalta tasapainotila on osoitettu saavutetuksi. Painotettu keskiarvo lasketaan painottamalla tietoja varianssin käänteisluvulla, jotta tietojen vaikutus lopputulokseen on käänteisessä suhteessa tietojen epävarmuuteen.

Log P_{ow} -arvon keskiarvo

52. Eri kokeellisten yksiköiden log P_{ow} -arvojen keskiarvo lasketaan yksittäisten kokeellisten yksikköjen tulosten, joita on painotettu niiden variansseilla, keskiarvona.

Keskiarvo lasketaan seuraavan kaavan mukaan:

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

jossa

$\log P_{OW,i}$ = yksittäisen kokeellisen yksikön i log P_{ow} -arvo

$\log P_{OW,Av}$ = yksittäisten log P_{ow} -arvojen painotettu keskiarvo

w_i = kokeellisen yksikön I log P_{ow}-arvolle osoitettu tilastollinen paino.

Log $P_{OW,i}$ -arvon varianssin käänteislukua käytetään muodossa w_i ($w_i = \text{var}\,(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Log P_{ow} -arvojen keskiarvon virhe arvioidaan yksittäisten kokeellisten yksiköiden tasapainotilan saavuttamisen vaiheessa määritetyn log C_o/C_w -arvon toistettavuutena. Se ilmaistaan log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log\ Pow,Av}$) -arvon painotettuna keskihajontana, joka taas on log $P_{OW,Av}$ -arvoon liittyvän virheen mitta. Painotettu keskihajonta voidaan laskea painotetusta varianssista ($var_{\log\ Pow,Av}$) seuraavasti:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Symboli n tarkoittaa kokeellisten yksiköiden lukumäärää.

▼M4

Testiraportti

54. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (katso 17 kohta)

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet)

— merkkiaineella leimatun kemikaalin leiman puhtaus ja molaarinen aktiivisuus (tapauksen mukaan)

— alustava arvio log P_{ow} -arvosta sekä arvon johtamisesssa käytetty menetelmä.

Testiolosuhteet:

— testien suorituspäivämäärät

— lämpötila testin aikana

— 1-oktanolin ja veden tilavuudet testin alussa

— otettujen 1-oktanoli- ja vesinäytteiden tilavuudet

— 1-oktanolin ja veden jäljelle jääneet tilavuudet testiastioissa

— käytettyjen testiastioiden ja sekoitusolosuhteiden kuvaus (sekoitussauvan ja testiastian geometria, vortex-ilmiön korkeus millimetreinä ja sekoitusnopeus, jos saatavilla)

— testiaineen ja määritysrajan määrittämisessä käytetyt analyysimenetelmät

— näytteenottokertojen määrä

— vesifaasin ja käytettyjen puskuriliuosten pH, kun pH:ta on muutettu ionisoituneita molekyylejä varten

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys

— testiaineen määritetyt pitoisuudet 1-oktanolissa ja vedessä ajan funktiona

— massataseen osoittaminen

— lämpötila ja keskihajonta tai lämpötilan vaihteluväli kokeen aikana

— pitoisuussuhteen regressio ajan suhteen

— keskiarvo log $P_{ow,Av}$ ja sen keskivirhe

— tulosten pohdinta ja tulkinta

▼M4

— esimerkkejä edustavan analyysin mittaustuloksista (kaikki mittaustulokset on tallennettava hyvää laboratoriokäytäntöä koskevien periaatteiden mukaisesti), mukaan luettuina surrogaattien saannot, sekä kalibroinnissa käytettyjen tasojen määrä (ja kalibrointikäyrän korrelaatiokerrointa koskevat kriteerit) ja laadunvarmistuksen/laadunvalvonnan tulokset

— jos saatavilla: koemenettelyn validointiraportti (merkitään kirjallisuusviitteisiin).

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499–512.

2) Tämän liitteen luku A.8 Jakaantumiskerroin.

3) Tämän liitteen luku A.8 Jakaantumiskerroin.

4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.

9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

10) Tämän liitteen luku A.6 Vesiliukoisuus.

11) Tämän liitteen luku C.7 Hajoaminen – Abioottinen hajoaminen: Hydrolyysi pH:n funktiona.

12) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys – Osat II–VII (menetelmät A–F).

13) Tämän liitteen luku A.4 Höyrynpaine.

14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.

15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2–1 ja 2–52.

16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.

22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

▼M4

Lisäys 1

Laskentataulukko: sellaisten testiaineiden, joilla on erilaiset log P_{OW} -arvot vesifaasissa, havaitsemisessa tarvittavien vähimmäisvesimäärien laskeminen

Oletukset:

— Yksittäisten alikvoottien enimmäistilavuus = 10 prosenttia kokonaistilavuudesta, viisi alikvoottia = 50 prosenttia kokonaistilavuudesta.

— Testiaineiden pitoisuus = 0,7 × liukoisuus kummassakin faasissa. Jos pitoisuudet ovat alhaisempia, on käytettävä suurempia määriä.

— Havaitsemisrajan määrityksessä käytetty tilavuus = 100 ml.

— log P_{ow} vs. log S_w ja log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) edustavat testiaineiden suhteita riittävästi.

Estimaatti S_w

log P_{ow}	Kaava	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	− 0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	− 0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	− 1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	− 1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	− 2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	− 2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	− 3,192	6,427E-04

Estimaatti S_{oct}

log P_{ow}	Kaava	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88\log SR + 0{,}49$	2.710E+05

▼**M4**

Testiaineen kokonaismassa (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Tilavuuksien laskeminen

H_2O-faasiin tarvittava vähimmäistilavuus kussakin LOD-pitoisuudessa

$\log K_{ow}$	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
LOD:n yhteydessä käytetty tilavuus (l)	0,1					

Laskentaohjeet

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 1 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 2 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 5 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 10 litran tasapainotusastia.

Ylittää 10 prosenttia myös 10 litran tasapainotusastian yhteydessä.

▼M4

Yhteenveto tarvittavista tilavuuksista vesiliukoisuuden ja log P_{ow} -arvon funktiona

H_2O-faasiin tarvittava vähimmäistilavuus kussakin LOD-pitoisuudessa (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

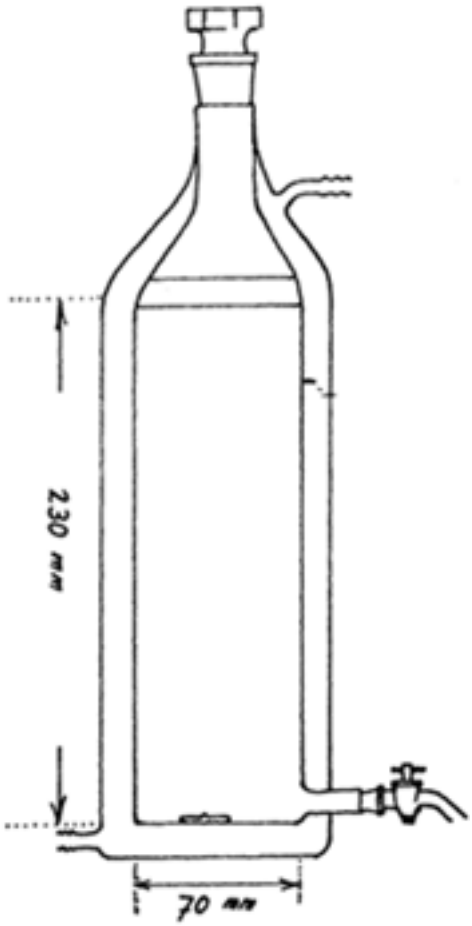
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
LOD:n yhteydessä käytetty tilavuus (l)		0,1					

▼M4

Lisäys 2

Esimerkki lasisesta testiastiasta P_{OW} -arvon määrittämistä varten tarkoitettuun hitaan sekoituksen kokeeseen



▼**M6**

A.24. JAKAANTUMISKERROIN (N-OKTANOLI/VESI), KORKEAN SUORITUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIA (HPLC-MENETELMÄ)

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 117 (2004).

1. Määritelmän mukaan jakaantumiskerroin (P) on liuotetun aineen tasapainopitoisuuksien (ci) välinen suhde kaksifaasijärjestelmässä, jossa on kaksi toisiinsa heikosti sekoittuvaa liuotinta:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanoli}}{C_{\text{vesi}}}$$

Jakaantumiskerroin on siis kahden pitoisuuden välinen suhde ja dimensioton suure, joka ilmoitetaan normaalisti kymmenkantaisena logaritmina.

2. P_{ow} on keskeinen parametri, kun tarkastellaan kemiallisten aineiden kulkeutumista ympäristössä. Aineiden ionisoitumattoman muodon P_{ow}-arvon sekä niiden biokertyvyyden välillä kalojen osalta on osoitettu erittäin merkittävä suhde. On myös osoitettu, että P_{ow} on hyödyllinen parametri, kun ennustetaan adsorptiota maaperään ja sedimentteihin tai todetaan kvantitatiivisia rakenne-aktiivisuussuhteita erilaisten biologisten vaikutusten osalta.

3. Tätä testimenetelmää koskeva alkuperäinen esitys perustui C. V. Eadsforthin ja P. Moserin kirjoittamaan artikkeliin (1). Testimenetelmän kehittämistä sekä OECD-maiden laboratorioiden välistä vertailutestiä koordinoi Saksan liittotasavallan Umweltbundesamt vuonna 1986 (2).

ALUSTAVAT HUOMIOT

4. log P_{ow} -arvot, jotka ovat välillä – 2 … 4 (toisinaan jopa 5 tai enemmän) ([1]), voidaan määrittää kokeellisesti ravistuspullomenetelmällä (tämän liitteen A.8 luku sekä OECD:n testiohje (TG)107). HPLC-menetelmä kattaa log P_{ow} -arvot välillä 0–6 (1), (2), (3), (4), (5). Tämän menetelmän käyttö saattaa edellyttää P_{ow}-arvon määrittämistä sopivien vertailuaineiden valintaa varten sekä testin tuottaman datan perusteella tehtyjen johtopäätösten tueksi. Laskentamenetelmiä käsitellään lyhyesti tämän testausmenetelmän lisäyksessä. HPLC-menetelmä toteutetaan isokraattisesti.

5. P_{ow}-arvot riippuvat ympäristöolosuhteista, kuten esimerkiksi lämpötilasta, pH-arvosta ja ionivahvuudesta. Nämä on määriteltävä kokeen yhteydessä, jotta P_{ow}-tiedot osataan tulkita oikein. Ionisoituville aineille voidaan mahdollisuuksien mukaan käyttää jotain muuta, vaihtoehtoista menetelmää (esimerkiksi OECD:n ohjeluonnosta ionisoituneille aineille käytettävästä pH-metrisestä menetelmästä (6)). Kyseinen OECD:n ohjeluonnos saattaa sopia näiden ionisoituvien aineiden P_{ow}-arvon määrittämiseen, mutta joissakin tapauksissa on tarkoituksenmukaisempaa käyttää HPLC-menetelmää ympäristön kannalta merkityksellisille pH-arvoille (ks. 9 kohta).

([1]) Ylärajan määrittää vaatimus, jonka mukaan jakaantumistasapainossa tehtyjen säätötoimenpiteiden jälkeen erotusfaasin on oltava täydellinen, ennen kuin näytteitä otetaan analyyttisiä määrityksiä varten. Asianmukaista huolellisuutta noudatettaessa ylärajaa voidaan nostaa P_{ow}-arvon ylempiin arvoihin saakka.

▼**M6**

MENETELMÄN PERIAATE

6. Käänteisfaasi-HPLC tapahtuu analyyttisessa kolonnissa, joka on täytetty kaupallisesti saatavana olevalla, pitkiä hiilivetyketjuja (esimerkiksi C_8, C_{18}) sisältävällä kiinteällä faasilla, joka on kemiallisesti sidottu piidioksidiin.

7. Kolonniin ruiskutetut kemikaalit jakaantuvat liikkuvan liuotinfaasin ja kiinteän hiilivetyfaasin välillä kulkeutuessaan kolonnia pitkin liikkuvan faasin välityksellä. Kolonni pidättää aineita niiden hiilivety-vesi-jakaantumiskertoimen suhteessa siten, että hydrofiiliset aineet eluoituvat ensin ja lipofiiliset aineet viimeisenä. Retentioaikaa kuvataan käyttökertoimen k avulla seuraavasti:

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

jossa t_R on näytteen retentioaika ja t_0 viive eli liuotinmolekyylin keskimääräinen läpäisyaika. Kvantitatiivisia analyyttisia menetelmiä ei tarvita. Retentioaikojen määritys riittää.

8. Näytteen oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin voidaan laskea määrittämällä käyttökerroin k kokeellisesti ja käyttämällä saatua arvoa seuraavassa yhtälössä:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

jossa

a, b = lineaariset regressiokertoimet.

Edellä mainittu yhtälö saadaan vertailuaineiden oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen logaritmin ja vertailuaineiden käyttökertoimen logaritmin lineaarisesta regressioanalyysista.

9. Käänteisfaasi-HPLC:n avulla voidaan arvioida, että jakaantumiskertoimen log P_{ow} on 0–6, mutta poikkeustapauksissa log P_{ow} voi olla jopa 6–10. Tämä saattaa edellyttää liikkuvan faasin modifiointia (3). Menetelmää ei voi käyttää väkevien happojen ja emästen, metallikompleksien, eluentin kanssa reagoivien aineiden tai pinta-aktiivisten aineiden testaukseen. Ionisoituvia aineita voidaan mitata niiden ionisoitumattomassa muodossa (vapaa happo tai vapaa emäs), kunhan käytetään sopivaa puskuria, jonka pH on vähintään yhden pH-yksikön pK_a-arvoa pienempi (vapaa happo) tai suurempi (vapaa emäs) Ionisoituvien aineiden testaamiseen (6) saatetaan saada käyttöön myös pH-metrinen menetelmä, jota voidaan käyttää vaihtoehtona (6). Jos log P_{ow}:n määritys tehdään ympäristöriskiluokitusta tai -riskinarviointia varten, testissä käytettävän pH-alueen olisi oltava kyseisen luonnonympäristön kannalta merkityksellinen eli 5,0–9.

10. Joissakin tapauksissa epäpuhtaudet voivat vaikeuttaa tulosten tulkintaa, koska piikkien kohdentaminen on tällöin epävarmaa. Jos seoksen testauksessa saadaan määrittämätön kaista, on ilmoitettava log P_{ow}:n ylä- ja alaraja sekä kunkin log P_{ow} -piikin pinta-alaprosentti. Jos seokset kuuluvat samaan homologiryhmään, on lisäksi ilmoitettava log P_{ow}:n painotettu keskiarvo (7), joka on laskettu yksittäisten P_{ow}-arvojen sekä vastaavien pinta-alaprosenttiarvojen perusteella (8). Seuraavassa laskelmassa on otettava huomioon piikit, jotka muodostavat vähintään 5 prosenttia piikkien yhteispinta-alasta (9):

▼**M6**

$$painotettu\ keskiarvo\ \log\ P_{ow} = \frac{\sum_i (\log\ P_{owi})(pinta - ala\ \%)}{piihin\ pinta - ala\ yhteensä\ \%} = \frac{\sum (log\ P_{owi})(pinta - ala\ \%_i)}{\sum_i pinta - ala\ \%}$$

log P_{ow}:n painotettua keskiarvoa voidaan käyttää vain homologeista (esimerkiksi alkaanisarjasta) koostuville aineille tai seoksille (esimerkiksi mäntyöljyille). Seosten mittaamisesta voidaan saada mielekkäitä tuloksia, jos käytetyn detektorin herkkyys on sama kaikille seoksen aineille, jotta ne voidaan erottaa toisistaan riittävästi.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

11. Ennen menetelmän käyttöä on oltava tiedossa dissosiaatiovakio, rakennekaava sekä liukoisuus liikkuvassa faasissa. Lisäksi hydrolyysiä koskevasta tiedosta on hyötyä.

LAATUKRITEERIT

12. Mittaustulokset varmistetaan tekemällä kaksi määritystä.

— Toistettavuus: log P_{ow} -arvot, jotka on saatu samoissa koeolosuhteissa tehdyistä toistuvista mittauksista samoja vertailuaineita käyttämällä, voivat erota toisistaan enintään ± 0.1 logaritmiyksikköä.

— Uusittavuus: Jos mittaukset toistetaan eri vertailuaineryhmälle, voidaan saada erilaisia tuloksia. log k:n ja log P_{ow}:n välinen korrelaatiokerroin R jollekin vertailuaineryhmälle on tyypillisesti noin 0,9, mikä vastaa log P_{ow}:n oktanoli-vesi-jakaantumiskerrointa ± 0,5 logaritmiyksikköä.

13. Laboratorioiden välisessä vertailutestissä on osoitettu, että HPLC-menetelmällä päästään log P_{ow}-arvoihin, jotka ovat ± 0,5 yksikköä ravistuspullomenetelmällä saaduista arvoista (2). Muita vertailuja on esitetty kirjallisuudessa (4), (5), (10), (11), (12). Tarkimmat tulokset saadaan rakenteellisesti testiainetta muistuttavien vertailuaineiden perusteella laadituista korrelaatiokäyristä (13).

VERTAILUAINEET

14. Aineen mitatun käyttökertoimen k ja sen P_{ow}-arvon välille korrelaatiota muodostettaessa on laadittava kalibrointikäyrä, jossa on vähintään kuusi pistettä (ks. 24 kohta). Käyttäjä valitsee sopivat vertailuaineet. Vertailuaineiden log P_{ow} -arvoihin olisi normaalisti sisällyttävä testiaineen log P_{ow} -arvo. Toisin sanoen ainakin yhden vertailuaineen P_{ow}-arvon olisi oltava testiainetta suurempi ja ainakin yhden vertailuaineen P_{ow}-arvon testiainetta pienempi. Ekstrapolointia voi käyttää vain poikkeustapauksissa. Suositeltavaa on, että vertailuaineet muistuttavat rakenteellisesti testiainetta. Kalibroinnissa käytettävien vertailuaineiden log P_{ow} -arvojen on perustuttava luotettaviin koetuloksiin. Kuitenkin aineille, joiden log P_{ow} -arvo on korkea (yleensä yli 4), voidaan käyttää laskennallisia arvoja, ellei luotettavia koetuloksia ole saatavana. Ekstrapoloituja arvoja käytettäessä raja-arvo on mainittava.

15. Lähdekirjallisuudessa on laajat luettelot monien kemikaaliryhmien log P_{ow} -arvoista (14), (15). Jos näytteen kanssa rakenteeltaan samankaltaisten aineiden tietoja ei ole käytettävissä, voidaan käyttää yleisempää kalibrointia, joka perustuu muihin vertailuaineisiin. Suositeltavat vertailuaineet ja niiden P_{ow}-arvot on esitetty taulukossa 1. Ionisoituvien aineiden osalta annettuja arvoja sovelletaan ionisoitumattomiin muotoihin. Arvojen uskottavuus ja laatu on todettu laboratorioiden välisessä vertailutestissä.

▼**M6**

Taulukko 1

Suositeltavat vertailuaineet

	CAS-numero	Vertailuaine	log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-butanoni (metyylietyyliketoni)	0,3	
2	1122-54-9	4-asetyylipyridiini	0,5	
3	62-53-3	Aniliini	0,9	
4	103-84-4	Asetanilidi	1,0	
5	100-51-6	Bentsyylialkoholi	1,1	
6	150-76-5	4-metoksifenoli	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoksietikkahappo	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenoli	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenoli	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Bentsonitriili	1,6	
11	140-29-4	Fenyyliasetonitriili	1,6	
12	589-18-4	4-metyylibentsyylialkoholi	1,6	
13	98-86-2	Asetofenoni	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenoli	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-nitrobentsoehappo	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-kloorianiliini	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobentseeni	1,9	
18	104-54-1	Kinnamyylialkoholi (kanelialkoholi)	1,9	
19	65-85-0	Bentsoehappo	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-kresoli	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kanelihappo	2,1	pKa = 3,89 (cis) *4*,44 (trans)
22	100-66-3	Anisoli	2,1	
23	93-58-3	Metyylibentsoaatti	2,1	
24	71-43-2	Bentseeni	2,1	
25	99-04-7	3-metyylibentsoehappo	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-klorofenoli	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trikloorietyleeni	2,4	
28	1912-24-9	Atratsiini	2,6	
29	93-89-0	Etyylibentsoaatti	2,6	

▼**M6**

	CAS-numero	Vertailuaine	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-diklorobentsonitriili	2,6	
31	535-80-8	3-klorobentsoehappo	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Tolueeni	2,7	
33	90-15-3	1-naftoli	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dikloroanilliini	2,8	
35	108-90-7	Klooribentseeni	2,8	
36	1746-13-0	Allyylifenyylieetteri	2,9	
37	108-86-1	Bromobentseeni	3,0	
38	100-41-4	Etyylibentseeni	3,2	
39	119-61-9	Bentsofenoni	3,2	
40	92-69-3	4-fenyylifenoli	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Tymoli	3,3	
42	106-46-7	1,4-diklooribentseeni	3,4	
43	122-39-4	Difenyylilamiini	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftaleeni	3,6	
45	93-99-2	Fenyylibentsoaatti	3,6	
46	98-82-8	Isopropyylibentseeni	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-trikloorifenoli	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenyyli	4,0	
49	120-51-4	Bentsyylibentsoaatti	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sek-butyylifenoli	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triklooribentseeni	4,2	
52	143-07-7	Dodekaanihappo	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenyylieetteri	4,2	
54	85-01-8	Fenantreeni	4,5	
55	104-51-8	n-butyylibentseeni	4,6	
56	103-29-7	Dibentsyyli	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenyylipyridiini	4,9	
58	206-44-0	Fluoranteeni	5,1	
59	603-34-9	Trifenyyliamiini	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

MENETELMÄN KUVAUS

Jakaantumiskertoimen alustava arviointi

16. Testiaineen jakaantumiskerrointa voidaan tarvittaessa arvioida. Suositeltavinta on käyttää laskentamenetelmää (ks. lisäys) tai määrätyissä tapauksissa testiaineen liukoisuutta puhtaisiin liuottimiin.

Laitteisto

17. Menetelmässä tarvitaan nestefaasikromatografi, jossa on pulssittomasti toimiva pumppu ja sopiva detektorijärjestelmä. RI-detektoria tai aallonpituutta 210 nm käyttävää UV-detektoria voidaan käyttää useille erilaisille kemiallisille ryhmille. Kiinteässä faasissa olevat polaariset ryhmät saattavat vakavasti häiritä HPCL-kolonnin tehokkuutta, minkä vuoksi polaaristen ryhmien määrä kiinteissä faaseissa (16) on minimoitava. Menetelmässä voidaan käyttää kaupallisesti saatavana olevia mikrohiukkas-vastafaasipakkauksia tai valmiiksi pakattuja kolonneja. Ruiskutusjärjestelmän ja analyyttisen kolonnin välissä voidaan pitää suojakolonnia.

Liikkuva faasi

18. Eluutioliuotin valmistetaan HPLC-laatuisesta metanolista ja tislatusta tai ionivaihdetusta vedestä. Liuottimelle tehdään kaasunpoisto ennen käyttöä. Eluution pitäisi olla isokraattinen. Metanoli-vesiseoksessa on oltava vähintään 25 prosenttia vettä. Yleensä seoksella, jossa on metanolia ja vettä tilavuussuhteessa 3:1, saadaan tyydyttäviä tuloksia, kun eluoidaan aineita, joiden log P -arvo on 6, yhdessä tunnissa virtausnopeudella 1 ml/min. Jos aineiden log P -arvo on yli 6, saattaa olla tarpeen lyhentää eluointiaikaa (myös vertailuaineiden kohdalla) vähentämällä liikkuvan faasin polaarisuutta tai kolonnin pituutta.

19. Testiaineen ja vertailuaineiden liukoisuuden liikkuvaan faasiin on oltava tarpeeksi suuri niiden havaitsemista varten. Lisäaineita voidaan käyttää metanoli-vesiseoksen yhteydessä vain poikkeustapauksissa, koska lisäaineet muuttavat kolonnin ominaisuuksia. Tällöin on varmistettava, etteivät lisäaineet vaikuta testiaineen ja vertailuaineiden retentioaikaan. Jos metanoli-vesiseos ei sovellu tarkoitukseen, voidaan käyttää muita orgaanisen liuottimen ja veden seoksia, esimerkiksi etanoli-vesiseosta, asetonitriili-vesiseosta tai isopropyylialkoholi (2-propanoli)-vesiseosta.

20. Ionisoivien aineiden osalta eluentin pH on kriittinen. Sen on oltava kolonnin pH-alueella eli yleensä 2–8. Puskurointia suositellaan. On varottava suolan saostumista ja kolonnin huononemista, mitä voi tapahtua eräiden orgaanisten faasi-puskuriseosten yhteydessä. HPLC-mittauksia, joissa piidioksidipohjaisen kiinteän faasin pH on yli 8, ei yleensä suositella, koska emäksinen liikkuva faasi voi aiheuttaa kolonnin suorituskyvyn nopeaa huononemista.

Liuotetut aineet

21. Testiaineen ja vertailuaineiden on oltava riittävän puhtaita, jotta kromatogrammien piikit voidaan kohdentaa oikeille aineille. Testi- ja kalibrointitarkoituksiin käytettävät aineet liuotetaan liikkuvaan faasiin mahdollisuuksien mukaan. Jos muuta kuin liikkuvassa faasissa olevaa liuotinta käytetään testi- ja vertailuaineiden liuottamiseen, liikkuvaa faasia on käytettävä injektointia edeltävässä viimeisessä laimennuksessa.

Testiolosuhteet

22. Mittauksen aikana lämpötila saa vaihdella enintään ± 1 °C.

▼M6

Kuollut aika t_o

23. Kuollut aika t_0 voidaan mitata käyttämällä kolonnin läpi pidättymättä kulkevia orgaanisia aineita (esimerkiksi tiokarbamidia tai formamidia). Tarkemmin kuollut aika saadaan mitatuista retentioajoista tai noin seitsenosaisesta homologisesta sarjasta (esimerkiksi n-alkyylimetyyliketoneista) (17). Retentioajat t_R (n_C + 1) piirretään ajan t_R (n_C) funktiona, jossa n_C on hiiliatomien määrä. Tuloksena saadaan suora linja t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, jossa yhtälöä k(n_C + 1)/k(n_C) edustava A on vakio. Kuollut aika t_0 saadaan vakiotermistä (1 – A)t_0 sekä kaltevuudesta A.

Regressioyhtälö

24. Seuraavaksi laaditaan korrelaatiokäyrä, jossa soveltuvien vertailuaineiden log k -arvot esitetään log P -arvojen funktiona. log P -arvot ovat lähellä testiaineen odotettavissa olevaa arvoa. Käytännössä samanaikaisesti injektoidaan 6–10 vertailuainetta. Retentioajat on suositeltavaa määrittää detektorijärjestelmään kytketyllä tallentavalla integraattorilla. Käyttökertoimen k vastaavat logaritmit merkitään käyrään log P -arvojen funktiona. Regressioyhtälö lasketaan määrätyin välein, vähintään kerran päivässä, jotta kolonnin suorituskyvyn mahdolliset muutokset voidaan ottaa huomioon.

TESTIAINEEN P_{OW}-ARVON MÄÄRITTÄMINEN

25. Testiainetta injektoidaan määrinä, jotka ovat vielä juuri ja juuri havaittavissa. Retentio määritetään kaksi kertaa. Testiaineen jakaantumiskerroin saadaan interpoloimalla laskettu käyttökerroin kalibrointikäyrälle. Jos jakaantumiskerroin on hyvin pieni tai hyvin suuri, on käytettävä ekstrapolointia. Etenkin näissä tapauksissa on otettava huomioon regressiosuoran luottamusrajat. Jos näytteen retentioaika on standardeja varten saatujen retentioaikojen vaihteluvälin ulkopuolella, on mainittava myös raja-arvo.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Testiraportti

26. Testiraportissa on oltava seuraavat tiedot:

— alustava arvio jakaantumiskertoimesta (jos määritetty), arvioidut arvot sekä käytetty menetelmä; laskentamenetelmää käytettäessä kattava kuvaus menetelmästä, mukaan lukien tietokannan nimi sekä tarkat tiedot valituista fragmenteista

— testi- ja vertailuaineista puhtaus, rakennekaava ja CAS-numero

— laitteiston ja käyttöolosuhteiden kuvaus: analyyttinen kolonni, suojakolonni,

— liikkuva faasi, käytetty detektori, lämpötila-alue, pH-arvo

— eluointiprofiilit (kromatogrammit)

— kuollut aika ja sen mittaustapa

— retentiotiedot ja lähdekirjallisuudesta saadut, kalibroinnissa käytettyjen vertailuaineiden log P_{ow} -arvot

— regressiosuoran tiedot (log k:n riippuvuus log P_{ow}:stä) sekä suoran korrelaatiokerroin, mukaan lukien luottamusvälit

▼**M6**

— retentiotietojen keskiarvo ja testiaineen interpoloitu log P_{ow} -arvo

— seosta käytettäessä eluointiprofiilin kromatogrammi, johon lopetuskohdat on merkitty

— log P_{ow} -piikin pinta-alaprosenttiin suhteutetut log P_{ow} -arvot

— regressiosuoraa käyttävä laskelma

— tarvittaessa log P_{ow} -arvojen laskennallinen painotettu keskiarvo.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.

(7) OSPAR (1995). ”Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995”, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 February 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.

(9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, s. 529–537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

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

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

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Lisäys

P_{ow}-arvojen laskentamenetelmät

JOHDANTO

1. Tämä lisäys sisältää lyhyen johdatuksen P_{ow}-arvojen laskentamenetelmiin. Lisätietoa on oppikirjoissa (1), (2).

2. Laskettuja P_{ow}-arvoja voidaan käyttää seuraaviin tarkoituksiin:

— kokeellisen menetelmän valinta: ravistuspullomenetelmä, kun log P_{ow} on – 2…4, ja HPLC-menetelmä, kun log P_{ow} on 0…6;

— HPLC-menetelmässä käytettävien testiolosuhteiden valinta (vertailuaineet, metanolin ja veden suhde);

— kokeellisilla menetelmillä saatujen arvojen uskottavuuden tarkistaminen;

— arvioiden tekeminen silloin, kun kokeellisia menetelmiä ei voi soveltaa.

Laskentamenetelmien periaate

3. Tässä esitetyt laskentamenetelmät perustuvat molekyylin teoreettiseen fragmentointiin sopiviin alarakenteisiin, joille on tiedossa luotettavat log P_{ow} -differentiaalit. log P_{ow} -arvo saadaan laskemalla yhteen fragmenttiarvot sekä korjaustermit, jotka perustuvat molekyylin sisäisiin vuorovaikutuksiin. Luettelot fragmenttivakioista ja korjaustermeistä ovat saatavana lähteistä (1), (2), (3), (4), (5), (6). Joitakin niistä päivitetään säännöllisesti (3).

Laskettujen arvojen luotettavuus

4. Yleisesti ottaen laskentamenetelmien luotettavuus heikkenee, kun tutkittavan yhdisteen monimutkaisuus kasvaa. Kun tutkitaan yksinkertaisia molekyyleja, joilla on alhainen molekyylipaino ja yksi tai kaksi funktionaalista ryhmää, voidaan odottaa, että poikkeama fragmentaatiomenetelmien ja mitatun arvon välillä on 0,1–0,3 log P_{ow} -yksikköä. Virhemarginaali riippuu käytettyjen fragmenttivakioiden luotettavuudesta sekä siitä, miten hyvin molekyylin sisäiset vuorovaikutukset (esimerkiksi vetysidokset) ovat tunnistettavissa ja miten hyvin korjaustermejä osataan käyttää. Kun käsitellään ionisoivia yhdisteitä, on tärkeää ottaa huomioon varaus ja ionisointiaste (10).

Fujita-Hansch π -menetelmä

5. Hydrofobinen substituenttivakio π, jonka esittivät ensimmäisinä Fujita ym. (7), määritetään seuraavasti:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

jossa PhX on aromaattinen johdannainen ja PhH on emoyhdiste.

$$\begin{aligned} \text{Esimerkiksi: } {}^{\pi}Cl &= \log P_{ow}\,(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\,(C_6H_6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

π-menetelmää käytetään lähinnä aromaattisille aineille. π-arvot suurelle määrälle substituentteja on esitetty kirjallisuudessa (4), (5).

Rekker-menetelmä

6. Rekker-menetelmällä (8) log P_{ow} -arvo lasketaan seuraavasti:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{vuorovaikutustermit})$$

▼M6

jossa a_i ilmaisee, montako kertaa tietty fragmentti esiintyy molekyylissä, ja f_i on fragmentin log P_{ow} -differentiaali. Vuorovaikutustermit voidaan esittää yhden ainoan vakion C_m integraalikerrannaisina (niin sanottuna maagisena vakiona). Fragmenttivakiot f_i and C_m on määritetty 1 054 kokeellista P_{ow} -arvoa (825 ainetta) sisältävän luettelon perusteella moninkertaista regressioanalyysiä käyttäen (6), (8). Vuorovaikutustermien määritys tehdään tiettyjen sääntöjen mukaan (6), (8), (9).

Hansch-Leon menetelmä

7. Hansch-Leon-menetelmällä (4) log P_{ow} -arvo lasketaan seuraavasti:

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

jossa f_i on fragmenttivakio, F_j korjaustermi (tekijä) ja a_i ja b_j ovat vastaavia esiintymistaajuuksia. Luettelot atomien ja ryhmien fragmenttiarvoista sekä korjaustermeistä F_j on laadittu yrityksen ja erehdyksen kautta kokeellisten P_{ow}-arvojen perusteella. Korjaustermit on jaettu useaan eri luokkaan (1), (4). Markkinoilla olevat erikoisohjelmat huomioivat kaikki säännöt ja korjaustermit (3).

YHDISTETTY MENETELMÄ

8. Monimutkaisten molekyylien P_{ow}-laskentaa voidaan helpottaa huomattavasti jakamalla molekyylit suurehkoihin alarakenteisiin, joille on saatavana luotettavia P_{ow}-arvoja joko taulukoista (3), (4) tai valmiiksi tehdyistä mittauksista. Tällaiset fragmentit (esimerkiksi heterosykliset renkaat, antrakinoni ja atsobentseeni) voidaan sen jälkeen yhdistää Hanschin π-arvoihin tai Rekkerin tai Leon fragmenttivakioihin.

Huomautuksia

i) Laskentamenetelmiä voidaan soveltaa vain osittain tai kokonaan ionisoituihin aineisiin, jos tarpeelliset korjauskertoimet on otettu huomioon.

ii) Jos voidaan 4olettaa, että molekyylin sisällä on vetysidoksia, on lisättävä vastaavat korjaustermit (noin + 0,6…+ 0,1 log P_{ow} -yksikköä) (1). Indikaatiot vetysidosten olemassaolosta saadaan stereomalleista tai spektroskooppisista tiedoista.

iii) Jos useat tautomeeriset muodot ovat mahdollisia, todennäköisintä muotoa käytetään laskennan perustana.

iv) Fragmenttivakioluetteloiden päivityksiä on seurattava huolella.

LASKENTAMENETELMIÄ KÄSITTELEVÄ LÄHTEKIRJALLISUUS

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).

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

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

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem*. – *Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc*. 86, 5175.

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

(9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

(10) R.A. Scherrer. ACS – Symposium Series 255, s. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼M7

A.25. DISSOSIAATIOVAKIOT VEDESSÄ (TITRAUSMENETELMÄ – SPEKTROFOTOMETRINEN MENETELMÄ – KONDUKTOMETRINEN MENETELMÄ)

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 112 (1981)

Edellytykset

— Sopiva analyysimenetelmä

— Vesiliukoisuus

Ohjeet

— Rakennekaava

— Sähkönjohtavuus konduktometrisessä menetelmässä

Testimenetelmää koskevat lausumat

— Kaikki testimenetelmät voidaan suorittaa puhtaille tai kauppalaatuisille aineille. Epäpuhtauksien mahdolliset vaikutukset tuloksiin on otettava rahuomioon.

— Titrausmenetelmä ei sovellu huonosti liukeneville aineille (ks. testiliuokset jäljempänä).

— Spektrofotometrinen menetelmä soveltuu ainoastaan aineille, joilla on selvästi erilaiset UV-valon ja näkyvän valon absorptiospektrit dissosioituneessa ja dissosioimattomassa muodossa Tämä menetelmä voi soveltua myös huonosti liukeneville aineille ja ei-happamille/emäksisille dissosiaatioille, esim. kompleksointi.

— Tapauksissa, joissa Onsagerin yhtälö pätee, konduktometristä menettelyä voidaan soveltaa jopa kohtalaisen pienten pitoisuuksien osalta ja jopa tapauksissa, joissa vallitsee ei-hapan/emästasapaino.

Vakioasiakirjat

Tämä testimenetelmä perustuu menetelmiin, jotka annetaan osassa ”Lähdekirjallisuus” mainituissa lähteissä ja asiakirjassa *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification* EPA, 18. elokuuta 1978.

MENETELMÄ – JOHDANTO, TARKOITUS, SOVELTAMISALA, SOVELTAMINEN JA TESTIN KÄYTTÖ JA RAJAT

Aineen dissosiaatiolla vedessä on sen ympäristövaikutuksen arvioinnin kannalta merkitystä. Se ohjaa aineen muotoa, joka puolestaan määrittää sen toiminnan ja kulkeutumisen. Se voi vaikuttaa kemikaalin adsorptioon maaperään ja sedimentteihin sekä absorptioon biologisiin soluihin.

Määritelmät ja yksiköt

Dissosiaatio on reversiibeli jakautuminen kahteen tai useampaan kemialliseen aineeseen, jotka voivat olla ionisia. Tämä prosessi esitetään yleisesti seuraavasti

$$RX \rightleftharpoons R^+ + X^-$$

ja reaktiota koskeva tasapainopitoisuuden vakio on

$$K = \frac{[R^+][X^-]}{[RX]}$$

Esimerkiksi erityistapauksessa, jossa R on vety (aine on happo), vakio on

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

tai

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Vertailuaineet

Seuraavia vertailuaineita ei tarvitse käyttää kaikissa tapauksissa uutta ainetta tutkittaessa. Ne mainitaan ensisijaisesti siksi, jotta menetelmän kalibrointi voidaan suorittaa ajoittain ja jotta tarjotaan mahdollisuus vertailla tuloksia toista menetelmää sovellettaessa.

	pK ([1])	Lämpötila °C
p-nitrofenoli	7,15	25 ([1])
Bentsoehappo	4,12	20
p-kloorianiliini	3,93	20

([1]) Mitään arvoa ei ole käytettävissä 20 celsiusasteelle, mutta voidaan olettaa, että mittaustulosten vaihtelu on korkeampi kuin oletettava lämpötilariippuvuus.

On hyödyllistä käyttää ainetta, jolla on useita pK-arvoja, kuten esitetään jäljempänä kappaleessa ”Testimenetelmän periaate”. Tällainen aine voi olla

Sitruunahappo	pK_a (8)	Lämpötila °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Testimenetelmän periaate

Kuvattu kemiallinen prosessi on ainoastaan jonkin verran lämpötilariippuvainen ympäristön kannalta merkityksellisellä lämpötila-alueella. Dissosiaatiovakion määrittäminen edellyttää kemiallisen aineen liukenevien ja liukenemattomien muotojen pitoisuuksien mittaamista. Edellä kappaleessa ”Määritelmät ja yksiköt” ilmoitetun dissosiaatioreaktion stoikiometrian tietämyksen perusteella voidaan määrittää asiaankuuluva vakio. Tässä testimenetelmässä kuvatussa erityistapauksessa aine käyttäytyy hapon tai emäksen tavoin, ja määritys tehdään helpoiten määrittämällä aineen ionisoitujen ja ei-ionisoitujen muotojen suhteelliset pitoisuudet ja liuoksen pH-arvo. Näiden termien välinen suhde annetaan edellä kappaleessa ”Määritelmät ja yksiköt” esitetyssä pK_a -yhtälössä. Joillain aineilla on enemmän kuin yksi dissosiaatiovakio, ja vastaavia yhtälöitä voidaan laatia. Jotkut tässä kuvatuista menetelmistä ovat myös sopivia ei-happamille/emäksisille dissosiaatioille.

Laatuperusteet

Toistettavuus

Dissosiaatiovakio on toistettava (vähintään kolme määritystä) ± 0,1 log-yksikön puitteisiin.

TESTIMENETELMIEN KUVAUS

Arvon pK_a määrittämiseen voidaan käyttää kahta lähestymistapaa. Ensimmäisessä tunnettua määrää ainetta titrataan tarvittaessa hapolla tai emäksellä; toisessa määritetään ionisoitujen ja ionisoitumattomien muotojen suhteellinen pitoisuus ja sen pH-riippuvuus.

▼M7

Valmisteet

Näihin periaatteisiin perustuvat menetelmät voidaan luokitella titraus-, spektrofotometrisiksi ja konduktometrisiksi menetelmiksi.

Testiliuokset

Kemiallista ainetta tulee liuottaa tislattuun veteen titrausmenetelmässä ja konduktometrisessä menetelmässä. Spektrofotometrisessä ja muissa menetelmissä käytetään puskuriliuoksia. Testiaineen pitoisuus ei saisi olla yli 0,01 M tai yli puolet kyllästymispitoisuudesta, ja liuoksen valmistamisessa on käytettävä aineen puhtainta saatavilla olevaa muotoa. Jos aine on ainoastaan huonosti liukenevaa, sitä voidaan liuottaa pieneen määrään veteen sekoittuvaa liuotinta ennen kuin edellä mainittuja pitoisuuksia lisätään.

Tyndallin sirontaa käytetään tarkistamaan emulsioiden esiintyminen liuoksissa, erityisesti jos liukoisuuden parantamiseksi on käytetty tukiliuotinta. Jos käytetään puskuriliuoksia, puskurin pitoisuus ei saisi ylittää arvoa 0,05 M.

Testiolosuhteet

Lämpötila

Lämpötila on säädettävä ainakin ± 1 °C:n tarkkuudella. Määritys tulisi mieluiten suorittaa lämpötilassa 20 °C.

Jos epäillään merkittävää lämpötilariippuvuutta, määritys on tehtävä ainakin kahdessa muussa lämpötilassa. Lämpötilavälien on oltava tässä tapauksessa 10 °C ja lämpötilan säädön ± 0,1 °C.

Analyysit

Menetelmä määräytyy testattavan aineen luonteen mukaan. Sen on oltava tarpeeksi herkkä, jotta eri lajit voidaan määrittää kussakin testiliuoksen pitoisuudessa.

Testin suorittaminen

Titrausmenetelmä

Testiliuos määritetään titraamalla emäs- tai happoliuoksella ja pH-arvo mitataan jokaisen titrantin lisäyksen jälkeen. Ennen ekvivalenttipistettä on tehtävä ainakin 10 täydentävää lisäystä. Jos ekvivalenssi saavutetaan tarpeeksi nopeasti, voidaan käyttää piirturilla varustettua potentiometriä. Tässä menettelyssä aineen kokonaismäärä ja sen pitoisuus on oltava tarkasti tiedossa. On ryhdyttävä varotoimiin hiilidioksidin poissulkemiseksi. Yksityiskohtia menettelystä, varotoimista ja laskennasta annetaan vakiotesteissä, esim. viitteet (1), (2), (3) ja (4).

Spektrofotometrinen menetelmä

Löydetään aallonpituus, jossa aineen ionisoiduilla ja ionisoitumattomilla muodoilla on huomattavasti erilaiset ekstinktiokertoimet. UV-valon ja näkyvän valon absorptiospektri saadaan liuoksista, joissa on vakiopitoisuus, pH-olosuhteissa, joissa aine on olennaisesti ionisoitumaton ja täysin ionisoitu ja useissa pH-arvojen väliarvoissa. Tämä voidaan tehdä joko lisäämällä väkevää happoa (emästä) suhteellisen suureen määrään testiaineliuosta monikomponenttisessa puskuriliuoksessa aluksi korkealla (matalalla) pH-arvolla (viite 5), tai lisäämällä yhtä suuret tilavuudet aineen kantaliuosta esim. veteen, metanoliin, erilaisten puskuriliuosten, jotka kattavat halutun pH-välin, vakiotilavuuteen. Valitun aallonpituuden pH- ja absorbanssiarvoista lasketaan riittävä määrä arvoja pK_a:lle käyttäen tietoja ainakin viidestä pH-arvosta, joissa aine on vähintään 10- ja korkeintaan 90-prosenttisesti ionisoitu. Lisätietoja kokeellisista yksityiskohdista ja laskentamenetelmästä annetaan viitteessä 1.

▼M7

Konduktometrinen menetelmä

Käyttämällä pienen tunnetun kennovakion mittakennoa mitataan aineen noin 0,1 M liuoksen johtokykyä vedessä. Myös tämän liuoksen useiden tarkasti valmistettujen laimennuksien johtavuutta mitataan. Konsentraatiota puolitetaan kullakin kerralla ja sarjan tulisi kattaa ainakin konsentraatioiden suuruusjärjestys. Rajoittava johtuvuus äärettömässä laimennuksessa löydetään suorittamalla samanlainen koe Na-suolan kanssa ja ekstrapoloimalla. Dissosiaatioaste voidaan sen jälkeen laskea kunkin liuoksen johtavuudesta käyttämällä Onsagerin yhtälöä, ja näin ollen, Ostwaldin laimennuslakia soveltaen, dissosiaatiovakio voidaan laskea $K = \alpha^2C/(1 – \alpha)$, jossa C on konsentraatio mooleina litraa kohti ja α dissosioitunut osa. On ryhdyttävä varotoimiin hiilidioksidin poissulkemiseksi. Lisätietoja kokeellisista yksityiskohdista ja laskentamenetelmästä annetaan vakioasiakirjoissa ja viitteessä (1), (6) ja (7).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Titrausmenetelmä

Kymmenelle mitatulle pisteelle titrauskäyrällä lasketaan pK_a-arvo. Tällaisten pK_a-arvojen keskiarvo ja keskihajonta lasketaan. Luonnos pH-arvoista vakioemäksen tai -hapon tilavuuden osalta samoin kuin taulukkomuotoinen esitys pitäisi sisällyttää tähän.

Spektrofotometriset menetelmät

Absorbanssi ja pH esitetään taulukkoina jokaisesta spektristä. Ainakin viisi pK_a -arvoa lasketaan spektrin datapisteistä, ja lisäksi lasketaan näiden tulosten keskiarvo ja standardipoikkeama.

Konduktometrinen menetelmä

Ekvivalenttijohtokyky Λ lasketaan kullekin hapon konsentraatiolle ja kullekin sellaisen seoksen konsentraatiolle, jossa on vastaava määrä happoa, plus 0,98 vastaava määrä karbonaatitonta natriumhydroksidia. Hapon määrä on korkeampi, jotta estetään hydrolyysista johtuva liika $OH^–$. $1/\Lambda$ esitetään Ö_C ja suolan Λ_o voidaan löytää ekstrapoloimalla nollaväkevyyteen.

Hapon Λ_o voidaan laskea käyttämällä H^+:n ja Na^+:n kirjallisuusarvoja, ja pKa-arvo voidaan laskea $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ ja $Ka = \alpha^2C/(1 – \alpha)$ kullekin konsentraatiolle. Paremmat arvot Ka:lle voidaan saada tekemällä korjauksia liikkuvuuden ja aktiivisuuden osalta. On laskettava pK_a-arvojen keskiarvot ja keskihajonta.

Testiraportti

Kaikki raakadata ja pK_a-arvot on toimitettava yhdessä laskentamenetelmän (mieluiten taulukkomuodossa, kuten ehdotetaan viitteessä 1, samoin kuin edellä mainittujen tilastollisten parametrien kanssa. Titrausmenetelmien osalta on esitettävä yksityiskohdat titranttien standardoinnista.

Spektrofotometrisen menetelmän osalta on esitettävä kaikki spektrit. Konduktometrisen menetelmän osalta on esitettävä yksityiskohdat kennovakion määrityksestä. Tiedot käytetystä tekniikasta, analyyttisistä menetelmistä ja kaikkien puskuriaineiden erityispiirteistä on annettava.

Testilämpötilat on ilmoitettava.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, a. 1186–1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 – Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (ks. edellä 4 kohta).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

OSA B: TOKSISUUDEN JA MUIDEN TERVEYSVAIKUTUSTENMÄÄRITYS

SISÄLLYSLUETTELO

YLEISJOHDANTO

B.1 a. AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — VAKIOANNOSMENETELMÄ

B.1 b. AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ

B.2. AKUUTTI MYRKYLLISYYS (HENGITETTYNÄ)

B.3. AKUUTTI MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA)

B.4. AKUUTTI IHOÄRSYTTÄVYYS/-SYÖVYTTÄVYYS

B.5. AKUUTTI SILMÄN ÄRSYTTÄVYYS/SYÖVYTTÄVYYS

B.6. IHON HERKISTYMINEN

B.7. ORAALINEN TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS (28 PV) JYRSIJÖILLÄ

B.8. SUBAKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 28 PÄIVÄN TUTKIMUS

B.9. TOISTETUN ANNOKSEN (28 PÄIVÄÄ) MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA NAUTITTAVAT AINEET)

B.10. *IN VITRO* -KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKÄSSOLUILLA

B.11. NISÄKKÄIDEN LUUYTIMEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI

B.12. NISÄKKÄIDEN ERYTROSYYTTIMIKROTUMATESTI

B.13/14. MUTAGEENISUUS — TAKAISINMUTAATIOTESTI BAKTEEREILLA

B.17. *IN VITRO*-GEENIMUTAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUILLA HPRT- JA XPRT-GEENEJÄ KÄYTTÄEN

B.21. SOLUTRANSFORMAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUVILJELMILLÄ

B.22. DOMINOIVA LETAALITESTI JYRSIJÖILLÄ

▼B

B.23. NISÄKKÄIDEN SPERMATOGONIOIDEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI

B.25. HIIREN PERIYTYVÄ TRANSLOKAATIO

B.26. SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ

B.27. SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MUILLA KUIN JYRSIJÖILLÄ

B.28. SUBKROONINEN MYRKYLLISYYSTESTI (IHON KAUTTA) TOISTUVA ANNOSTELU IHON KAUTTA, 90 VUOROKAUTTA, JYRSIJÄT

B.29. SUBKROONINEN MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 90 PÄIVÄN TUTKIMUS

B.30. KROONISET MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET

B.31. PRENATAALISEN KEHITYKSEN AIKAISTEN MYRKYLLISYYSVAIKUTUSTEN TUTKIMUS

B.32. KARSINOGEENISUUSTUTKIMUKSET

B.33. YHDISTETTY KROONINEN MYRKYLLISYYS-/KARSINOGEENISUUSTUTKIMUS

B.34. MYRKKYJEN VAIKUTUS LISÄÄNTYMISKYKYYN (YHDEN SUKUPOLVEN TESTI)

B.35. KAKSI SUKUPOLVEA KÄSITTÄVÄ LISÄÄNTYMISKYKYYN KOHDISTUVIEN MYRKYLLISYYSVAIKUTUSTEN TUTKIMUS

B.36. TOKSIKOKINETIIKKA

B.37. ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS AKUUTIN ALTISTUKSEN JÄLKEEN

B.38. ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS 28 PÄIVÄN TOISTUVAN ANNOSTELUN TUTKIMUKSESSA

B.39. UDS-TESTI NISÄKKÄIDEN MAKSASOLUILLA *IN VIVO*

B.40. *IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHON SÄHKÖVASTUSMÄÄRITYS -TESTIMENETELMÄ (TER)

B.40a. *IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ

B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU — VALOMYRKYLLISYYSTESTI

B.42. IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ

▼B

B.43. NEUROTOKSISUUSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ

B.44. IHON KAUTTA IMEYTYMINEN: *IN VIVO* -MENETELMÄ

B.45. IHON KAUTTA IMEYTYMINEN: *IN VITRO* -MENETELMÄ

B.46. *IN VITRO* -IHOÄRSYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ

B.47. NAUDAN SARVEISKALVON SAMEUDEN JA LÄPÄISEVYYDEN TESTIMENETELMÄ, JOLLA VOIDAAN MÄÄRITTÄÄ I) VAKAVIA SILMÄVAURIOITA AIHEUTTAVAT KEMIKAALIT JA II) KEMIKAALIT, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA

B.48. ERISTETYN KANAN SILMÄN KÄYTTÖÖN PERUSTUVA TESTIMENETELMÄ, JOLLA TUNNISTETAAN I) VAKAVIA SILMÄVAURIOITA AIHEUTTAVAT KEMIKAALIT JA II) KEMIKAALIT, JOITA EI TARVITSE LUOKITELLA SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVIEN SILMÄVAURIOIDEN OSALTA

B.49. *IN VITRO* -MIKROTUMATESTI NISÄKÄSSOLUILLA

B.50. IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ: DA

B.51. IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ: BRDU-ELISA

B.52. AKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ – AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ

B.53. HERMOSTONKEHITYKSEEN KOHDISTUVIA MYRKYLLISYYSVAIKUTUKSIA KOSKEVA TUTKIMUS

B.54. KOHTUUN AIHEUTUVIEN VAIKUTUKSIEN BIOTESTI JYRSIJÖILLÄ: LYHYTAIKAINEN SEULONTATESTI ESTROGEENISISTA OMINAISUUKSISTA

B.55. ROTILLA TEHTÄVÄ HERSHBERGERIN BIOTESTI: LYHYTAIKAINEN SEULONTATESTI ANDROGEENISISTA (ANTIANDROGEENISISTA) OMINAISUUKSISTA

B.56. PIDENNETTY YHDEN SUKUPOLVEN LISÄÄNTYMISTOKSISUUTTA KOSKEVA TUTKIMUS

B.57. H295R-STEROIDOGENEESIÄ KOSKEVA TESTI

B.58. SIIRTOGEENISTEN JYRSIJÖIDEN SOMAATTISTEN SOLUJEN JA SUKUSOLUJEN GEENIMUTAATIOTESTIT

B.59. *IN CHEMICO* -IHOHERKISTYS: DPRA (DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY)

B.60. *IN VITRO* -IHOHERKISTYS: ARE-NRF2-LUSIFERAASI-TESTIMENETELMÄ

B.61. FLUORESEIINIVUOTOTESTIMENETELMÄ SILMÄÄ SYÖVYTTÄVIEN JA SILMÄÄ VAKAVASTI ÄRSYTTÄVIEN AINEIDEN TUNNISTAMISEKSI

B.62. NISÄKKÄIDEN EMÄKSINEN *IN VIVO* -KOMEETTAKOE

▼B

B.63. LISÄÄNTYMIS-/KEHITYSTOKSISUUDEN SEULONTATESTI

B.64. YHDISTELMÄTESTI: TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS JA LISÄÄNTYMIS-/KEHITYSTOKSISUUDEN SEULONTATESTI

B.65. KALVOESTEESEEN PERUSTUVA *IN VITRO* -TESTIMENETELMÄ IHOSYÖVYTTÄVYYDEN TESTAAMISEEN

B.66. *IN VITRO* -TRANSAKTIVAATIOTESTIT, JOISSA KÄYTETÄÄN PYSYVÄSTI TRANSFEKTOITUJA SOLUJA JA JOILLA VOIDAAN TUNNISTAA ESTROGEENIRESEPTORIN AGONISTEJA JA ANTAGONISTEJA

B.67. *IN VITRO* -GEENIMUTAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUILLA TYMIDIINIKINAASIN GEENIÄ KÄYTTÄEN

B.68. LYHYTAIKAISEEN ALTISTUKSEEN PERUSTUVA IN VITRO -TESTIMENETELMÄ, JOLLA VOIDAAN MÄÄRITTÄÄ i) VAKAVIA SILMÄVAURIOITA AIHEUTTAVAT KEMIKAALIT JA ii) KEMIKAALIT, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA

B.69. REKONSTRUOITUUN IHMISEN SARVEISKALVON KALTAISEEN EPITEELIIN (RhCE) PERUSTUVA TESTIMENETELMÄ SELLAISTEN KEMIKAALIEN MÄÄRITTÄMISEEN, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA JA MERKINTÖJÄ SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA

B.70. IHMISEN REKOMBINANTTIIN ESTROGEENIRESEPTORIIN (hrER) PERUSTUVAT *IN VITRO* -TESTIT, JOILLA HAVAITAAN KEMIKAALIT, JOILLA ON SITOUTUMISAFFINITEETTI ESTROGEENIRESEPTORIIN

B.71. IHON HERKISTYMISTESTIT *IN VITRO*, JOISSA KÄSITELLÄÄN KESKEISTÄ TAPAHTUMAA ELI DENDRIITTISOLUJEN AKTIVOITUMISEN VAIKUTUSTA IHON HERKISTYMISEN HAITTAVAIKUTUSREITTIIN

▼B

YLEISJOHDANTO

A. **TESTIAINEEN KARAKTERISAATIO**

Testiaineen koostumus, mukaan lukien tärkeimmät epäpuhtaudet, ja sen olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, mukaan lukien stabiliteetti, on oltava tiedossa ennen toksisuustutkimusten aloittamista.

Testiaineen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet antavat tärkeää tietoa antotavan, tutkimusasetelman ja testiaineen käsittely- ja säilyttämistavan valintaa varten.

Annosteluaineessa ja biologisessa materiaalissa olevan testiaineen (ja mahdollisuuksien mukaan myös tärkeimpien epäpuhtauksien) määrittämiseen käytettävä määrällinen ja laadullinen analyysimenetelmä tulee kehittää ennen tutkimuksen aloittamista.

Kaikki testiaineen tunnistamiseen, fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin, puhtauteen ja käyttäytymiseen liittyvät tiedot tulee sisällyttää tutkimusraporttiin.

B. **ELÄINTEN HOITO**

Ympäristöolosuhteiden ja eläinten oikeiden hoitomenetelmien tiukka seuranta on oleellista toksisuustutkimuksissa.

i) *Elinolosuhteet*

Koe-eläintilojen ja häkkien ympäristöolosuhteiden on oltava testattavalle lajille tarkoituksenmukaiset. Rotalle, hiirelle ja marsulle sopiva huoneenlämpötila on 22 ± 3 °C ja suhteellinen ilmankosteus 30-70 %. Kaniineille sopiva huoneenlämpötila on 20 ± 3 °C ja suhteellinen ilmankosteus 30–70 %.

Jotkut tutkimusmenetelmät ovat erityisen herkkiä lämpötilavaikutuksille. Näissä tapauksissa asianmukaiset olosuhteet on selostettu yksityiskohtaisesti tutkimusmenetelmän kuvauksen yhteydessä. Kaikissa toksisuustutkimuksissa on valvottava huoneenlämpötilaa ja ilmankosteutta, rekisteröitävä tiedot ja kirjattava ne tutkimuksen loppuraporttiin.

Valaistuksen tulee olla keinovaloa. Eläimen tulee saada olla 12 tuntia valossa ja 12 tuntia pimeässä. Valaistusmallin yksityiskohdat on rekisteröitävä ja kirjattava tutkimuksen loppuraporttiin.

Jollei menetelmässä erikseen muuta mainita, eläimiä voidaan säilyttää yksin tai pienryhmänä häkeissä, joissa on samaa sukupuolta. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä.

Koe-eläintutkimusraporteissa on tärkeää ilmoittaa käytetty häkkityyppi ja eläinten määrä häkkiä kohti sekä kemiallisen altistuksen että sitä seuranneiden havainnointijaksojen aikana.

▼B

ii) *Ruokintaolosuhteet*

Ravinnon tulee tyydyttää testattavan eläinlajin kaikki ravitsemukselliset tarpeet. Jos testiainetta annetaan eläimille ravinnossa, ravinnon ravintoarvo voi heiketä testiaineen ja ruoka-aineen interaktion vuoksi. Tällaisen reaktion mahdollisuus on otettava huomioon tutkimustuloksia tulkittaessa. Eläimille voidaan antaa tavanomaista koe-eläinravintoa ja juomavettä on oltava kaiken aikaa tarjolla. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testiaineelle sopiva sekoitus, kun se annostellaan ravinnon mukana.

Ravintoa saastuttavia aineita, joiden tiedetään vaikuttavan toksisuuteen, ei saa olla läsnä häiritsevinä pitoisuuksina.

C. **VAIHTOEHTOISET TUTKIMUKSET**

Euroopan unioni on sitoutunut edistämään sellaisten vaihtoehtomenetelmien kehittämistä ja validointia, joista saadaan samantasoista tietoa kuin nykyisistä eläinkokeista, mutta joihin tarvitaan vähemmän eläimiä ja jotka aiheuttavat vähemmän kärsimystä tai joissa eläimiä ei tarvita lainkaan.

Sitä mukaa kuin tällaisia menetelmiä tulee saataville, on niitä mahdollisuuksien mukaan käytettävä vaaran luonnehdinnassa ja siihen perustuvassa ominaisvaarojen luokittelussa ja merkitsemisessä.

D. **ARVIONTI JA TULKINTA**

Testien arvioinnissa ja tulkinnassa on otettava huomioon ekstrapolaatiorajoitukset eläinkokeiden ja *in vitro* -tutkimusten tulosten soveltamisessa suoraan ihmiseen, ja siksi mahdollisesti saatavia todisteita haittavaikutuksista ihmisellä voidaan käyttää tutkimustulosten vahvistamiseen.

E. **LÄHDELUETTELO**

Useimmat näistä menetelmistä on kehitetty OECD:n ”Testing Guidelines” -ohjelman puitteissa ja niitä tulisi käyttää yhtenevästi GLP (Good Laboratory Practice) -periaatteiden kanssa mahdollisimman laajan ”keskinäisen tietojen hyväksymisen” varmistamiseksi.

Lisätietoa löytyy OECD-ohjeiston kirjallisuusluettelossa mainituista lähteistä ja muusta asiaankuuluvasta kirjallisuudesta.

▼B

B.1 a. **AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — VAKIOANNOSMENETELMÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 420 (2001)

1.1 JOHDANTO

Perinteisissä menetelmissä akuutin toksisuuden arvioimiseksi käytetään päätepisteenä eläinten kuolemaa. Vuonna 1984 British Toxicology Society ehdotti akuutin toksisuuden testaamiseksi uutta käytäntöä, joka perustuu aineen annosteluun vakioannostasojen sarjana (1). Menetelmässä vältettiin käyttämästä eläinten kuolemaa päätepisteenä ja tarkkailtiin sen sijaan selviä toksisuusoireita yhdellä annossarjasta valitulla vakioannostasolla. Menetelmä on hyväksytty tutkimusmenetelmäksi vuonna 1992 Yhdistyneen kuningaskunnan (2) ja kansainvälisten (3) *in vivo* -validointitutkimusten perusteella. Tämän jälkeen vakioannosmenetelmän tilastollisia ominaisuuksia on arvioitu matemaattisten mallien avulla useissa tutkimuksissa (4) (5) (6). *In vivo*- ja mallintamistutkimukset ovat osoittaneet, että menetelmä on toistettava, että siinä käytetään vähemmän eläimiä ja että se aiheuttaa vähemmän kärsimystä kuin perinteiset menetelmät. Menetelmällä voidaan luokitella aineita vaarallisuuden mukaan samalla tavoin kuin muilla akuutin toksisuuden tutkimusmenetelmillä.

Ohjeita tiettyyn tarkoitukseen sopivimman tutkimusmenetelmän valinnasta on annettu akuutin oraalisen toksisuuden testausta koskevassa ohjeasiakirjassa (Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (7)). Ohjeasiakirjassa on myös lisätietoa tutkimusmenetelmä B.l a:n käyttämisestä ja tulkinnasta.

Menetelmän periaatteena on, että päätutkimuksessa käytetään ainoastaan lievästi toksisia annoksia ja että todennäköisesti tappavien annosten antamista vältetään. Annoksia, joiden tiedetään aiheuttavan voimakasta kipua ja kärsimystä syövyttävien tai vaikea-asteisten ärsytysvaikutusten vuoksi, ei myöskään tarvitse annostella. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Erillisessä ohjeasiakirjassa (8) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

Menetelmällä saadaan tietoa vaarallisista ominaisuuksista ja aineet voidaan sen perusteella sijoittaa ja luokitella akuuttia toksisuutta aiheuttavien kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun luokitusjärjestelmän mukaisesti (Globally Harmonised System (GHS) for the classification of chemicals which cause acute toxicity (9)).

Koelaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen suorittamista. Näissä tiedoissa on esitettävä aineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kaikkien muiden aineella *in vivo* tai *in vitro* suoritettujen toksisuuskokeiden tulokset, rakenteellisesti samanlaisten aineiden toksikologiset tiedot ja aineen odotettu käyttö. Nämä tiedot ovat välttämättömiä kaikkien asianosaisten vakuuttamiseksi siitä, että kokeella on merkitystä ihmisten terveyden suojelun kannattaja että sen avulla voidaan valita sopiva alkuannos.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Akuutti oraalinen toksisuus: haittavaikutukset, joita esiintyy, kun ainetta on annosteltu suun kautta kerta-annoksena tai useampana annoksena 24 tunnin aikana.

Viivästynyt kuolema: eläin ei kuole tai vaikuta kuolevalta 48 tunnin kuluessa, mutta kuolee myöhemmin 14 päivän havainnointijakson aikana.

Annos: annostellun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esimerkiksi mg/kg).

Ilmeinen toksisuus: yleistermi, jolla tarkoitetaan testiaineen antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden oireita (katso esimerkiksi (3)). Näiden oireiden perusteella vakioannoksen suurentaminen seuraavaan annokseen aiheuttaisi todennäköisesti voimakasta kipua ja jatkuvia merkkejä kovasta kärsimyksestä tai sen, että eläin on kuolemaisillaan (perusteet on esitetty eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa Humane Endpoints Guidance Document (8)) tai todennäköisesti useimpien eläinten kuoleman.

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (Kemiallisten aineiden ja seosten kansainvälisesti yhdenmukaistettu luokitusjärjestelmä). Yhteinen toimi, johon osallistuvat OECD (ihmisten terveys ja ympäristö), YK:n vaarallisten aineiden kuljettamista käsittelevä asiantuntijakomitea (fysikaalis-kemialliset ominaisuudet) ja ILO (vaarojen ilmoittaminen) ja jota koordinoidaan kemikaalien järkevää hallinnointia koskevalla organisaatioiden välisellä ohjelmalla (IOMC).

Uhkaava kuolema: eläin on vakavasti sairas tai kuolee todennäköisesti ennen seuraavaa suunniteltua havainnointiajankohtaa. Jyrsijöillä tällaista tilaa osoittavia merkkejä voivat olla kouristukset, kyljellään makaaminen, velttous ja vapina. (Katso tarkempia tietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (8)).

LD_{50} (median lethal dose, keskimääräinen tappava annos): on tilastollinen kerta-annos, jonka voidaan suun kautta annosteltuna odottaa tappavan puolet annoksen saaneista eläimistä. LD_{50}-arvo ilmoitetaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (mg/kg).

Raja-annos: kokeen yläraja-annos (2 000 tai 5 000 mg/kg).

Kuolemaisillaan oleva: eläin, joka on kuolemaisillaan tai ei kykene säilymään hengissä hoidosta huolimatta. (Katso tarkempia lisätietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (8)).

Ennustettava kuolema: sellaisten kliinisten oireiden esiintyminen, jotka viittaavat siihen, että eläin tulee kuolemaan tietyn ajan kuluttua ennen kokeen suunniteltua päättymistä. Näitä oireita ovat esimerkiksi kykenemättömyys käyttää vettä tai ruokaa. (Katso tarkempia lisätietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (8)).

▼B

1.3 KOEMENETELMÄN PERIAATE

Samaa sukupuolta olevien eläinten ryhmille annostellaan testiainetta vaiheittain käyttämällä 5, 50, 300 ja 2 000 mg:n/kg vakioannoksia (poikkeuksellisesti voidaan käyttää 5 000 mg:n/kg lisävakioannosta, katso kappale 1.6.2). Alkuannostaso valitaan esikokeen perusteella annokseksi, jonka odotetaan aiheuttavan joitakin toksisuusoireita, mutta ei kuitenkaan vakavia toksisia vaikutuksia tai kuolleisuutta. Kipuun, kärsimykseen ja uhkaavaan kuolemaan liittyviä kliinisiä oireita ja tiloja on kuvailtu yksityiskohtaisesti OECD:n ohjeasiakirjassa (8). Muille eläinryhmille voidaan antaa korkeampia tai matalampia vakioannoksia sen mukaan, esiintyykö merkkejä toksisuudesta tai kuolleisuudesta. Menettelyä jatketaan, kunnes ilmeistä toksisuutta tai korkeintaan yhden kuoleman aiheuttava annos pystytään määrittämään, tai kun korkeimmasta annoksesta ei ole havaittavissa vaikutuksia tai alhaisin annos aiheuttaa kuolemia.

1.4 KOEMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, tosin muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää. Yleensä käytetään naaraita (7). Syynä tähän on, että tavanomaisia LD_{50}-kokeita koskevien kirjallisuustutkimusten perusteella sukupuolten herkkyydessä on yleensä vähän eroja, mutta silloin kun eroja on havaittu, naaraat ovat yleensä hieman herkempiä (10). Mikäli rakenteellisesti samanlaisten kemikaalien toksikologisia ja toksikokineettisiä ominaisuuksia koskevat tiedot osoittavat urosten olevan herkempiä, on käytettävä uroksia. Kokeen tekeminen uroksilla edellyttää riittäviä perusteita.

Kokeeseen on käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä kantavia. Kunkin eläimen on annostuksensa alussa oltava 8-12 viikon ikäinen, ja sen paino saa poiketa korkeintaan ± 20 % aikaisemmin annoksen saaneiden eläinten keskipainosta.

1.4.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittävät vaatimukset suhteellisen kosteuden suhteen ovat vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Eläimet voidaan erotella eri häkkeihin annoksen mukaan, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia.

1.4.3 **Eläinten valmistelu**

Eläimet valitaan satunnaisesti ja merkitään yksilötunnistusta varten. Eläimiä pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

▼B

1.4.4 **Annosten valmistelu**

Yleensä testiaineen testattavat annokset annostellaan vakiotilavuudessa niin, että annosteltavan valmisteen pitoisuus vaihtelee. Testattaessa nestemäistä lopputuotetta tai sekoitusta testiaineen käyttö laimentamattomana eli vakiopitoisena saattaa kuitenkin olla oleellista kyseisen aineen myöhemmän riskinarvioinnin kannalta, ja jotkut sääntelyviranomaiset edellyttävätkin tällaista menettelyä. Kummassakaan tapauksessa annoksen enimmäistilavuutta ei saa ylittää. Kerralla annettavan nesteen enimmäismäärä riippuu koe-eläimen koosta. Jyrsijöillä määrä ei yleensä saa olla yli 1 ml sataa painogrammaa kohti. Vesiliuoksia voidaan kuitenkin antaa 2 ml sataa painogrammaa kohti. Annostellun valmisteen koostumukseksi suositellaan vesipitoista liuosta/suspensiota/emulsiota aina, kun se on mahdollista. Muussa tapauksessa on mieluiten käytettävä öljypohjaista (esimerkiksi maissiöljy) liuosta/suspensiota/emulsiota tässä järjestyksessä ja sen jälkeen muihin kantaja-aineisiin pohjautuvia liuoksia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Annokset on valmistettava vähän ennen annostelua paitsi, jos valmisteen tiedetään säilyttävän stabiliteettinsa käytön ajan ja sen on osoitettu olevan hyväksyttävä.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Annostelu**

Testiaine annetaan kerta-annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Mikäli kerta-annostelu ei poikkeuksellisesti ole mahdollinen, annos voidaan antaa pienempinä osina enintään 24 tunnin kuluessa.

Eläimiä ei saa ruokkia ennen annostelua (esimerkiksi rottaa on pidettävä ruoatta yli yön ja hiirtä 3–4 tuntia, mutta vettä tulee olla tarjolla). Paaston jälkeen eläimet punnitaan ja niille annetaan testiaine. Aineen annostelun jälkeen ruokintaa voidaan siirtää rotilla vielä 3–4 tuntia ja hiirillä 1–2 tuntia. Mikäli annos annetaan osina tietyn ajan kuluessa, eläimille saatetaan joutua antamaan ruokaa ja vettä jakson pituudesta riippuen.

1.5.2 **Esikoe**

Esikokeen tarkoituksena on sopivan alkuannoksen valinta päätutkimusta varten. Testiaine annostellaan yksittäisille eläimille vaiheittain liitteessä 1 esitetyn toimenpidekaavion mukaisesti. Esikoe on valmis, kun päätös päätutkimuksessa käytettävästä alkuannoksesta voidaan tehdä (tai jos kuolleisuutta ilmenee alhaisimman vakioannoksen yhteydessä).

Esikokeen alkuannos valitaan vakioannostasoista 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg. Valitun alkuannoksen odotetaan aiheuttavan ilmeistä toksisuutta ja sen on mahdollisuuksien mukaan perustuttava samalla kemikaalilla tai rakenteellisesti samanlaisilla kemikaaleilla suoritettujen *in vivo*- tai *in vitro* -testien tietoihin. Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, alkuannos on 300 mg/kg.

Annokset annetaan eläimille vähintään 24 tunnin välein. Kaikkia eläimiä on havainnoitava vähintään 14 päivää.

▼B

Korkeinta 5 000 mg:n/kg vakioannostasoa voidaan käyttää poikkeuksellisesti ja vain silloin, kun se on perusteltua erityisten sääntelyyn liittyvien vaatimusten vuoksi (katso liite 3). Eläinten hyvinvoinnin takia eläinkokeiden tekeminen GHS-luokassa 5 annoksella 2 000–5 000 mg/kg ei ole suositeltavaa, ja sitä tulee käyttää vain, kun on erittäin todennäköistä, että tällaisen kokeen tuloksilla on välitöntä merkitystä eläinten tai ihmisten terveyden tai ympäristön suojelemiselle.

Kun esikokeessa alhaisimmalla vakioannostasolla (5mg/kg) testattu eläin kuolee, tavanomainen menettely on päättää tutkimus ja luokitella aine GHS-luokkaan 1 (kuten liitteessä 1 on esitetty). Mikäli luokitus on kuitenkin vielä varmennettava, voidaan suorittaa seuraavanlainen vaihtoehtoinen lisätoimenpide: Toiselle eläimelle annetaan 5 mg:n/kg annos. Mikäli eläin kuolee, vahvistetaan luokitukseksi GHS-luokka 1 ja tutkimus päätetään välittömästi. Mikäli eläin jää henkiin, annetaan korkeintaan kolmelle muulle eläimelle 5 mg:n/kg annos. Koska kuolleisuusriski on suuri, annostelun tulee tapahtua vaiheittain eläinten hyvinvoinnin turvaamiseksi. Annokset on annettava eläimille riittävin aikavälein, jotta voidaan osoittaa edellisen eläimen todennäköisesti jäävän henkiin. Mikäli toinen eläin kuolee, annostelu keskeytetään välittömästi eikä enempää eläimiä testata. Koska toisen eläimen kuolema (riippumatta testattujen eläinten määrästä päättymishetkellä) kuuluu tulosluokkaan A (kaksi tai useampia eläimiä kuolee), noudatetaan 5 mg:n/kg vakioannokselle liitteessä 2 esitettyä luokitussääntöä (luokka 1 mikäli kaksi tai useampia eläimiä kuolee tai luokka 2 mikäli vain yksi eläin kuolee). Lisäksi liitteessä 4 annetaan ohjeita EU:n järjestelmän mukaisesta luokituksesta ennen uuden GHS-järjestelmän käyttöönottoa.

1.5.3 **Päätutkimus**

1.5.3.1 *Eläinten määrä ja annostasot*

Alkuannostasolla tapahtuneen testauksen jälkeen suoritettavat toimet on esitetty toimenpidekaavioissa liitteessä 2. Valittavana on kolme toimintavaihtoehtoa: testauksen keskeyttäminen ja sopivan vaarallisuusluokan määrittäminen, korkeamman vakioannoksen testaaminen tai matalamman vakioannoksen testaaminen. Eläinten suojelemiseksi päätutkimuksessa ei kuitenkaan käytetä uudestaan esikokeessa kuolemaan johtanutta annostasoa (katso liite 2). Kokemusten mukaan todennäköisin tulos alkuannostasolla on, että aine voidaan luokitella eikä uutta testausta tarvita.

Yleensä kullakin tutkitulla annostasolla käytetään yhteensä viittä samaa sukupuolta olevaa eläintä. Näihin viiteen eläimeen kuuluu yksi esikokeessa valitulla annostasolla testattu eläin sekä neljä muuta eläintä (paitsi jos päätutkimuksessa käytetty annostaso ei poikkeuksellisesti sisältynyt katsaustutkimukseen).

Annostelun aikaväli kullakin tasolla määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Seuraavan annoksen antamista tulee siirtää, kunnes jo annosteltujen eläinten eloonjäämisestä on saatu varmuus. Tarvittaessa annosteluväliksi suositellaan jokaisella annostasolla 3–4 päivää viivästyneen toksisuuden havainnoimiseksi. Aikaväliä voidaan muuttaa sopivaksi esimerkiksi, jos vasteesta ei vielä ole täyttä varmuutta.

▼B

Käytettäessä korkeinta 5 000 mg:n/kg vakioannosta on noudatettava liitteessä 3 esitettyä menettelytapaa (katso myös kappale 1.6.2).

1.5.3.2 *Raja-annostesti*

Raja-annostestiä käytetään pääasiassa silloin, kun tutkimuksen tekijällä on tietoa, jonka mukaan testiaine on todennäköisesti ei-toksinen, toisin sanoen se on toksista ainoastaan ylittäessään säädösten mukaiset raja-annokset. Tietoa testiaineen toksisuudesta saadaan samanlaisia testattuja yhdisteitä tai seoksia koskevista tiedoista, kun otetaan huomioon toksikologisesti merkittävien ainesosien tunnistetiedot ja prosenttiosuus. Päätutkimus on suoritettava, kun testiaineen toksisuudesta on vain vähän tai ei lainkaan tietoa tai kun se todennäköisesti on toksinen.

Näiden ohjeiden mukaisena raja-annostestinä voidaan tavanomaista menettelytapaa käytettäessä käyttää katsaustutkimusta, jossa alkuannos on 2 000 mg/kg (tai poikkeuksellisesti 5 000 mg/kg), ja jossa sen jälkeen annetaan neljälle muulle eläimelle sama annos.

1.6 HAVAINNOINTI

Eläimiä havainnoidaan yksittäin annostelun jälkeen vähintään yhden kerran ensimmäisten 30 minuutin aikana ja säännöllisin väliajoin ensimmäisten 24 tunnin aikana. Havainnoinnin on oltava erityisen tarkkaa ensimmäisten neljän tunnin aikana. Sen jälkeen havainnointi tapahtuu päivittäin 14 päivän ajan paitsi, jos eläin on poistettava tutkimuksesta ja lopetettava humaanilla tavalla eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi tai se löydetään kuolleena. Havainnoinnin kestoa ei pitäisi kuitenkaan määritellä tiukasti. Se tulee määrittää toksisten reaktioiden, niiden alkamishetken ja toipumisen keston perusteella ja sitä tulisi voida pidentää tarvittaessa. Toksisuusoireiden ilmaantumis- ja häviämisajankohdat ovat tärkeitä etenkin, jos toksisilla oireilla on taipumus viivästyä (11). Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti eläinkohtaisesti.

Lisähavainnointi on tarpeen jos eläinten toksisuusoireet jatkuvat. Havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon (8). Kuolevat eläimet ja eläimet, jotka osoittavat merkkejä voimakkaasta kivusta ja jatkuvasta kovasta kärsimyksestä, tulee lopettaa humaanilla tavalla. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

1.6.1 **Ruumiinpaino**

Kunkin eläimen paino on määritettävä hieman ennen testiaineen annostelua ja vähintään viikoittain sen jälkeen. Painon muutokset on laskettava ja kirjattava. Kokeen päätyttyä henkiin jääneet eläimet punnitaan ja lopetetaan sen jälkeen humaanilla tavalla.

▼B

1.6.2 **Patologia**

Kaikki koe-eläimet (myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi tutkimuksesta poistetut) avataan. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata. Ensimmäisen annostelun jälkeen vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet voidaan myös tutkia mikroskooppisesti siitä mahdollisesti saatavan hyödyllisen tiedon vuoksi.

2. **TULOKSET**

Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tulokset. Kaikki tulokset tulee esittää myös yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 LOPPURAPORTTI

Loppuraportin tulee tarpeen mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (myös isomeroituminen),

— tunnistetiedot CAS-numero mukaan lukien.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— perustelut kantaja-aineen valinnalle, mikäli se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji ja -kanta,

— eläinten mikrobiologinen status, mikäli se on tiedossa,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli (tarvittaessa myös perusteet urosten käytölle naaraiden sijasta),

— lähde, ylläpito-olosuhteet, ravinto jne.

Koeolosuhteet:

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta, mukaan luettuna annostellun aineen fysikaalinen muoto,

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen annostelusta, mukaan luettuina annostelutilavuudet ja -ajankohta,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan lukien eläinrehun tyyppi/lähde, veden lähde),

— alkuannoksen valintaperusteet.

▼B

Tulokset:

— kunkin eläimen vastetulosten ja annostason taulukot (toksisuusoireet, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste ja kesto),

— ruumiinpainon ja siinä tapahtuneiden muutosten taulukot,

— kunkin eläimen paino annostelupäivänä, sen jälkeen viikon välein sekä kuolin- tai lopettamishetkellä,

— kuolinpäivä ja -ajankohta, mikäli eläin kuolee ennen suunniteltua lopettamista,

— kunkin eläimen toksisuusoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen,

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla.

Tulosten tarkastelu ja tulkinta.

Johtopäätökset

4. **VIITTEET**

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

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

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Cumow, 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.

▼B

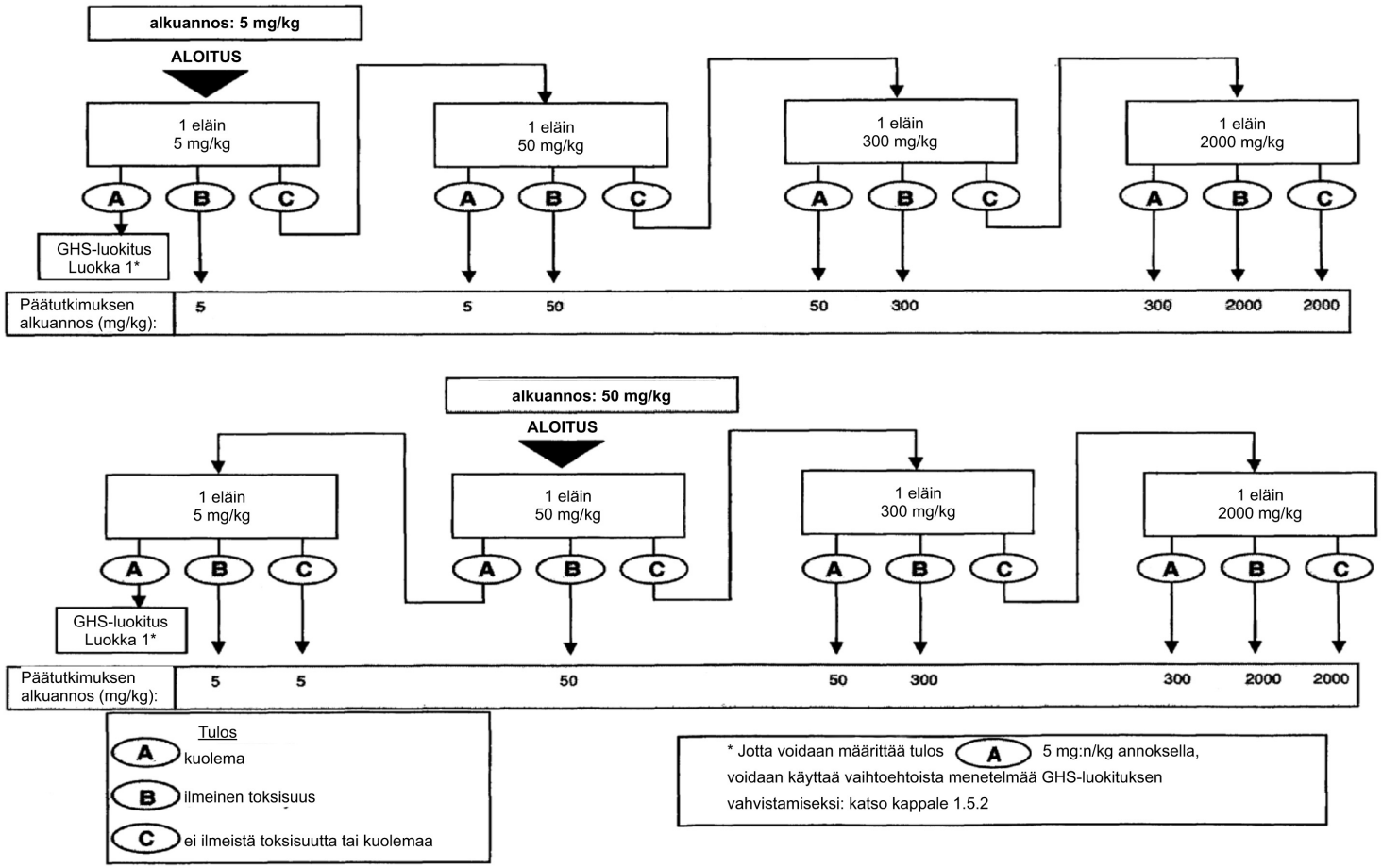
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(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 LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

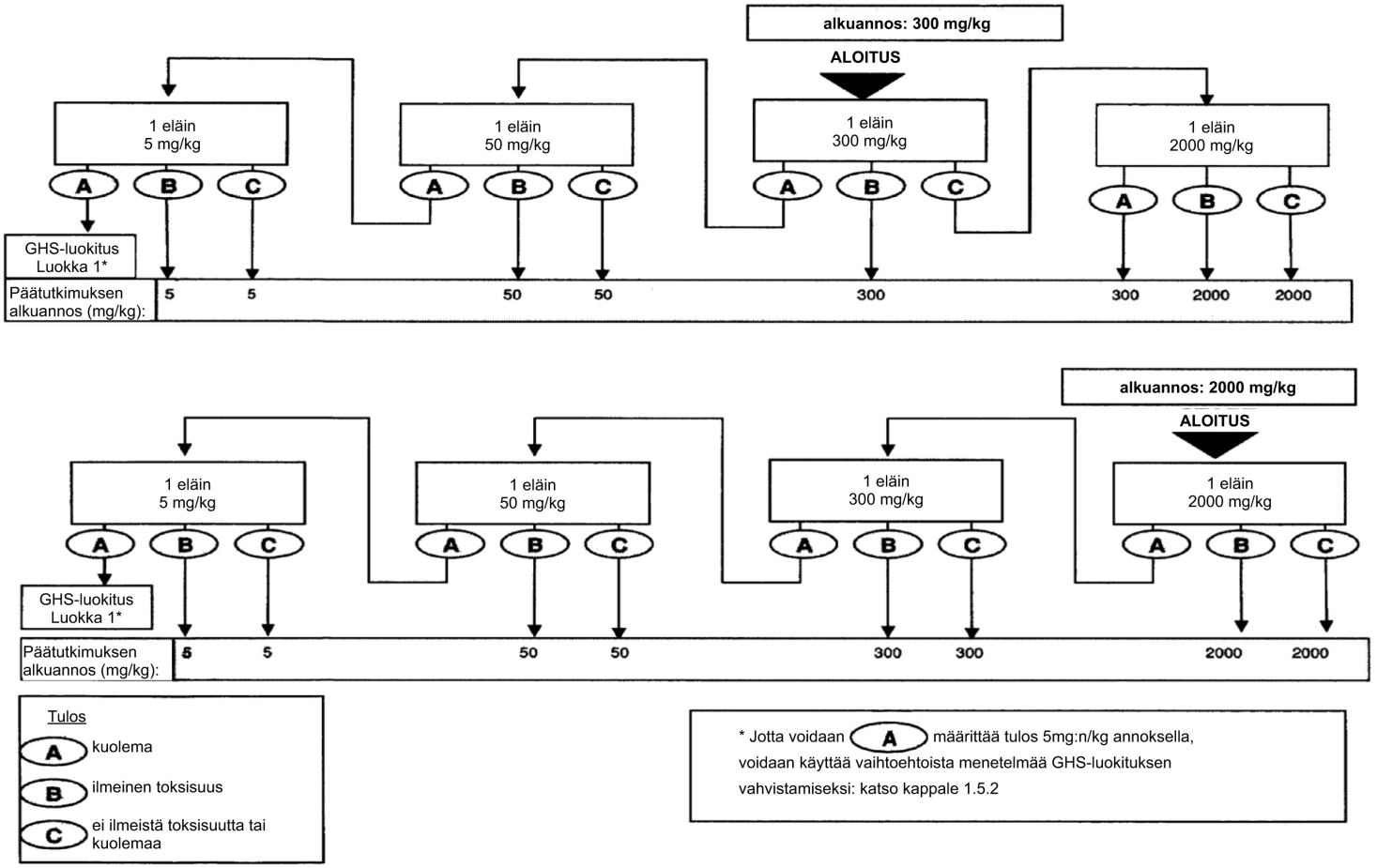
(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology . 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

LIITE 1:

ESIKOKEEN TOIMENPIDEKAAVIO

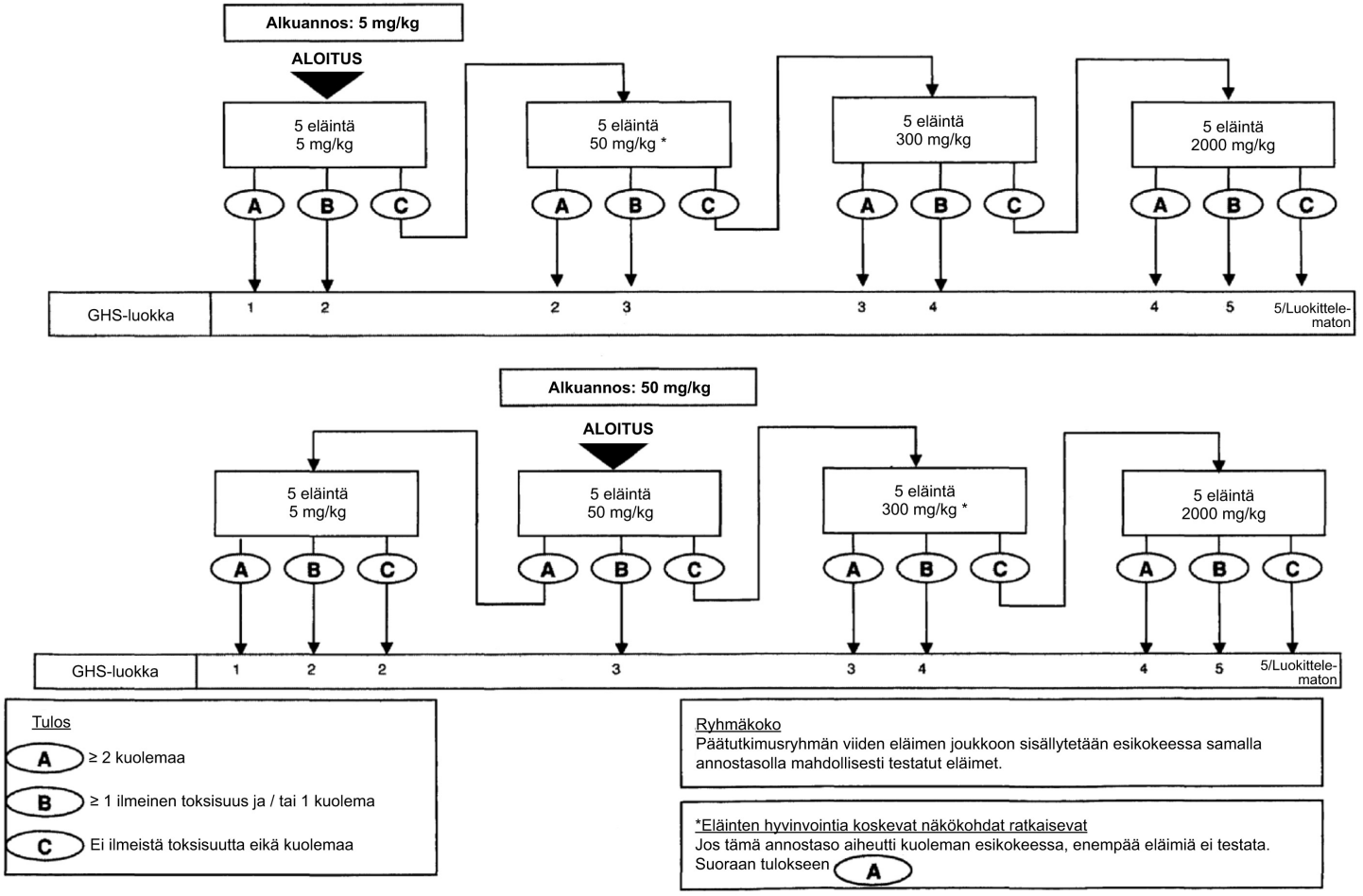


▼B

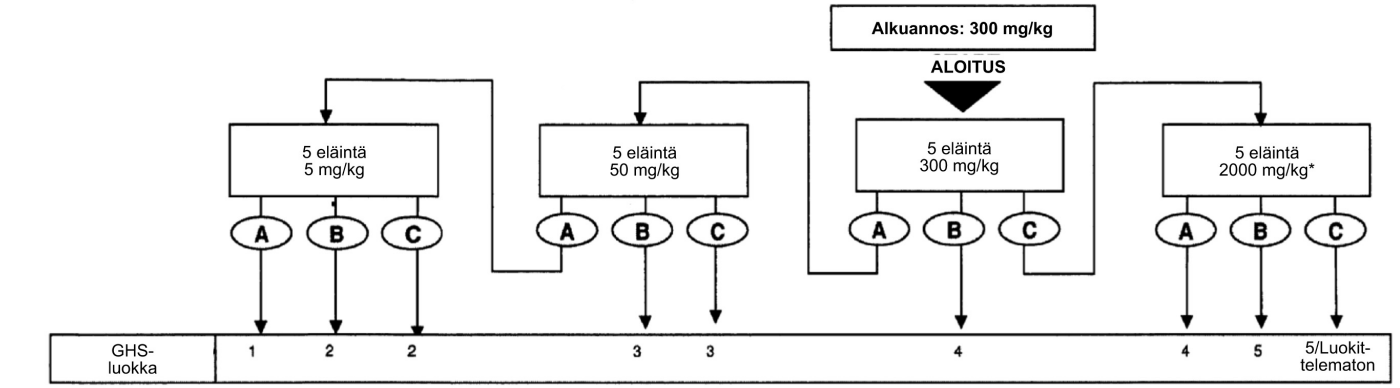

alkuannos: 300 mg/kg
ALOITUS
1 eläin
5 mg/kg
1 eläin
50 mg/kg
1 eläin
300 mg/kg
1 eläin
2000 mg/kg
A
B
C
GHS-luokitus
Luokka 1*
Päätutkimuksen
alkuannos (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
alkuannos: 2000 mg/kg
ALOITUS
1 eläin
5 mg/kg
1 eläin
50 mg/kg
1 eläin
300 mg/kg
1 eläin
2000 mg/kg
A
B
C
GHS-luokitus
Luokka 1*
Päätutkimuksen
alkuannos (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Tulos
A
kuolema
B
ilmeinen toksisuus
C
ei ilmeistä toksisuutta tai
kuolemaa
* Jotta voidaan A määrittää tulos 5mg:n/kg annoksella,
voidaan käyttää vaihtoehtoista menetelmää GHS-luokituksen
vahvistamiseksi: katso kappale 1.5.2

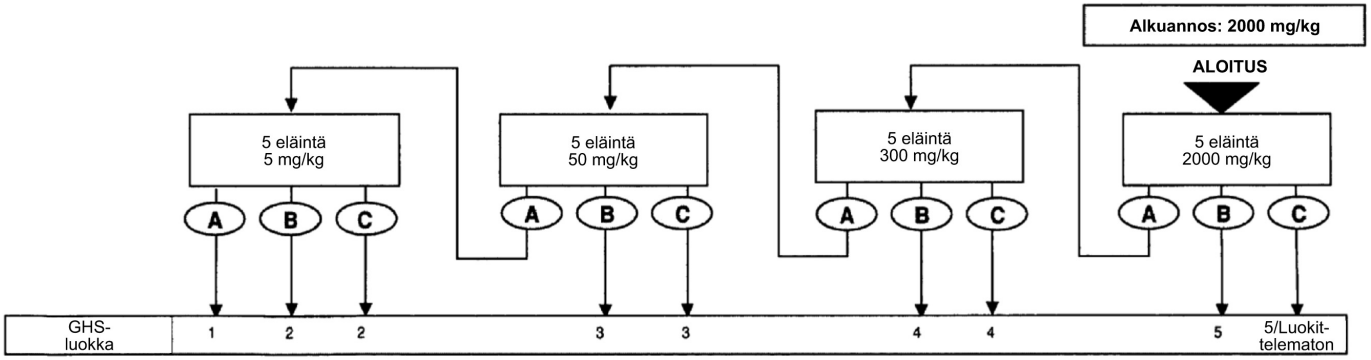
LIITE 2:

PÄÄTUTKIMUKSEN TOIMENPIDEKAAVIO



▼B





Tulos

A > 2 kuolemaa

B > 1 ilmeinen toksisuus ja / tai 1 kuolema

C Ei ilmeistä toksisuutta eikä kuolemaa

Ryhmäkoko

Päätutkimusryhmän viiden eläimen joukkoon sisällytetään esikokeessa samalla annostasolla mahdollisesti testatut eläimet.

*Eläinten hyvinvointia koskevat näkökohdat ratkaisevat

Jos tämä annostaso aiheutti kuoleman esikokeessa, enempää eläimiä ei testata.

Suoraan tulokseen A.

▼B

LIITE 3

PERUSTEET SELLAISTEN TESTIAINEIDEN LUOKITTELULLE, JOIDEN ODOTETTAVISSA OLEVA LD_{50}-ARVO YLITTÄÄ 2 000 MG/KG JA JOITA EI TARVITSE TESTATA

Vaarallisuusluokkaa 5 koskevien kriteereiden avulla on tarkoitus tunnistaa sellaiset testiaineet, joiden akuutti toksisuusvaara on suhteellisen alhainen, mutta jotka tietyissä olosuhteissa voivat olla vaaraksi heikommille populaatioille. Näiden aineiden LD_{50}-arvon odotetaan vaihtelevan välillä 2 000–5 000 mg/kg ihon tai suun kautta annosteltuna tai vastaavina annoksina muuta kautta annettuna. Testiaineet voidaan luokitella vaarallisuusluokkaan, jonka rajat ovat 2 000 mg/kg $< LD_{50} <$ 5 000 mg/kg (luokka 5 GHS-järjestelmässä) seuraavissa tapauksissa:

a) mikäli aine määritellään missä tahansa liitteessä 2 esitetyistä koejärjestelyistä tähän luokkaan kuuluvaksi kuolleisuuden esiintymisen perusteella;

b) mikäli on jo käytettävissä luotettavia todisteita, joiden mukaan LD_{50} on luokkaan 5 kuuluvien arvojen vaihteluvälin rajoissa tai mikäli muut eläinkokeet tai toksiset vaikutukset ihmisillä osoittavat, että asialla on välitöntä merkitystä ihmisten terveydelle;

c) tietoja ekstrapoloimalla, arvioimalla tai mittaamalla, jos määritteleminen korkeampaan vaarallisuusluokkaan ei ole aiheellista; ja kun

   — käytettävissä on luotettavaa tietoa, joka osoittaa huomattavia toksisuusvaikutuksia ihmisillä, tai

   — kun havaitaan kuolleisuutta testattaessa suun kautta enintään luokkaa 4 vastaavia arvoja, tai kun

   — asiantuntija-arvio vahvistaa huomattavia kliinisiä toksisuusoireita testattaessa enintään luokkaa 4 vastaavia arvoja, lukuun ottamatta ripulia, piloerektiota tai puhtauden laiminlyöntiä, tai kun

   — asiantuntija-arvio vahvistaa muista eläinkokeista saadut luotettavat tiedot, joiden mukaan huomattavat akuutit vaikutukset ovat mahdollisia.

TESTAAMINEN 2 000 MG/KG YLITTÄVILLÄ ANNOKSILLA

Korkeinta 5 000 mg:n/kg vakioannostasoa voidaan käyttää poikkeuksellisesti ja vain silloin, kun se on perusteltua erityisten sääntelyyn liittyvien vaatimusten vuoksi. Koska eläinten hyvinvointia on suojeltava, kokeiden tekeminen 5 000 mg:n/kg annoksella ei ole suositeltavaa, ja sitä tulee käyttää vain kun on erittäin todennäköistä, että tällaisen kokeen tuloksilla on välitöntä merkitystä eläinten tai ihmisten terveyden tai ympäristön suojelemiselle (9).

Esikoe

Liitteessä 1 esitettyä vaiheittaista menettelyä koskevia päätöksentekosääntöjä laajennetaan siten, että niihin sisältyy 5 000 mg:n/kg annostaso. Käytettäessä esikokeen alkuannoksena 5 000 mg:aa/kg tulos A (kuolema) edellyttää kokeen tekemistä toisella eläimellä 2 000 mg:n/kg annoksella. Jos saadaan tulos B tai C (ilmeinen toksisuus tai ei toksisuutta), voidaan päätutkimuksen alkuannokseksi valita 5 000 mg/kg. Vastaavasti käytettäessä muuta alkuannosta kuin 5 000 mg:aa/kg koetta jatketaan 5 000 mg:aan/kg asti siinä tapauksessa, että kokeen tulos on B tai C 2 000 mg:n/kg annoksella. Mikäli 5 000 mg:n/kg annoksella saadaan myöhemmin tulokseksi A, on päätutkimuksen alkuannos 2 000 mg/kg. Mikäli tulokseksi saadaan B ja C, on päätutkimuksen alkuannos 5 000 mg/kg.

▼B

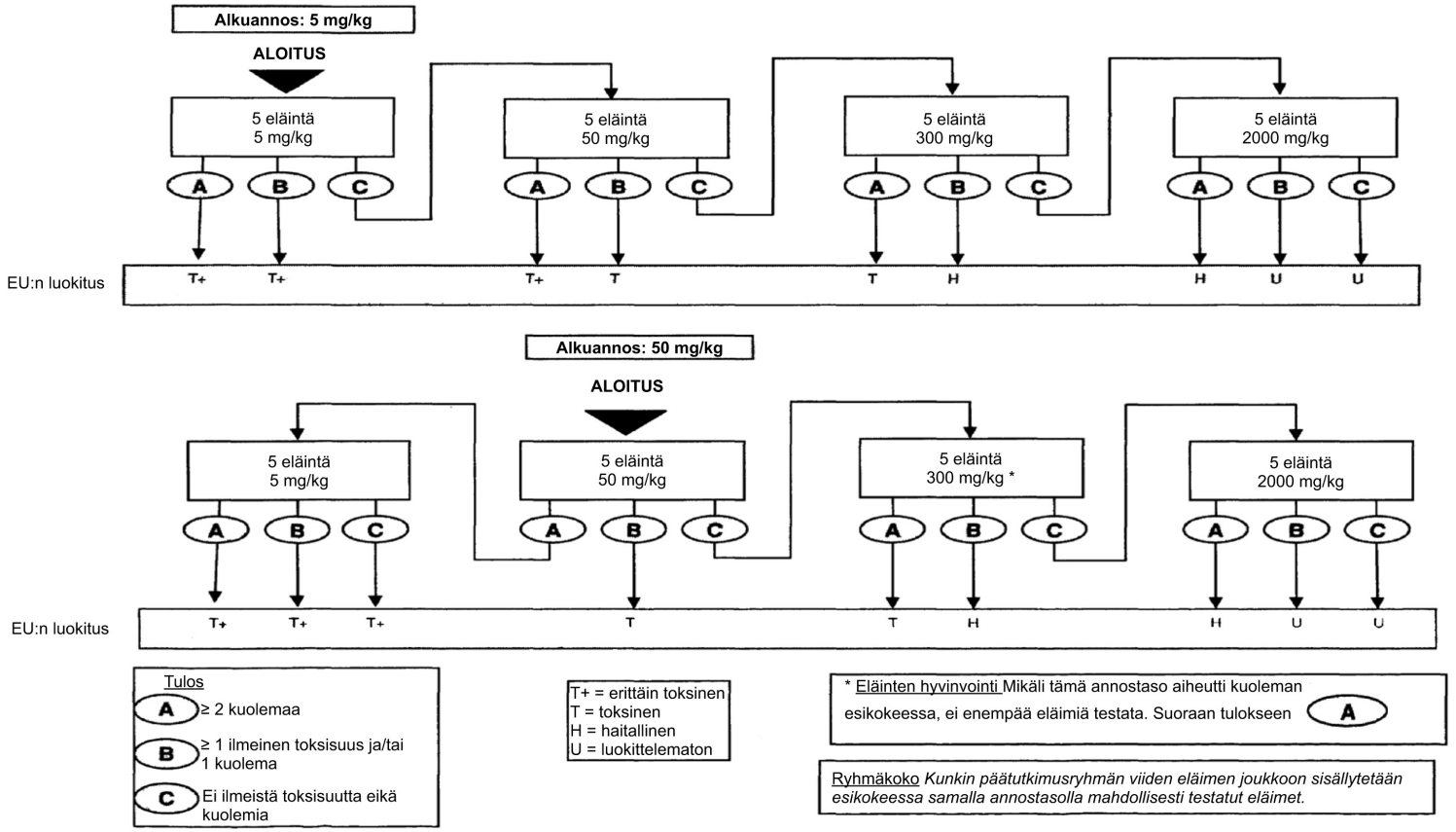
Päätutkimus

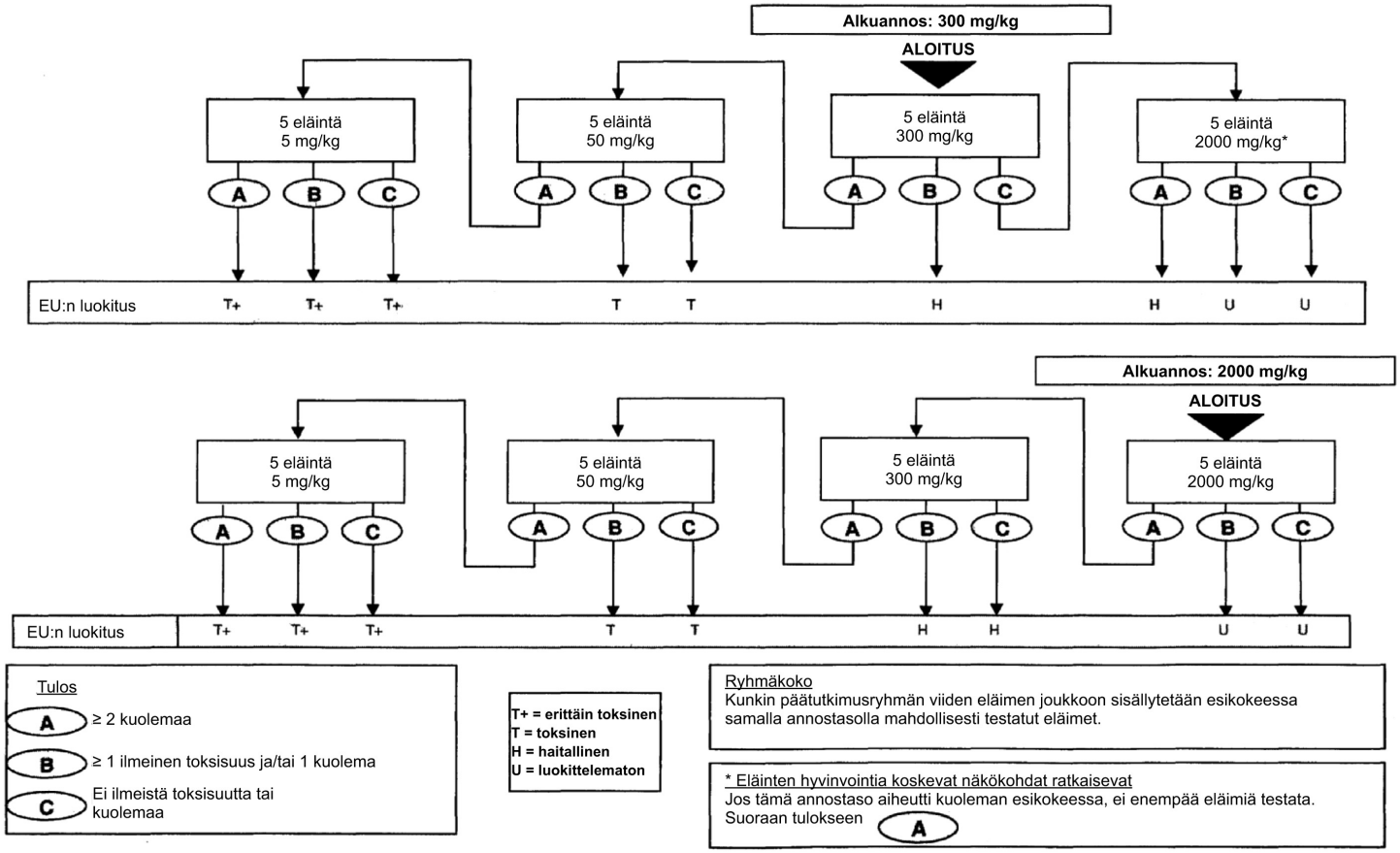
Liitteessä 2 esitettyä vaiheittaista menettelyä koskevia päätöksentekosääntöjä laajennetaan siten, että niihin sisältyy 5 000 mg:n/kg annostaso. Käytettäessä päätutkimuksen alkuannoksena 5 000 mg:aa/kg tulos A (>2 kuolemaa) edellyttää kokeen tekemistä toisella ryhmällä 2 000 mg:n/kg annoksella. Mikäli tulos on B (ilmeinen toksisuus ja/tai < 1 kuolemaa) tai C (ei toksisuutta), ainetta ei GHS-järjestelmän mukaan luokitella. Vastaavasti käytettäessä muuta alkuannosta kuin 5 000 mg:aa/kg koetta jatketaan 5 000 mg:aan/kg asti siinä tapauksessa että kokeen tulos on C 2 000 mg:n/kg annoksella. Mikäli myöhemmin saadaan 5 000 mg:n/kg annoksella tulos A, aine luokitellaan kuuluvaksi GHS-järjestelmän luokkaan 5. Mikäli tulos on B tai C, ainetta ei luokitella.

LIITE 4

KOEMENETELMÄ B. 1 a

EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa




Alkuannos: 300 mg/kg
ALOITUS
5 eläintä 5 mg/kg
5 eläintä 50 mg/kg
5 eläintä 300 mg/kg
5 eläintä 2000 mg/kg*
A B C
EU:n luokitus
T+ T+ T+ T T H H U U
Alkuannos: 2000 mg/kg
ALOITUS
5 eläintä 5 mg/kg
5 eläintä 50 mg/kg
5 eläintä 300 mg/kg
5 eläintä 2000 mg/kg
EU:n luokitus
T+ T+ T+ T T H H U U
Tulos
A ≥ 2 kuolemaa
B ≥ 1 ilmeinen toksisuus ja/tai 1 kuolema
C Ei ilmeistä toksisuutta tai kuolemaa
T+ = erittäin toksinen
T = toksinen
H = haitallinen
U = luokittelematon
Ryhmäkoko
Kunkin päätutkimusryhmän viiden eläimen joukkoon sisällytetään esikokeessa samalla annostasolla mahdollisesti testatut eläimet.
* Eläinten hyvinvointia koskevat näkökohdat ratkaisevat
Jos tämä annostaso aiheutti kuoleman esikokeessa, ei enempää eläimiä testata.
Suoraan tulokseen A

▼B

B.1 b. **AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 423 (2001)

1.1 JOHDANTO

Tässä esitetään vaiheittainen akuutin toksisuusluokan menetelmä (1), jonka kussakin vaiheessa käytetään kolmea samaa sukupuolta olevaa eläintä. Testiaineen akuutin toksisuuden arvioimiseksi saatetaan tarvita keskimäärin kahdesta neljään vaihetta riippuen eläinten kuolleisuudesta ja/tai siitä, ovatko ne kuolemaisillaan. Menetelmä on toistettava ja siinä käytetään erittäin vähän eläimiä. Sillä voidaan luokitella aineita vaarallisuuden mukaan samalla tavoin kuin muilla akuutin toksisuuden tutkimusmenetelmillä. Akuutin toksisuusluokan menetelmä perustuu biometrisiin arviointeihin (2) (3) (4) (5) vakioannoksilla, jotka eroavat toisistaan riittävästi aineen luokittelemiseksi vaarallisuuden mukaan ja riskin arvioimiseksi. Menetelmä hyväksyttiin vuonna 1996, ja se on validoitu laajasti sekä kansallisella tasolla (6) että kansainvälisellä tasolla (7) *in vivo* vertaamalla tuloksia kirjallisuudesta saatuihin LD_{50}-arvoja koskeviin tietoihin.

Ohjeita tiettyyn tarkoitukseen sopivimman tutkimusmenetelmän valinnasta on annettu akuutin oraalisen toksisuuden testausta käsittelevässä ohjeasiakirjassa (Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (S)). Ohjeasiakirjassa on myös lisätietoa tutkimusmenetelmä B.1 b:n käyttämisestä ja tulkinnasta.

Testiaineita ei tarvitse annostella annoksina, joiden tiedetään aiheuttavan voimakasta kipua ja kärsimystä syövyttävien tai vaikea-asteisten ärsytysvaikutusten vuoksi. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Erillisessä ohjeasiakirjassa (9) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

Menetelmässä käytetään etukäteen määriteltyjä annoksia, ja tulosten avulla voidaan määritellä aineen vaarallisuusaste ja luokitella se akuuttia toksisuutta aiheuttavien kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun luokitusjärjestelmän mukaisesti (Globally Harmonised System for the classification of chemicals which cause acute toxicity (10)).

Periaatteessa menetelmän avulla ei ole tarkoitus laskea tarkkaa LD_{50}-annosta, vaan sillä voidaan määrittää tietty altistusalue, jolla kuolleisuutta on odotettavissa, sillä kokeen tärkein päätepiste on edelleenkin se, että osa eläimistä kuolee. Menetelmän avulla voidaan määrittää LD_{50}-arvo vain silloin, kun vähintään kaksi annosta aiheuttaa kuolleisuuden, joka on korkeampi kuin 0 % ja alhaisempi kuin 100 %. Menetelmässä käytetään testiaineesta riippumatta tiettyjä etukäteen määriteltyjä annoksia, ja luokitus tehdään selkeästi eri tilassa olevien eläinten määrästä tehtyjen havaintojen perusteella. Tämän ansiosta eri laboratorioiden raportit ovat yhdenmukaisempia ja toistettavampia.

▼B

Koelaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen suorittamista. Näitä tietoja ovat mm. aineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kaikkien muiden aineella *in vitro* tai *in vivo* suoritettujen toksisuuskokeiden tulokset, rakenteellisesti samanlaisten aineiden toksikologiset tiedot ja aineen odotettu käyttö. Nämä tiedot ovat välttämättömiä kaikkien asianosaisten vakuuttamiseksi siitä, että kokeella on merkitystä ihmisten terveyden suojelun kannalta ja että sen avulla voidaan valita sopiva alkuannos.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Akuutti oraalinen toksisuus: haittavaikutukset, joita esiintyy, kun ainetta on annosteltu suun kautta kerta-annoksena tai useina annoksina 24 tunnin aikana.

Viivästynyt kuolema: eläin ei kuole tai vaikuta kuolevalta 48 tunnin kuluessa, mutta kuolee myöhemmin 14 päivän havainnointijakson aikana.

Annos: annostellun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esimerkiksi mg/kg).

GHS: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (Kemiallisten aineiden ja seosten kansainvälisesti yhdenmukaistettu luokitusjärjestelmä). Yhteinen toimi, johon osallistuvat OECD (ihmisten terveys ja ympäristö), YK:n vaarallisten aineiden kuljettamista käsittelevä asiantuntijakomitea (fysikaalis-kemialliset ominaisuudet) ja ILO (vaarojen ilmoittaminen) ja jota koordinoi kemikaalien järkevää hallinnointia koskeva organisaatioiden välinen ohjelma (IOMC).

Uhkaava kuolema: eläin on vakavasti sairas tai kuolee todennäköisesti ennen seuraavaa suunniteltua havainnointiajankohtaa. Jyrsijöillä tällaista tilaa osoittavia merkkejä voivat olla kouristukset, kyljellään makaaminen, velttous ja vapina. (Katso tarkempia tietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (9)).

LD_{50} (median lethal oral dose, keskimääräinen tappava annos suun kautta annettuna): on tilastollinen kerta-annos, jonka voidaan suun kautta annosteltuna odottaa tappavan puolet annoksen saaneista eläimistä. LD_{50}-arvo ilmoitetaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (mg/kg).

Raja-annos: kokeen yläraja-annos (2 000 tai 5 000 mg/kg).

Kuolemaisillaan oleva: eläin, joka on kuolemaisillaan tai ei kykene säilymään hengissä hoidosta huolimatta. (Katso tarkempia lisätietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (9)).

Ennustettava kuolema: sellaisten kliinisten oireiden esiintyminen, jotka viittaavat siihen, että eläin tulee kuolemaan tietyn ajan kuluttua ennen kokeen suunniteltua päättymistä. Näitä oireita ovat esimerkiksi kykenemättömyys käyttää vettä tai ruokaa. (Katso tarkempia lisätietoja eläinkokeen humaaneja lopettamiskriteereitä koskevasta ohjeasiakirjasta (9)).

▼B

1.3 TESTIN PERIAATE

Testin periaate on, että vaiheittaisella menetelmällä ja käyttämällä mahdollisimman vähän eläimiä kussakin vaiheessa saadaan riittävästi tietoa testiaineen akuutista toksisuudesta sen luokittelemiseksi. Ainetta annetaan koe-eläinryhmälle suun kautta yhdellä määritellyistä annostasoista. Ainetta testataan vaiheittain siten, että kussakin vaiheessa käytetään kolmea samaa sukupuolta olevaa eläintä (yleensä naaraita). Kyseisestä yhdisteestä johtuva kuolleisuus kussakin testin vaiheessa määrää kokeen seuraavan vaiheen, eli

— lisäkokeita ei tarvita,

— ainetta annetaan kolmelle muulle eläimelle samalla annostasolla,

— ainetta annetaan kolmelle muulle eläimelle astetta korkeammalla tai astetta matalammalla annostasolla.

Testin suoritus on kuvattu yksityiskohtaisesti liitteessä 1. Menetelmän avulla testiaine voidaan luokitella johonkin niistä toksisuusluokista, jotka on määritelty kiinteiden LD_{50}-raja-arvojen perusteella.

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, tosin muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää. Yleensä käytetään naaraita (9). Syynä tähän on, että tavanomaisia LD_{50}-kokeita koskevien kirjallisuustutkimusten perusteella sukupuolten herkkyydessä on vähäisiä eroja, mutta silloin kun eroja on havaittu, naaraat ovat yleensä hieman herkempiä (11). Mikäli rakenteellisesti samanlaisten kemikaalien toksikologisia ja toksikokineettisiä ominaisuuksia koskevat tiedot osoittavat urosten olevan herkempiä, on käytettävä uroksia. Kokeen tekeminen uroksilla edellyttää riittäviä perusteita.

Kokeeseen on käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä kantavia. Kunkin eläimen on annostuksensa alussa oltava 8–12 viikon ikäinen, ja sen paino saa poiketa korkeintaan ± 20 % aikaisemmin annoksen saaneiden eläinten keskipainosta.

1.4.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittävät vaatimukset suhteellisen kosteuden suhteen ovat vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Eläimet voidaan sijoittaa eri häkkeihin ryhmissä annoksen mukaan, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia.

▼B

1.4.3 **Eläinten valmistelu**

Eläimet valitaan satunnaisesti ja merkitään yksilötunnistusta varten. Eläimiä pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

1.4.4 **Annosten valmistelu**

Yleensä testiaineen testattavat annokset annostellaan vakiotilavuudessa niin, että annosteltavan valmisteen pitoisuus vaihtelee. Testattaessa nestemäistä lopputuotetta tai seosta testiaineen käyttö laimentamattomana eli vakiopitoisena saattaa kuitenkin olla oleellista kyseisen aineen myöhemmän riskinarvioinnin kannalta, ja jotkut sääntelyviranomaiset edellyttävätkin tällaista menettelyä. Kummassakaan tapauksessa annoksen enimmäistilavuutta ei saa ylittää. Kerralla annettava nesteen enimmäismäärä riippuu koe-eläimen koosta. Jyrsijöillä määrä ei yleensä saa olla yli 1 ml sataa painogrammaa kohti. Vesiliuoksia voidaan kuitenkin antaa 2 ml sataa painogrammaa kohti. Annostellun valmisteen koostumukseksi suositellaan vesipohjaista liuosta/suspensiota/emulsiota aina kun se on mahdollista. Muussa tapauksessa on mieluiten käytettävä öljypohjaista (esimerkiksi maissiöljy) liuosta/suspensiota/emulsiota tässä järjestyksessä ja sen jälkeen muihin kantaja-aineisiin pohjautuvia liuoksia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Annokset on valmistettava vähän ennen annostelua paitsi, jos valmisteen tiedetään säilyttävän stabiliteettinsa käytön ajan ja sen on osoitettu olevan hyväksyttävä.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Annostelu**

Testiaine annetaan kerta-annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Mikäli kerta-annostelu ei poikkeuksellisesti ole mahdollinen, annos voidaan antaa pienempinä osina enintään 24 tunnin kuluessa.

Eläimiä ei saa ruokkia ennen annostelua (esimerkiksi rottaa on pidettävä ruoatta yli yön ja hiirtä 3–4 tuntia, mutta vettä tulee olla tarjolla). Paaston jälkeen eläimet punnitaan ja niille annetaan testiaine. Aineen annostelun jälkeen ruokintaa voidaan siirtää rotilla vielä 3–4 tuntia ja hiirillä 1–2 tuntia. Mikäli annos annetaan osina tietyn ajan kuluessa, eläimille saatetaan joutua antamaan ruokaa ja vettä jakson pituudesta riippuen.

1.5.2 **Eläinten määrä ja annostasot**

Kussakin vaiheessa käytetään kolmea eläintä. Alkuannostasoksi valitaan yksi neljästä vakiotasosta, jotka ovat 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg. Alkuannostason tulee olla sellainen, että se todennäköisesti tappaa muutaman annoksen saaneista eläimistä. Liitteessä 1 esitetyissä toimenpidekaavioissa kuvataan kunkin alkuannoksen yhteydessä noudatettava menettely. Lisäksi liitteessä 4 annetaan ohjeita EU:n järjestelmän mukaisesta luokituksesta ennen uuden GHS-järjestelmän käyttöönottoa.

▼B

Kun saatavissa olevat tiedot viittaavat siihen, ettei korkein alkuannostaso (2 000 mg/kg) todennäköisesti aiheuta eläinten kuolemaa, on tehtävä raja-annostesti. Kun testiaineesta ei ole tietoja, alkuannokseksi suositellaan eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi 300 mg/kg.

Testiryhmien testaamisen aikavälit määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Seuraavan annoksen antamista tulee siirtää, kunnes jo annosteltujen eläinten eloonjäämisestä on saatu varmuus.

Korkeinta 5 000 mg:n/kg annostasoa voidaan käyttää poikkeuksellisesti ja vain silloin, kun se on perusteltua erityisten sääntelyyn liittyvien vaatimusten vuoksi (katso liite 2). Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi eläinkokeiden tekeminen GHS-luokan 5 annoksilla (2 000–5 000 mg/kg) ei ole suositeltavaa, ja niitä tulee käyttää vain, kun on erittäin todennäköistä, että tällaisen kokeen tuloksilla on välitöntä merkitystä ihmisten tai eläinten terveyden tai ympäristön suojelemiselle.

1.5.3 **Raja-annostesti**

Raja-annostestiä käytetään pääasiassa silloin, kun tutkimuksen tekijällä on tietoa, jonka mukaan testiaine on todennäköisesti ei-toksinen, toisin sanoen se on toksista ainoastaan ylittäessään säädösten mukaiset raja-annokset. Tietoa testiaineen toksisuudesta saadaan samanlaisia testattuja yhdisteitä tai seoksia koskevista tiedoista, kun otetaan huomioon, mitä toksikologisesti merkittävät ainesosat ovat ja mikä on niiden prosenttiosuus. Päätutkimus on suoritettava, kun testiaineen toksisuudesta on vain vähän tai ei lainkaan tietoa tai kun se todennäköisesti on toksinen.

Raja-annostesti voidaan tehdä yhdellä annostasolla 2 000 mg/kg käyttäen kuutta eläintä (kolme eläintä vaihetta kohden). Poikkeuksellisesti voidaan tehdä raja-annostesti yhdellä annostasolla 5 000 mg/kg käyttäen kolmea eläintä (katso liite 2). Mikäli testiaineeseen liittyvää kuolleisuutta esiintyy, voidaan tarvita lisäkokeita seuraavaksi alemmalla annostasolla.

1.6 HAVAINNOINTI

Eläimiä havainnoidaan yksittäin annostelun jälkeen vähintään yhden kerran ensimmäisten 30 minuutin aikana ja säännöllisin väliajoin ensimmäisten 24 tunnin aikana. Havainnoinnin on oltava erityisen tarkkaa ensimmäisten neljän tunnin aikana. Sen jälkeen havainnointi tapahtuu päivittäin 14 päivän ajan paitsi, jos eläin on poistettava tutkimuksesta ja lopetettava humaanilla tavalla eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi tai se löydetään kuolleena. Havainnoinnin kestoa ei pitäisi kuitenkaan määritellä tiukasti. Se tulee määrittää toksisten reaktioiden, niiden alkamishetken ja toipumisen keston perusteella ja sitä tulisi voida pidentää tarvittaessa. Toksisuusoireiden ilmaantumis- ja häviämisajankohdat ovat tärkeitä etenkin, jos toksisilla oireilla on taipumus viivästyä (12). Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti eläinkohtaisesti.

▼B

Lisähavainnointi on tarpeen jos eläinten toksisuusoireet jatkuvat. Havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljenerityksen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa (9) esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon. Kuolevat eläimet ja eläimet, jotka osoittavat merkkejä voimakkaasta kivusta ja jatkuvasta kovasta kärsimyksestä, tulee lopettaa humaanilla tavalla. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata mahdollisimman tarkasti.

1.6.1 **Ruumiinpaino**

Kunkin eläimen paino on määritettävä hieman ennen testiaineen annostelua ja vähintään viikoittain sen jälkeen. Painon muutokset on laskettava ja kirjattava. Kokeen päätyttyä henkiin jääneet eläimet punnitaan ja lopetetaan humaanilla tavalla.

1.6.2 **Patologia**

Kaikki koe-eläimet (myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi tutkimuksesta poistetut) on avattava. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata. Vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet voidaan myös tutkia mikroskooppisesti siitä mahdollisesti saatavan hyödyllisen tiedon vuoksi.

2. **TULOKSET**

Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tulokset. Kaikki tulokset tulee esittää myös yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 **Loppuraportti**

Loppuraportin tulee tarpeen mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (myös isomeroituminen),

— tunnistetiedot, CAS-numero mukaan lukien.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— perustelut kantaja-aineen valinnalle, mikäli se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji ja -kanta,

▼B

— eläinten mikrobiologinen status, mikäli se on tiedossa,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli (tarvittaessa myös perusteet urosten käytölle naaraiden sijasta),

— lähde, ylläpito-olosuhteet, ravinto jne.

Koeolosuhteet:

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta, mukaan luettuna annostellun aineen fysikaalinen muoto,

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen annostelusta, mukaan luettuina annostelutilavuudet ja -ajankohta,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan lukien eläinrehun tyyppi/lähde, veden lähde),

— alkuannoksen valintaperusteet.

Tulokset:

— kunkin eläimen vastetulosten ja annostason taulukot (toksisuusoireet, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste ja kesto),

— ruumiinpainon ja siinä tapahtuneiden muutosten taulukot,

— kunkin eläimen paino annostelupäivänä, sen jälkeen viikon välein sekä kuolin- tai lopettamishetkellä,

— kuolinpäivä ja -ajankohta, mikäli eläin kuolee ennen suunniteltua lopettamista,

— kunkin eläimen toksisuusoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen,

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla.

Tulosten tarkastelu ja tulkinta.

Johtopäätökset.

4. **VIITTEET**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute- Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559–610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729–734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129–134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Altemative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66, 455–470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute- Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659–670.

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

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

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

(11) Lipnick R. L, Cotruvo, J. A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I.; Goddard M., Segal L., Springer J. A. and Myers R. C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223–231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

LIITE 1

TESTIN SUORITUS ERI ALKUANNOKSILLA

YLEISIÄ HUOMAUTUKSIA

Tässä liitteessä selostetaan testin suoritus kullekin alkuannokselle.

— Liite 1 a: alkuannos 5 mg/kg

— Liite 1 b: alkuannos 50 mg/kg

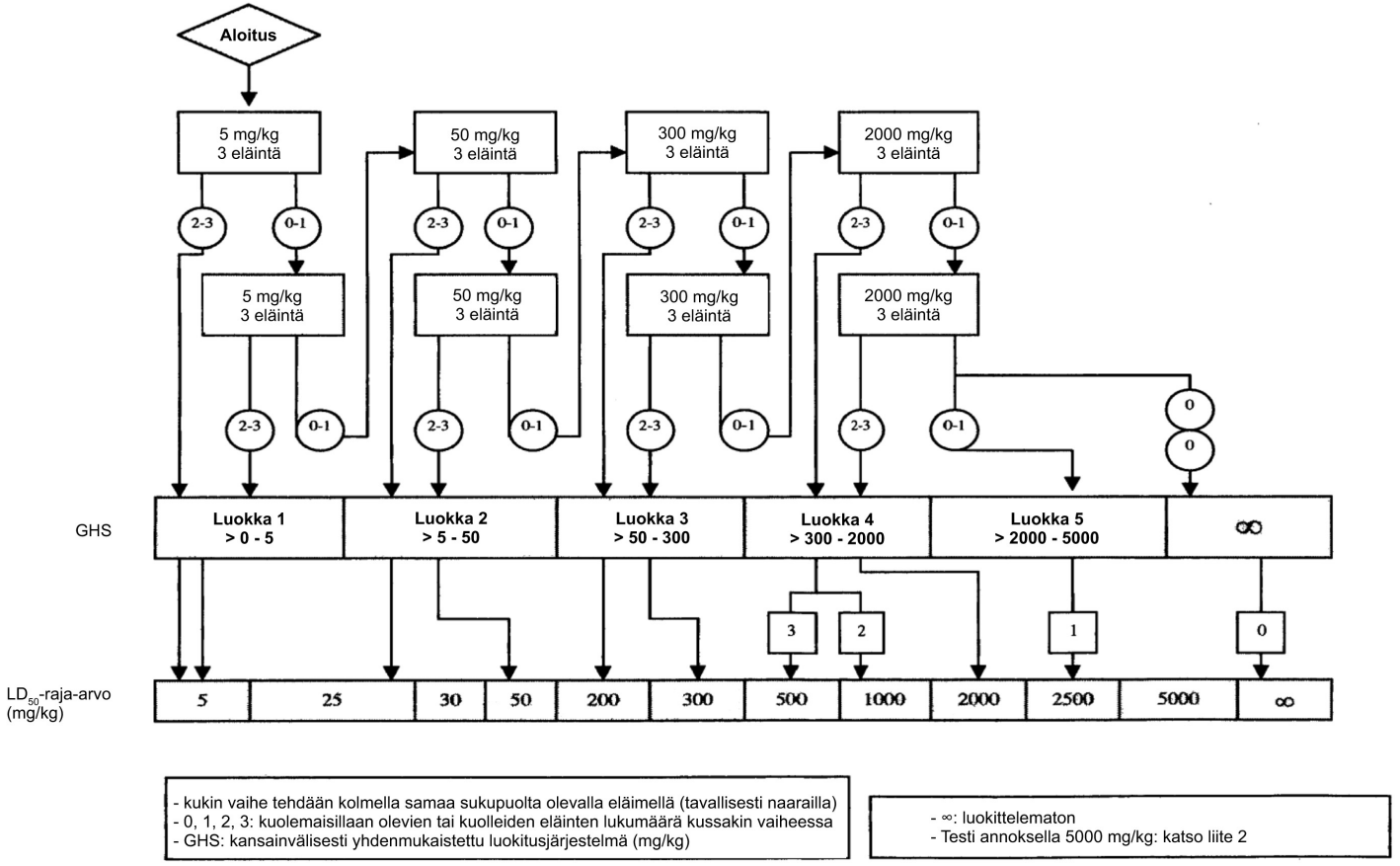
— Liite 1 c: alkuannos 300 mg/kg

— Liite 1 d: alkuannos 2 000 mg/kg

Humaanilla tavalla lopetettujen tai kuolleiden eläinten lukumäärästä riippuen koe etenee nuolten osoittamalla tavalla.

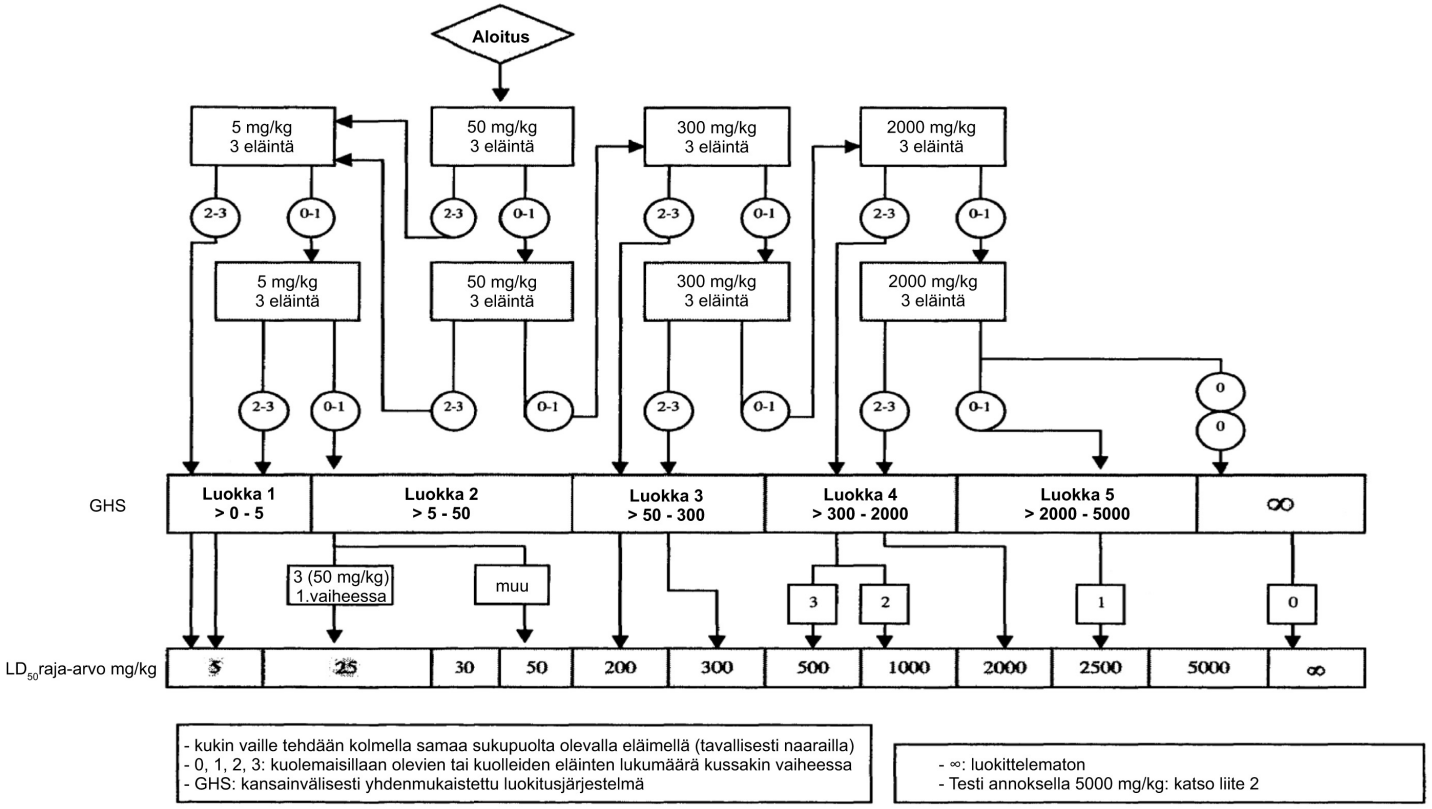
Liite 1 A

TESTIN SUORITUS ALKUANNOKSELLA 5 MG/KG



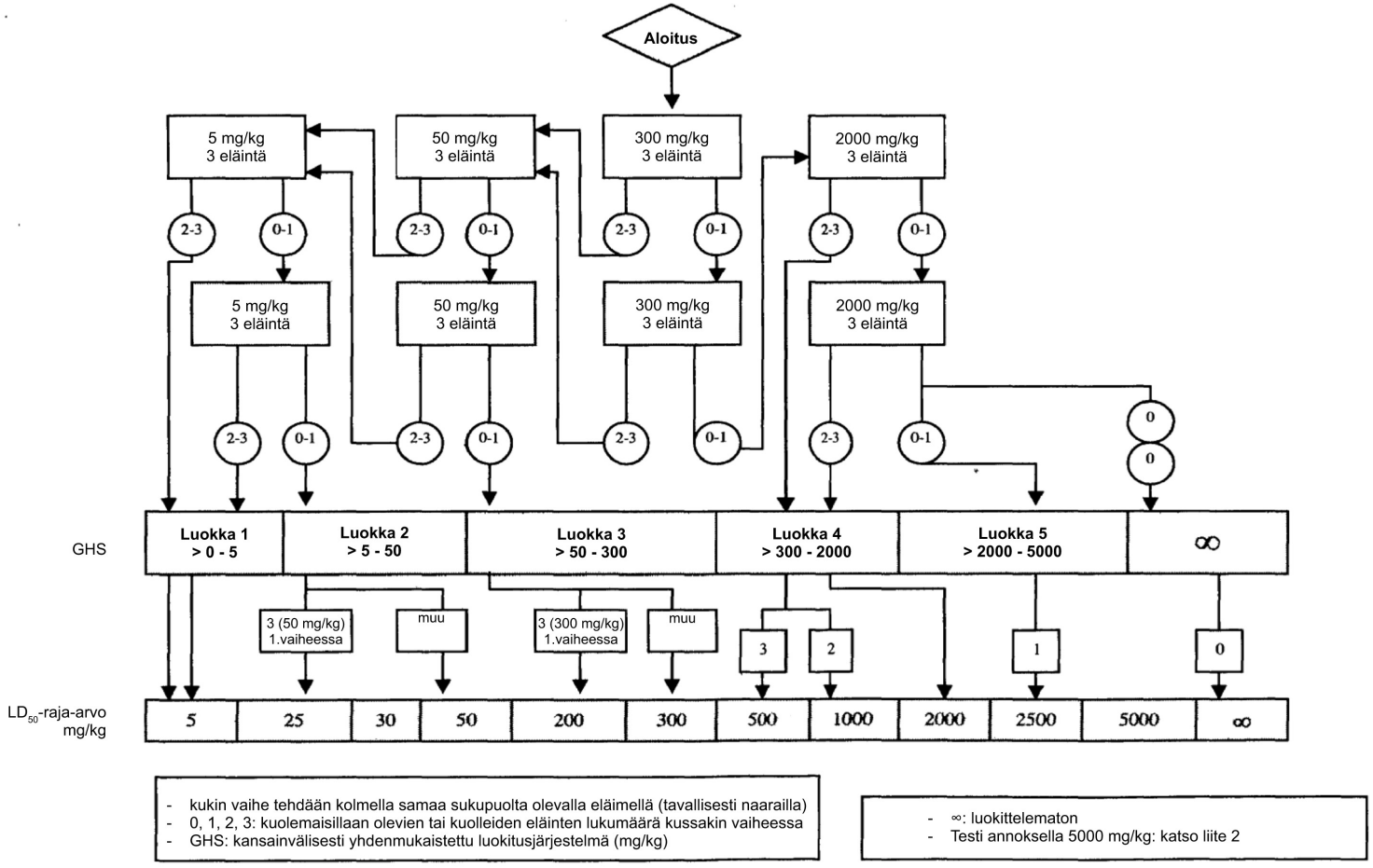
Liite 1 B

TESTIN SUORITUS ALKUANNOKSELLA 50 MG/KG



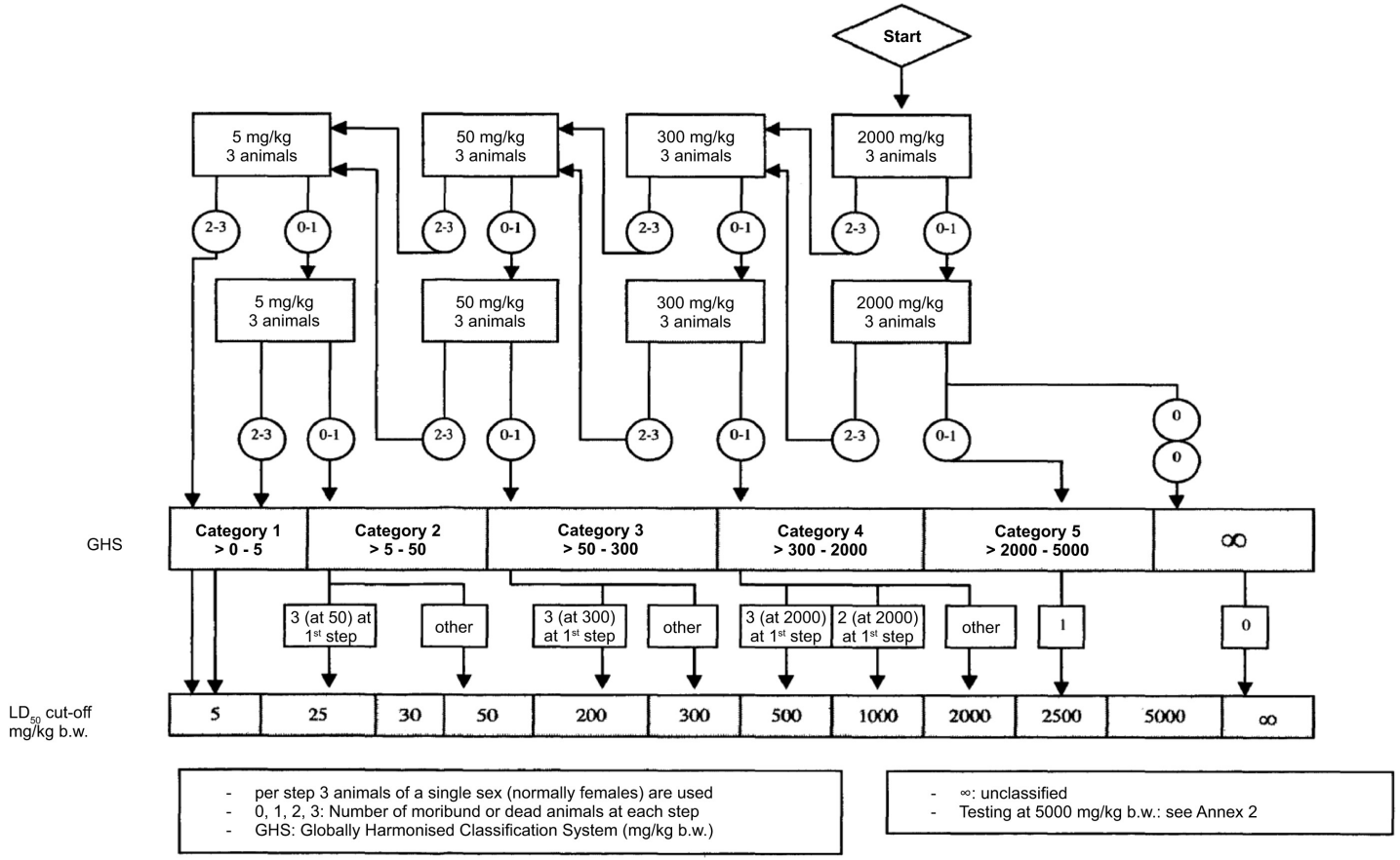
Liite 1 C

TESTIN SUORITUS ALKUANNOKSELLA 300 MG/KG



Liite 1 D

TESTIN SUORITUS ALKUANNOKSELLA 2 000 MG/KG



▼B

LIITE 2

PERUSTEET SELLAISTEN TESTIAINEIDEN LUOKITTELULLE, JOIDEN ODOTETTAVISSA OLEVA LD_{50}-ARVO YLITTÄÄ 2 000 MG/KG JA JOITA EI TARVITSE TESTATA

Vaarallisuusluokkaa 5 koskevien kriteereiden avulla on tarkoitus tunnistaa sellaiset testiaineet, joiden akuutti toksisuusvaara on suhteellisen alhainen, mutta jotka tietyissä olosuhteissa voivat olla vaaraksi herkimmille populaatioille. Näiden aineiden LD_{50}-arvon odotetaan vaihtelevan välillä 2 000–5 000 mg/kg ihon tai suun kautta annosteltuna tai vastaavina annoksina muuta kautta annettuna. Testiaineet on luokiteltava vaarallisuusluokkaan, jonka rajat ovat 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (luokka 5 GHS-järjestelmässä) seuraavissa tapauksissa:

a) mikäli aine määritellään missä tahansa liitteissä 1a-1d esitetyistä koejärjestelyistä tähän luokkaan kuuluvaksi kuolleisuuden esiintymisen perusteella;

b) mikäli on jo käytettävissä luotettavaa näyttöä, jonka mukaan LD_{50} on luokkaan 5 kuuluvien arvojen vaihteluvälin rajoissa tai mikäli muut eläinkokeet tai toksiset vaikutukset ihmisillä osoittavat, että aineella on välitöntä merkitystä ihmisten terveydelle;

c) tietoja ekstrapoloimalla, arvioimalla tai mittaamalla, jos määritteleminen korkeampaan vaarallisuusluokkaan ei ole aiheellista ja kun

   — käytettävissä on luotettavaa tietoa, joka osoittaa huomattavia toksisuusvaikutuksia ihmisillä, tai

   — kun havaitaan kuolleisuutta testattaessa suun kautta enintään luokkaa 4 vastaavia arvoja, tai kun

   — asiantuntija-arvio vahvistaa huomattavia kliinisiä toksisuusoireita testattaessa enintään luokkaa 4 vastaavia arvoja lukuun ottamatta ripulia, piloerektiota tai puhtauden laiminlyöntiä, tai kun

   — asiantuntija-arvio vahvistaa muista eläinkokeista saadut luotettavat tiedot, joiden mukaan huomattavat akuutit vaikutukset ovat mahdollisia.

TESTAAMINEN 2 000 MG/KG YLITTÄVILLÄ ANNOKSILLA

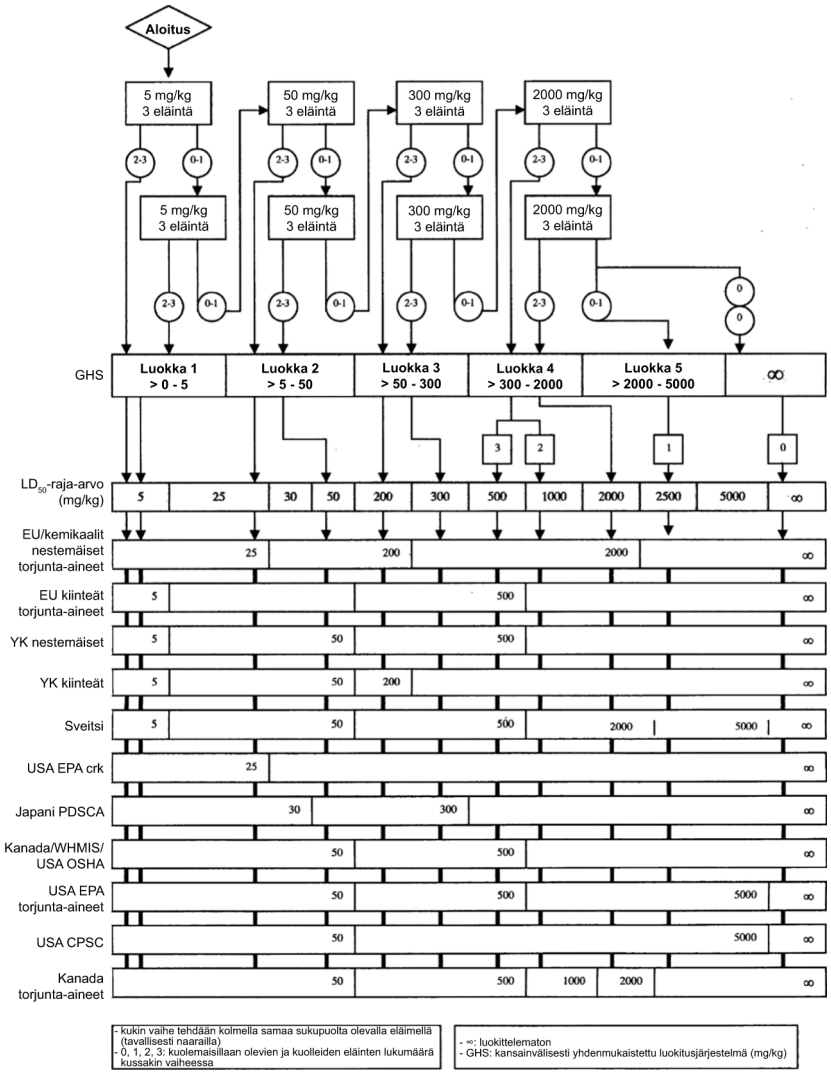
Koska eläinten hyvinvointia on suojeltava, testaaminen eläimillä luokan 5 (5 000 mg/kg) rajoissa ei ole suositeltavaa, ja sitä tulee käyttää vain kun on erittäin todennäköistä, että tällaisen kokeen tuloksilla on välitöntä merkitystä eläinten tai ihmisten terveyden suojelemiselle (10). Lisäkokeita korkeammilla annostasoilla ei pidä tehdä.

Kun kokeen tekeminen 5 000 mg:n/kg annoksella on välttämätöntä, tarvitaan vain yksi vaihe (eli kolme eläintä). Jos ensimmäinen annoksen saanut eläin kuolee, annostelua jatketaan 2 000 mg:n/kg annoksella liitteessä 1 esitettyjen toimenpidekaavioiden mukaisesti. Jos ensimmäinen eläin jää henkiin, kahdelle muulle eläimelle annetaan annos testiainetta. Jos vain yksi kolmesta eläimestä kuolee, LD_{50}-arvo ylittää todennäköisesti 5 000 mg/kg. Jos molemmat eläimet kuolevat, annostelua jatketaan 2 000 mg:lla/kg.

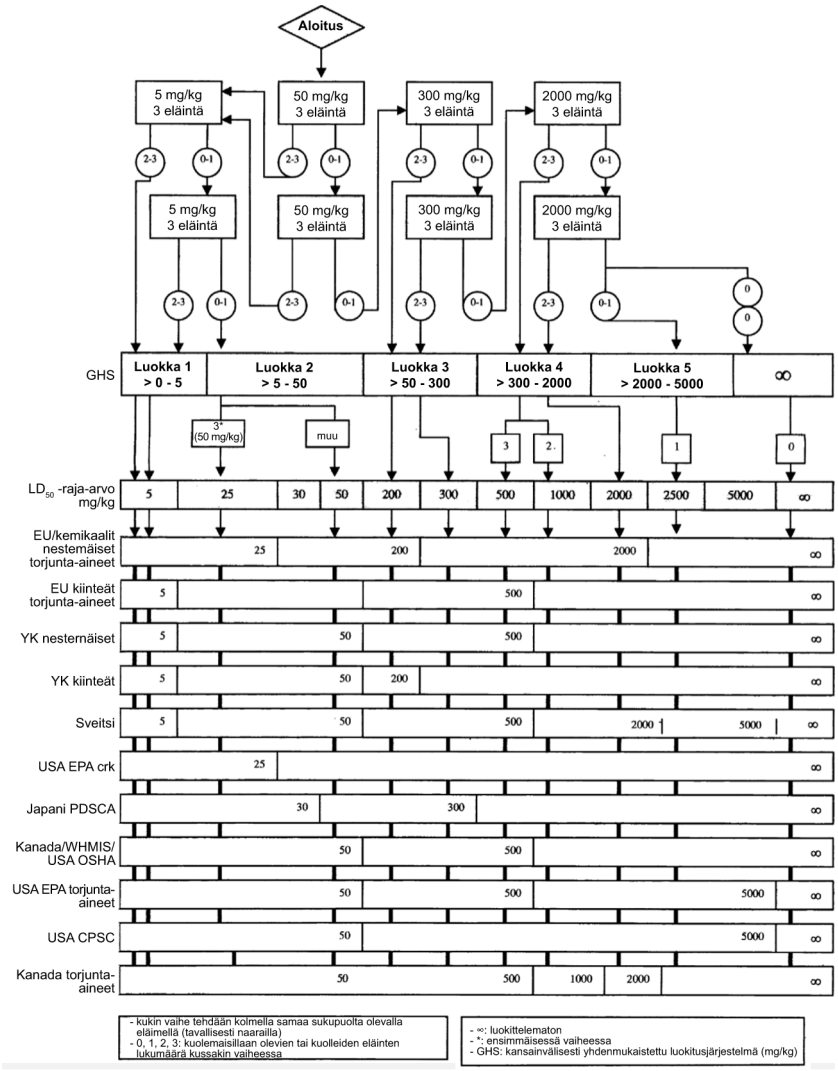
▼B

LIITE 3

KOEMENETELMÄ B.1 b: EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa



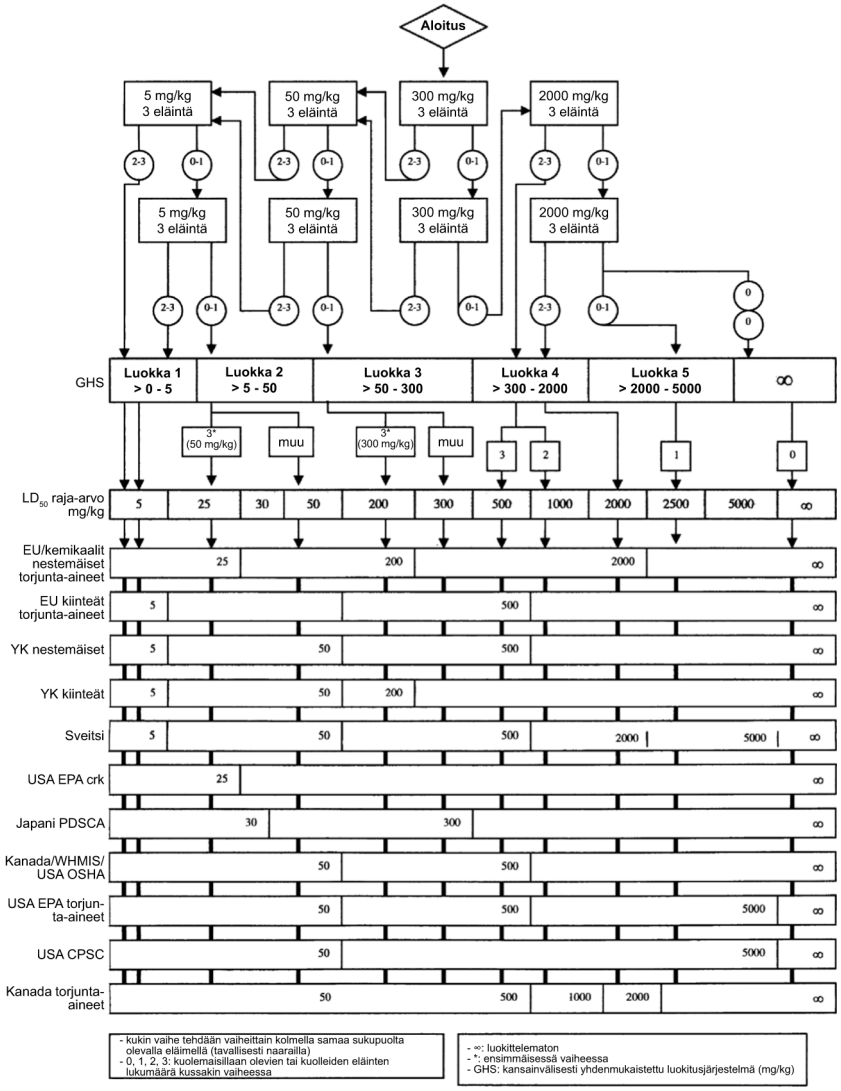
▼B



LIITE 3 (JATKOA 1)

KOEMENETELMÄ B.1 b: EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa

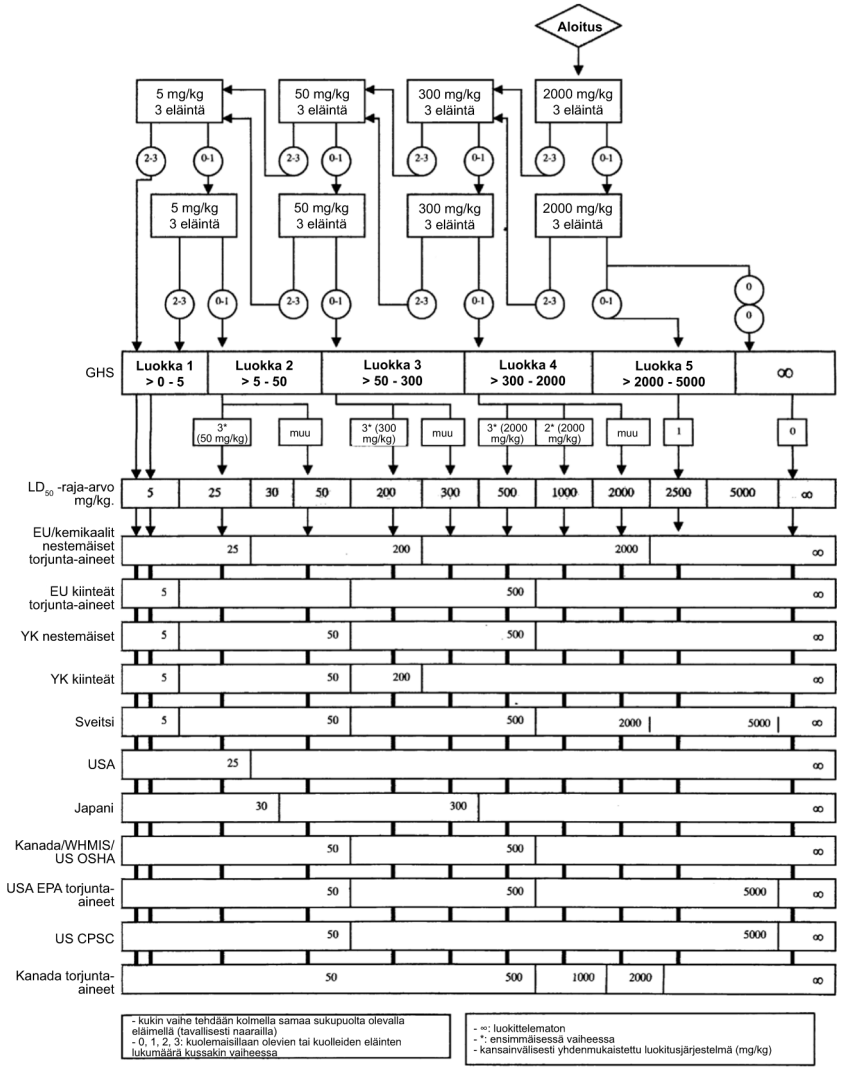
▼B



LIITE 3 (JATKOA 2)

KOEMENETELMÄ B.1 b: EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa

▼B



LIITE 3 (JATKOA 3)

KOEMENETELMÄ B.1 b: EU:n järjestelmän mukaiset luokitteluohjeet, joita käytetään siirtymäkaudella ennen kemikaalien kansainvälisesti yhdenmukaistetun järjestelmän (GHS) (viitteessä (8)) täysimääräistä täytäntöönpanoa

▼M4

B.2 AKUUTTI MYRKYLLISYYS (HENGITETTYNÄ)

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 403 (2009) (1). Alkuperäinen akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskeva testiohje nro 403 (TG 403) hyväksyttiin 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.2 (joka vastaa tarkistettua testiohjetta nro 403) tarkoituksena on lisätä joustavuutta, vähentää eläinten käyttöä ja täyttää sääntelyvaatimukset. Tarkistetussa testimenetelmässä on kaksi erityyppistä tutkimusta: perinteinen LC_{50}-protokolla ja pitoisuus × aika (C × t) -protokolla. Eräs tämän testimenetelmän tärkeimpiä ominaisuuksia on se, että sillä voidaan tuottaa pitoisuus-vaste-suhde, joka vaihtelee ei-tappavasta tappavaan. Sen perusteella voidaan johtaa mediaani tappava pitoisuus (LC_{50}), ei-tappavan pitoisuuden raja (esimerkiksi LC01) ja kulmakerroin. Lisäksi sen avulla voidaan tunnistaa mahdollinen sukupuoleen liittyvä herkkyys. C × t -protokollaa on käytettävä silloin, kun on sellainen erityinen sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve, jonka vuoksi eläimiä on testattava eripituisia aikoja. Tällaisia tarkoituksia ovat esimerkiksi hätäavun suunnittelu [esimerkiksi akuutin altistuksen ohjearvojen (AEGL-arvojen), hätäavun suunnitteluohjeiden (ERPG) tai akuuttien altistumisraja-arvojen (AETL-arvojen) johtamiseksi], tai maankäytön suunnittelu.

2. Tämän testimenetelmän mukaisten tutkimusten toteuttamista ja tulosten tulkintaa koskevat ohjeet ovat akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

3. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

4. Tämän testimenetelmän avulla voidaan toteuttaa testattavan kemikaalin luonnehdinta ja määrällinen riskinarviointi, ja testikemikaalit voidaan myös lajitella ja luokitella asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (3) mukaisesti. Ohjeasiakirja GD 39 (2) sisältää ohjeita akuuttia testausta varten tarvittavan asianmukaisen testimenetelmän valintaan. Kun tarvitaan vain luokitukseen ja merkintöihin liittyvää tietoa, on suositeltavaa lukea tämän liitteen (4) luku B.52 [katso GD 39 (2)]. Tätä testimenetelmää B.2 ei ole varsinaisesti tarkoitettu erikoismateriaalien, kuten huonosti liukenevien isometristen tai kuituisten materiaalien taikka teollisesti valmistettujen nanomateriaalien testaukseen.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Ennen tämän testimenetelmän mukaista testausta testauslaboratorion on hankittava kaikki saatavilla olevat tiedot testikemikaalista, mukaan luettuina olemassa olevat tutkimukset (esimerkiksi tämän liitteen luku B.52 (4)). Niistä saatavat tiedot mahdollisesti tukevat lisätestien tekemättä jättämistä, jotta eläinten käyttö voidaan minimoida. Tietoihin, joista voi olla apua sopivimman lajin, kannan, sukupuolen, altistustavan ja asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testikemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa olevat käytöt ja ihmisten altistumisen mahdollisuus sekä saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista [katso GD 39 (2)].

▼M4

6. Syövyttävien ja/tai ärsyttävien testikemikaalien testausta sellaisina pitoisuuksina, joiden oletetaan aiheuttavan kovia tuskia tai stressiä, on vältettävä, mikäli mahdollista. Mahdollista syövyttävää/ärsyttävää vaikutusta on arvioitava asiantuntija-arvioiden avulla, ja arvion on perustuttava ihmisistä ja eläimistä kertyneeseen kokemukseen (esimerkiksi ei-syövyttävillä/ärsyttävillä pitoisuuksilla tehdyt toistuvan annostelun tutkimukset), olemassa oleviin *in vitro* -tietoihin (esimerkiksi tämän liitteen luvut B.40 (5) ja B.40a (6) tai OECD:n ohje TG 435 (7)), pH-arvoihin, samankaltaisia aineita koskeviin tietoihin tai muihin asiaankuuluviin tietoihin, jotta voidaan selvittää, voidaanko lisätestit jättää tekemättä. Tiettyjä sääntelyvaatimuksia (esimerkiksi hätäavun suunnittelutarkoituksia) varten tätä testimenetelmää voidaan käyttää eläinten altistamiseen tällaisille materiaaleille, koska näin tutkimuksen johtajalla tai päätutkijalla on mahdollisuus valita tavoitepitoisuudet. Tavoiteltujen pitoisuuksien ei tule aiheuttaa vakavia ärsyttäviä tai syövyttäviä vaikutuksia, mutta niiden on kuitenkin oltava riittävät, jotta saavutetaan sellaisia pitoisuus-vastesuhteita, joilla voidaan täyttää testin sääntelyyn liittyvät ja tieteelliset tavoitteet. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja pitoisuuden valinnalle on esitettävä myös perustelut [katso GD 39 (2)].

TESTIN PERIAATE

7. Tämän testimenetelmän B.2 tarkoituksena on tuottaa tarpeeksi tietoa testikemikaalin akuutista myrkyllisyydestä, jotta se voidaan luokitella, sekä tietoa aineen tappavuudesta (esimerkiksi $LC_{50,}$ LC_{01} ja kulmakerroin) toisen tai kummankin sukupuolen kannalta sen mukaan, mikä on tarpeen määrällisissä riskinarvioinneissa. Tämä testimenetelmä koostuu kahdesta menetelmästä. Ensimmäinen menetelmä on perinteinen protokolla, jossa eläinryhmät altistetaan rajapitoisuudelle (rajatesti) tai pitoisuuksien sarjalle vaiheittaisessa menettelyssä, jonka kestoksi on yleensä määritetty neljä tuntia. Myös muunpituisia altistuksia voidaan soveltaa tiettyihin sääntelytarkoituksiin. Toinen menetelmä on C × t -protokolla, jossa eläinryhmät altistetaan yhdelle pitoisuudelle (rajapitoisuus) tai sarjalle useita pitoisuuksia eripituisiksi ajoiksi.

8. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa 19 (8) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

9. On käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Suositeltavin laji on rotta, ja jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

10. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Altistuspäivänä on käytettävä 8–12 viikon ikäisiä nuoria aikuisia eläimiä, joiden ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia aiemmin altistettujen samanikäisten eläinten keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Eläimet on totutettava myös testilaitteistoon vähän ennen testausta, sillä se vähentää uuteen ympäristöön tutustumisesta aiheutuvaa stressiä.

▼M4

Eläinten hoito

11. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

Inhalaatiokammiot

12. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistumistapa on vain nasaalisesti (tähän termiin kuuluvat myös altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti ja koko kehon kautta tapahtuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

13. Vain nasaalisesti -altistukset rotilla voivat kestää enintään kuusi tuntia. Jos hiiriä altistetaan vain nasaalisesti, altistusten kesto ei tavallisesti saa ylittää neljää tuntia. Jos tarvitaan pitempään kestäviä tutkimuksia, on esitettävä perustelut [katso GD 39 (2)]. Eläimille, joita altistetaan aerosoleille koko kehon kammioissa, on järjestettävä oma häkki sen estämiseksi, etteivät muut häkissä olevat eläimet niele testikemikaalia, kun ne nuolevat toistensa turkkia. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

14. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti.

▼M4

Hiukkaskokojakauma

15. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–4 μm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (2) (9) (10). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset, kuidut ja hygroskooppiset materiaalit (joiden koko kasvaa hengitystie-elimistön kosteassa ympäristössä) voivat olla vaatimusta suurempia.

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

16. Jotta ilmakehään saadaan testikemikaalista sopiva pitoisuus ja hiukkaskoko, voidaan käyttää kantaja-ainetta. Pääsääntöisesti on käytettävä vettä. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti vaaditun hiukkaskokojakauman saavuttamiseksi, mutta se on tehtävä varovasti, jotta testikemikaali ei hajoa tai muutu. Jos mekaanisen prosessin oletetaan muuttaneen testikemikaalin koostumusta (esimerkiksi kitkan vuoksi liiallisen jauhamisen aiheuttamat hyvin korkeat lämpötilat), testikemikaalin koostumus on varmennettava analyyttisesti. Riittäviä varotoimia on noudatettava, jotta testikemikaali ei kontaminoidu. Murenemattomia raemateriaaleja, jotka on tarkoituksella valmistettu sellaisiksi, ettei niitä voi hengittää, ei tarvitse testata. Hankauskoe on tehtävä sen osoittamiseksi, ettei raemaisen materiaalin käsittelyssä synny hengitettäviä hiukkasia. Jos hankauskoe tuottaa hengitettäviä aineita, on tehtävä hengityksen kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä koskeva testi.

Verrokkieläimet

17. Samanaikaista negatiivista (ilma-) verrokkiryhmää ei tarvita. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineverrokkiryhmää on käytettävä ainoastaan silloin, kun saatavilla ei ole aiempia tietoja sisäänhengityksen kautta aiheutuvasta myrkyllisyydestä. Jos kantaja-aineessa valmistellun testikemikaalin myrkyllisyystutkimus osoittaa, ettei kemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa, että kantaja-aine on myrkytön testattuna pitoisuutena, joten kantaja-aineverrokkia ei tarvita.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

18. Ilman virtausta kammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai stabiiliuden) seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia parametreja, joita tarvitaan ilmakehän tuottamiseen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisen altistuksen kammioissa niissä tapauksissa, kun altistusjärjestelmän läpi kulkeva ilmavirtaus ei riitä tuottamaan dynaamista testikemikaali-ilmakehän virtaa. On tiettyjä menetelmiä, joiden avulla voidaan osoittaa, ettei valituissa toimintaolosuhteissa tapahdu uudelleenhengittämistä (2) (11). Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava.

▼M4

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

19. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava vähintään kolmesti enintään neljä tuntia kestävien altistusten osalta ja tunneittain lyhyempien altistusten osalta. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

20. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

21. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit. Tutkimusraportissa on ilmoitettava tavoitepitoisuus, nimellinen pitoisuus ja todellinen pitoisuus, mutta tilastollisissa analyyseissa käytetään vain todellisia pitoisuuksia tappavien pitoisuuksien arvoja laskettaessa.

22. Jos mahdollista, on käytettävä yksi erä testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

23. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana, ja sitä on tarkkailtava jatkuvasti ja/tai ajoittain analyysimenetelmän mukaisesti. Jos näytteitä otetaan ajoittain, kammion ilmakehästä on otettava näytteitä vähintään kahdesti neljän tunnin tutkimuksen aikana. Jos se ei ole mahdollista vähäisen ilmanvirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, koko altistusjakson ajalta voidaan ottaa yksi näyte. Jos näytteiden välillä ilmenee suurta vaihtelua, seuraavia pitoisuuksia testattaessa on otettava neljä näytettä kutakin altistusta kohti. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa

▼M4

keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan, mikä otetaan huomioon t_{95}-ajan saavuttamiseen tarvittavissa ajoissa. Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

24. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin, joten jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai komponentin (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

25. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kahdesti jokaisen neljän tunnin mittaisen altistuksen aikana käyttämällä kaskadierotinta tai jotain toista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, kyseistä muuta laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa. Höyryjen osalta on määritettävä hiukkaskoko, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyrykammiossa, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia (katso 15 kohta).

MENETTELY

26. Jäljempänä kuvataan kahdentyyppisiä tutkimuksia: perinteistä protokollaa ja C × t -protokollaa. Molemmat protokollat voivat sisältää esikokeen, päätutkimuksen ja/tai raja-annostestin (perinteinen protokolla) tai testauksen rajapitoisuudella (C × t). Jos yhden sukupuolen tiedetään olevan herkempi, tutkimuksen johtaja voi päättää suorittaa nämä tutkimukset käyttäen vain herkkää sukupuolta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Ennen tutkimuksen aloittamista on otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot, jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Esimerkiksi tiedot, jotka on saatu hyödyntämällä tämän liitteen lukua B.52 (4), saattavat poistaa tarpeen toteuttaa esikoe, ja ne voivat myös osoittaa, onko jompikumpi sukupuoli toista herkempi [katso GD 39 (2)].

▼M4

PERINTEINEN PROTOKOLLA

Yleisiä huomioita: perinteinen protokolla

27. Perinteisessä tutkimuksessa ryhmä eläimiä altistetaan testikemikaalille tietyksi ajaksi (yleensä neljäksi tunniksi) joko nasaalisen altistuksen tai koko kehoon kohdistuvan altistuksen kammiossa. Eläimet altistetaan joko rajapitoisuudelle (rajatesti) tai vähintään kolmelle pitoisuudelle vaiheittaisessa menettelyssä (päätutkimus). Päätutkimusta voi edeltää esikoe, ellei testikemikaalista ole jo jonkin verran tietoa saatavilla, esimerkiksi aiemmin tehty luvun B.52 mukainen tutkimus [katso GD 39 (2)].

Esikoe: perinteinen protokolla

28. Esikoetta käytetään testikemikaalin vaikutuskyvyn arvioimisessa, sukupuolten välisten herkkyyserojen tunnistamisessa ja helpottamaan altistuksen pitoisuustasojen valintaa päätutkimukseen tai rajatestiin. Kun valitaan esikokeen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös (Q)SAR-tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja. Kullekin pitoisuudelle saa altistaa enintään kolme urosta ja kolme naarasta (kolme eläintä / sukupuoli voi olla tarpeen sukupuolten välisen eron määrittämiseksi). Esikoe voi koostua yhdestä pitoisuudesta, mutta myös useampia pitoisuuksia voidaan testata, mikäli tarpeen. Esikokeessa ei tule kuitenkaan testata niin montaa eläintä ja pitoisuutta, että se alkaa muistuttaa päätutkimusta. Esikokeen sijasta voidaan käyttää aiemmin toteutettua luvun B.52 mukaista tutkimusta (4) [katso GD 39 (2)].

Rajatesti: perinteinen protokolla

29. Rajatestiä käytetään silloin, kun testikemikaalin tiedetään tai oletetaan olevan periaatteessa myrkytön eli aiheuttavan toksisen vasteen vain lakisääteistä rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla. Rajatestissä altistetaan yksi ryhmä, jossa on kolme urosta ja kolme naarasta, rajapitoisuuden vahvuiselle testikemikaalille. Tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä voidaan hankkia samanlaisia testattuja kemikaaleja koskevista tiedoista, jolloin on otettava huomioon niiden komponenttien identiteetti ja prosenttiosuus, joilla tiedetään olevan toksikologista merkitystä. Tilanteissa, joissa tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tai sitä ei ole lainkaan tai jos testikemikaalin oletetaan olevan myrkyllinen, on toteutettava päätutkimus.

30. Rajapitoisuudet valitaan yleensä sääntelyvaatimusten perusteella. Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (tai suurin mahdollinen pitoisuus) (3). Rajapitoisuuksien määrittäminen tietyille testikemikaaleille, etenkin höyryille ja aerosoleille, voi olla teknisesti haasteellista. Aerosolien testauksessa ensisijaisena tavoitteena tulee olla hengitettävän hiukkaskoon (MMAD 1–4 μm) saavuttaminen. Useimpien kemikaalien osalta tämä on mahdollista, kun niiden pitoisuus on 2 mg/l. Aerosolien testaamista suurempina pitoisuuksina kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos hengitettävä hiukkaskoko voidaan saavuttaa [katso GD 39 (2)]. Asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi (3). Rajapitoisuutta on harkittava vain, jos on erittäin todennäköistä, että sellaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden (3) suojelemisessa, ja tutkimusraportissa on esitettävä asiaa koskevat perustelut. Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen rajatestiä on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että rajatestin edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

▼M4

31. Jos rajapitoisuudella havaitaan kuolleisuutta tai kuoleman lähestymistä, rajatestin tuloksia voidaan käyttää muiden, eri pitoisuuksilla tehtävien testien esikokeena (katso päätutkimus). Jos rajapitoisuuden tuottaminen ei ole mahdollista testikemikaalin fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien vuoksi, on testattava suurin mahdollinen pitoisuus. Jos kuolleisuus on alle 50 prosenttia suurimmalla mahdollisella pitoisuudella, lisätestaus ei ole tarpeen. Jos rajapitoisuutta ei voitu tuottaa, tutkimusraportissa on esitettävä sitä koskeva selvitys ja sitä tukevia tietoja. Jos höyryn suurin mahdollinen pitoisuus ei aiheuta myrkyllisyyttä, testikemikaalista voi olla tarpeen tuottaa nestemäinen aerosoli.

Päätutkimus: perinteinen protokolla

32. Päätutkimuksessa käytetään yleensä viittä urosta ja viittä naarasta (tai viittä herkän sukupuolen yksilöä, jos herkkyys tiedetään) pitoisuustasoa kohti. Pitoisuustasoja on oltava vähintään kolme. On käytettävä riittävän suuria pitoisuuksia, jotta voidaan laatia luotettava tilastollinen analyysi. Altistusryhmien välinen aika määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Eläinten altistusta seuraavalla pitoisuudella on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Näin tutkimuksen johtaja voi mukauttaa seuraavan altistusryhmän tavoitepitoisuutta. Kehittyneiden tekniikoiden vuoksi tämä ei ole välttämättä käytännöllistä inhalaatiotutkimuksissa, joten eläinten altistamisen seuraavalla pitoisuustasolla on perustuttava aiempaan kokemukseen ja tieteelliseen arvioon. Seosten testaamisesta saa tietoa ohjeasiakirjasta GD 39 (2).

PITOISUUS × AIKA (C × T) -PROTOKOLLA

Yleisiä huomioita: C × t -protokolla

33. Vaiheittaista C × t -tutkimusta voidaan harkita vaihtoehdoksi perinteiselle protokollalle, kun arvioidaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä (12) (13) 14). Tämän lähestymistavan avulla eläimet voidaan altistaa testikemikaalille useilla pitoisuustasoilla ja eripituisiksi ajoiksi. Kaikki testit tehdään vain nasaaliseen altistukseen tarkoitetussa kammiossa (koko kehoon kohdistuvaan altistukseen tarkoitetut kammiot eivät ole käytännöllisiä tässä protokollassa). Tämä protokolla on kuvattu lisäyksessä 1 olevassa vuokaaviossa. Simulaatioanalyysi on osoittanut, että sekä perinteisellä protokollalla että C × t -protokollalla voidaan tuottaa luotettavia LC_{50}-arvoja, mutta että C × t -protokolla on yleisesti parempi luotettavien LC_{01}- ja LC_{10}-arvojen tuottamisessa (15).

34. Lisäksi simulaatioanalyysi on osoittanut, että kahden eläimen käyttäminen yhtä C × t -aikaväliä kohti (yksi kumpaakin sukupuolta, jos käytetään molempia sukupuolia, tai kaksi herkemmän sukupuolen edustajaa) saattaa olla riittävä, kun päätutkimuksessa testataan neljä pitoisuutta ja viisi altistuksen kestoa. Tietyissä olosuhteissa tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää kahta rottaa kummastakin sukupuolesta yhtä C × t -aikaväliä kohti (15). Kahden eläimen käyttäminen kumpaakin sukupuolta kohti voi vähentää vinoumia ja estimaattien vaihtelevuutta, lisätä arvioinnin onnistumista ja parantaa luottamusvälin kattavuutta. Jos tiedot eivät kuitenkaan riitä arviointiin (kun käytetään yhtä eläintä sukupuolta kohti tai kahta herkemmän sukupuolen eläintä), viides altistuspitoisuus voi olla myös tarpeen. Lisätietoja eläinten määrästä ja käytettävistä pitoisuuksista C × t -tutkimuksessa on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

▼M4

Esikoe: C × t -protokolla

35. Esikokeella arvioidaan testikemikaalin vaikutuskykyä ja helpotetaan altistuksen pitoisuustasojen valintaa päätutkimusta varten. Jotta voidaan valita asianmukainen aloituspitoisuus päätutkimukseen ja minimoida käytettävien eläinten määrä, saatetaan tarvita esikoe, jossa käytetään enintään kolmea eläintä sukupuolta ja pitoisuutta kohti [katso tarkemmat tiedot ohjeasiakirjan GD 39 lisäyksestä III (2)]. Sukupuolten välisen eron määrittämiseksi voi olla tarpeen käyttää kolmea eläintä sukupuolta kohti. Nämä eläimet on altistettava yhden kerran, yleensä 240 minuutin ajaksi. Riittävien testi-ilmakehien tuottamisen mahdollisuus on arvioitava teknisissä esitesteissä ilman eläimiä. Yleensä esikoetta ei tarvita, jos kuolleisuustiedot ovat saatavilla luvun B.52 mukaisesta tutkimuksesta (4). Kun B.2-tutkimukseen valitaan alustavaa tavoitepitoisuutta, tutkimuksen johtajan on otettava huomioon saatavilla olevissa B.52-tutkimuksissa (4) havaitut kuolleisuusmallit kummankin sukupuolen ja kaikkien testattujen pitoisuuksien osalta [katso GD 39 (2)].

Alkupitoisuus: C × t -protokolla

36. Alkupitoisuus (altistuskerta I) (lisäys 1) on joko rajapitoisuus tai pitoisuus, jonka tutkimuksen johtaja on valinnut esikokeen perusteella. Ryhmät, joissa on yksi eläin sukupuolta kohti, altistetaan tälle pitoisuudelle eripituisiksi ajoiksi (esimerkiksi 15, 30, 60, 120 tai 240 minuuttia), jolloin eläinten kokonaismäärä on 10 (tätä ryhmää kutsutaan nimellä altistuskerta I) (lisäys 1).

37. Rajapitoisuudet valitaan yleensä sääntelyvaatimusten perusteella. Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (tai suurin mahdollinen pitoisuus) (3). Rajapitoisuuksien määrittäminen tietyille testikemikaaleille, etenkin höyryille ja aerosoleille, voi olla teknisesti haasteellista. Aerosoleja testattaessa tavoitteena on oltava kooltaan hengitettävä hiukkanen (esimerkiksi 1–4 μm:n MMAD) rajapitoisuudella 2 mg/l. Tämä on mahdollista useimpien kemikaalien osalta. Aerosolien testaamista suuremmalla pitoisuudella kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos on mahdollista saavuttaa kooltaan hengitettävä hiukkanen [katso ohjeasiakirja GD 39 (2)]. Asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi (3). Rajapitoisuuden ylittävää testausta on harkittava vain, jos on erittäin todennäköistä, että sellaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden (3) suojelemisessa, ja tutkimusraportissa on esitettävä perustelut. Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen alkupitoisuudella testausta on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että tämän pitoisuuden edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

38. Jos alkupitoisuuteen havaitaan liittyvän kuolleisuutta tai kuoleman lähestymistä, tällä pitoisuudella saatuja tuloksia voidaan käyttää muiden, eri pitoisuuksilla tehtävien testien lähtökohtana (katso päätutkimus). Jos rajapitoisuuden tuottaminen ei ole mahdollista testikemikaalin fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien vuoksi, on testattava suurin mahdollinen pitoisuus. Jos kuolleisuus on alle 50 prosenttia suurimmalla mahdollisella pitoisuudella, lisätestaus ei ole tarpeen. Jos rajapitoisuutta ei voitu tuottaa, tutkimusraportissa on esitettävä sitä koskeva selvitys ja sitä tukevia tietoja. Jos höyryn suurin mahdollinen pitoisuus ei aiheuta myrkyllisyyttä, testikemikaalista voi olla tarpeen tuottaa nestemäinen aerosoli.

▼M4

Päätutkimus: C × t -protokolla

39. Päätutkimuksessa testattu alkupitoisuus (altistuskerta I) (lisäys 1) on joko rajapitoisuus tai pitoisuus, jonka tutkimuksen johtaja on valinnut esikokeen perusteella. Jos altistuskerran I aikana tai sen jälkeen on havaittu kuolleisuutta, vähimmäisaltistus (C × t), josta seuraa kuolema, ohjaa altistuskerran II pitoisuuden ja altistusjaksojen määrittämistä. Edellinen altistuskerta vaikuttaa jokaiseen seuraavaan altistuskertaan (katso lisäys 1).

40. Monien testikemikaalien osalta alkupitoisuudella saadut tulokset sekä kolme muuta altistuskertaa, jotka on toteutettu pienemmällä aikavälillä (esimerkiksi altistusjaksojen jaottelu geometrisesti peräkkäisten jaksojen välisen kertoimen mukaisesti, yleensä √2) riittävät C × t -kuolleisuussuhteen (15) määrittämiseen, mutta viidennen altistuspitoisuuden käyttämisestä voi olla jonkin verran hyötyä [katso lisäys 1 ja GD 39 (2)]. Lisätietoja C × t -protokollalla saatujen tulosten matemaattisesta käsittelystä on lisäyksessä 1.

HAVAINNOT

41. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti altistumisjakson aikana. Altistuksen jälkeen kliinisiä havaintoja on tehtävä vähintään kahdesti altistuspäivän aikana tai useammin, jos eläinten vaste käsittelyyn antaa siihen aihetta, ja vähintään kerran päivässä sen jälkeen yhteensä 14 päivän ajan. Havaintojakson pituus ei ole kiinteä, vaan se on määritettävä kliinisten merkkien luonteen ja alkamisajankohdan sekä toipumisajan pituuden perusteella. Ne ajankohdat, jolloin myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat ja häviävät, ovat tärkeitä varsinkin, jos myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat viipeellä. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti jokaisesta eläimestä erikseen. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet ja/tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti eläinten hyvinvointiin liittyvien periaatteiden vuoksi. Kun tutkitaan myrkyllisyyden kliinisiä merkkejä, on kiinnitettävä huomiota siihen, ettei altistusmenettelystä johtuvaa huonoa ulkonäköä ja ohimeneviä muutoksia hengityksessä pidetä erehdyksessä merkkeinä kemikaaliin liittyvästä myrkyllisyydestä, jolloin eläimet pitäisi lopettaa ennenaikaisesti. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa (GD 19) esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon (7). Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

42. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Mikäli mahdollista, paikallisten ja systeemisten vaikutusten väliset erot on merkittävä muistiin. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljenerityksen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa vahvistavaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta.

Ruumiinpainot

43. Kunkin eläimen paino on kirjattava kerran sopeutumisvaiheen aikana, altistuspäivänä ennen altistusta (päivä 0) ja vähintään päivinä 1, 3 ja 7 (ja myöhemmin viikoittain) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä, jos se tapahtuu päivän 1 jälkeen. Ruumiinpaino on tunnetusti erittäin tärkeä myrkyllisyyden indikaattori, joten eläimiä, joiden paino on jatkuvasti vähintään 20 prosenttia pienempi kuin ennen tutkimusta mitatut arvot, on seurattava tarkasti. Elossa olevat eläimet punnitaan ja lopetetaan humaanisti altistumisen jälkeisen jakson lopussa.

▼M4

Patologia

44. Kaikki koe-eläimet, myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetut ja tutkimuksesta poistetut, avataan. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

45. Myös tutkimussuunnitelmaan ennalta sisällytettyjen lisätutkimusten käyttöä voidaan harkita tutkimuksen tulkinnallisen arvon lisäämiseksi. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi eloonjääneiden rottien keuhkojen painon punnitseminen ja/tai todisteiden hankkiminen ärsyttävyydestä hengitysteiden mikroskooppitutkimuksella. Tutkittaviin elimiin voi sisältyä myös vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet ja elimet, joissa tiedetään tai oletetaan olevan kemikaalin aiheuttamia vaikutuksia. Koko hengityselimistön mikroskooppitutkimus voi antaa hyödyllistä tietoa veden kanssa reagoivista testikemikaaleista, kuten hapoista ja hygroskooppisista testikemikaaleista.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

46. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot ruumiinpainoista ja ruumiinavaustuloksista on esitettävä. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin testiryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, myrkyllisyyden oireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, myrkyllisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

Testiraportti

47. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— tiedot ruoan ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

▼**M4**

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— kuvaus inhalaatiokammiosta sekä sen mitat ja tilavuus

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilmanlähde, tulo- ja poistoilman käsittely sekä ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti järjestelmässä (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän ajallinen yhtenäisyys/stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— tiedot hapen ja hiilidioksidin mittauslaitteistosta, jos tarpeen

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuuden muutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

▼M4

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, etc.), tilavuusyksiköt (esimerkiksi ppm, ppb jne.) voidaan ilmoittaa sulkeissa

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä Jos mekaaniset prosessit ovat voineet muuttaa kemiallista koostumusta, on ilmoitettava analyysien tulokset testikemikaalin koostumuksen vahvistamiseksi.

— kuvaus (mieluiten kaavio) testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— vastetiedot ja pitoisuustaso jokaisesta eläimestä (ts. eläimet, jotka osoittivat merkkejä myrkyllisyydestä, ja tiedot kuolleisuudesta sekä vaikutusten luonteesta, vaikeusasteesta, alkamisajankohdasta ja kestosta) (taulukkomuodossa)

— tutkimuksen aikana kerätyt tiedot yksittäisten eläinten ruumiinpainoista, kuolinpäivä ja -aika, jos se tapahtui ennen suunniteltua lopetusta, kunkin eläimen toksisuusoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— kuolleisuusestimaatit (esimerkiksi LC_{50}, LD_{01}) sekä 95 prosentin luottamusrajat ja kulmakerroin (jos se on voitu laskea arviointimenetelmällä)

— tilastollinen suhde ja eksponentin n estimaatti (C × t -protokolla) käytetyn tilasto-ohjelman nimi.

▼M4

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (esimerkiksi rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (8) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Jos tämän liitteen luvun B.52 (4) mukainen testaus keskeytettiin tämän testimenetelmän (B.2) puoltamiseksi, sille on esitettävä perustelut.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittelemiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

4) Tämän liitteen luku B.52: Akuutti myrkyllisyys hengitettynä – akuutin toksisuuden luokittelua koskeva menetelmä (ATC-menetelmä)

5) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

6) Tämän liitteen luku B.40 a *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihmisihomallitesti.

7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.

10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278–290,

13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105–117.

14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65–71.

15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 1

C × t -protokolla

1. Vaiheittaista pitoisuus × aika (C × t) -tutkimusta voidaan harkita vaihtoehdoksi perinteiselle protokollalle, kun arvioidaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä (12) (13) 14). Sitä on käytettävä ensisijaisesti silloin, kun on erityinen sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve, jonka vuoksi eläimiä on testattava eripituisia aikoja, esimerkiksi hätäavun tai maankäytön suunnitteluun liittyviä tarkoituksia varten. Tämä lähestymistapa alkaa yleensä rajapitoisuudella testaamisella (altistuskerta I), jolloin eläimet altistetaan testikemikaalille viideksi eripituiseksi ajaksi (esimerkiksi 15, 30, 60, 120 ja 240 minuutiksi). Toisin sanoen yhdellä altistuskerralla saadaan tietoa eripituisista altistusajoista (katso kuva 1). Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Nämä rajat saa ylittää vain, jos on sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve testata näitä suuremmilla pitoisuuksilla (katso 37 kohta luvun B.2 päätekstissä).

2. Jos testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tietoa tai jos sitä ei ole lainkaan, on toteutettava esikoe, jossa enintään kolme eläintä sukupuolta kohti altistetaan tutkimuksen johtajan valitsemille tavoitepitoisuuksille yleensä 240 minuutin ajaksi.

3. Jos altistuskerralla I testataan rajapitoisuutta ja jos siinä yhteydessä havaitaan alle 50 prosentin kuolleisuus, lisätestit eivät ole tarpeen. Jos on sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve määrittää pitoisuus-/aika-/vastesuhde saatua rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla, seuraava altistus on tehtävä suuremmalla pitoisuudella, joka on kaksi kertaa rajapitoisuus (ts. 2L kuvassa 1).

4. Jos rajapitoisuuden yhteydessä havaitaan myrkyllisyyttä, lisätestaus (päätutkimus) on tarpeen. Nämä lisäaltistukset toteutetaan joko pienemmillä pitoisuuksilla (kuvassa 1: altistuskerrat II, III tai IV') tai suuremmilla pitoisuuksilla käyttäen lyhyempiä altistusaikoja (kuvassa 1: altistuskerta IV) siten, että aikoja mukautetaan tai että niiden välinen aika on lyhyempi.

5. Testi (alkupitoisuus ja muut pitoisuudet) toteutetaan käyttämällä yhtä eläintä sukupuolta kohti kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti tai kahta herkemmän sukupuolen eläintä kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti. Tietyissä olosuhteissa tutkimuksen johtaja voi valita käyttää kahta rottaa sukupuolta kohti kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti (tai neljää herkemmän sukupuolen eläintä kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti) (15). Kahden eläimen käyttäminen kumpaakin sukupuolta kohti yleensä vähentää vinoumia ja estimaattien vaihtelevuutta, lisää arvioinnin onnistumista ja parantaa tässä kuvattuun protokollaan liittyvän luottamusvälin kattavuutta. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

6. Kukin altistuskerta toteutetaan mielellään yhtenä päivänä. Tämän ansiosta seuraavaa altistusta voidaan lykätä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä, ja tutkimuksen johtaja voi myös muuttaa seuraavan altistuskerran tavoitepitoisuutta ja altistuksen kestoa. Kukin altistuskerta on suositeltavaa aloittaa sillä ryhmällä, joka altistuu pisimpään, eli ensin 240 minuutin altistusryhmä, seuraavaksi 120 minuutin altistusryhmä ja niin edelleen. Jos esimerkiksi 240 minuutin ryhmän eläimet kuolevat 90 minuutin kuluttua tai osoittavat vakavia merkkejä myrkyllisyydestä (esimerkiksi suuria muutoksia hengityksessä, kuten vaivalloista hengittämistä), ei ole mielekästä altistaa ryhmää 120 minuutin ajaksi, koska kuolleisuus olisi todennäköisesti 100 prosenttia. Tällöin tutkimuksen johtajan on valittava kyseiselle pitoisuudelle lyhyempikestoiset altistukset (esimerkiksi 90, 65, 45, 33 ja 25 minuuttia).

▼M4

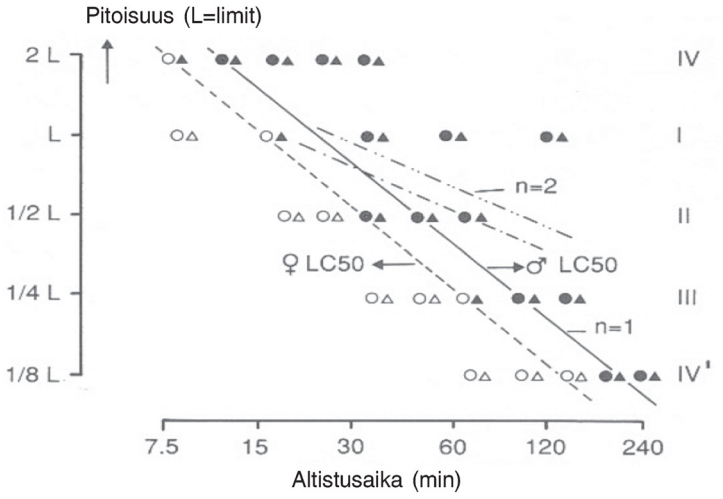
7. Kammion pitoisuudet on mitattava säännöllisesti, jotta kunkinpituisen altistuksen aikapainotettu keskimääräinen pitoisuus voidaan määrittää. Aina kun mahdollista, tilastollisessa analyysissa on käytettävä kunkin eläimen kuolinaikaa (pikemmin kuin altistuksen kestoa).

8. Neljän ensimmäisen altistuskerran tulokset on analysoitava, jotta voidaan tunnistaa pitoisuus-aikakäyrästä puuttuvat tiedot (katso kuva 1). Jos käyrä ei kuvaa tietoja riittävästi, voidaan toteuttaa ylimääräinen altistus (viides pitoisuus). Viidennen altistuksen pitoisuus ja kesto on valittava siten, että puuttuvat tiedot voidaan tuottaa.

9. Kaikkia altistuskertoja (myös ensimmäistä altistuskertaa) käytetään laskettaessa pitoisuus-aika-vaste-suhdetta tilastollista analyysia hyödyntäen (16). Mikäli mahdollista, kutakin C × t -väliä kohti on käytettävä aikapainotettua keskimääräistä pitoisuutta ja altistuksen kestoa kuolemaan saakka (jos eläin kuolee altistuksen aikana).

Kuva 1

Hypoteettinen kuvaus pitoisuus-aika-kuolleisuussuhteesta rotilla.



Vaaleat symbolit = eloonjääneet, mustat symbolit = kuolleet eläimet

Kolmio = naaras, neliö = uros

Yhtenäinen viiva = LC_{50}-arvot (vaihteluväli 7,5–240 min), urokset, n = 1

Katkoviiva = LC_{50}-arvot (vaihteluväli 7,5–240 min), naaraat, n = 1

Pisteviivat = hypoteettiset LC_{50}-arvot uroksille ja naaraille, jos n olisi ollut 2 (12).

Sanasto

Pitoisuus:

Altistusaika:

▼M4

10. Jäljempänä on esimerkki vaiheittaisesta menettelystä:

Altistuskerta I – Testaus rajapitoisuudella (katso kuva 1)

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä ([a])

— Tavoitepitoisuus ([b]) = rajapitoisuus.

— Altista viisi eläinryhmää tälle tavoitepitoisuudelle 15, 30, 60, 120 ja 240 minuutin ajaksi.

↓

Altistuskerta II ([c]) – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle ([d]) (1/2 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

↓

Altistuskerta III – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle ([d]) (1/4 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

↓

Altistuskerta IV' – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle ([d]) (1/8 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

tai

([a]) Jos tietoja sukupuolikohtaisesta herkkyydestä ei ole, käytetään sekä uros- että naarasrottia, ts. yksi eläin kumpaakin sukupuolta pitoisuutta kohti. Olemassa olevien tietojen perusteella – tai jos tämän altistuskerran aikana käy ilmi, että jompikumpi sukupuoli on herkempi – käytetään 10:tä herkemmän sukupuolen eläintä (kaksi eläintä pitoisuutta/aikapistettä kohti) jokaisella pitoisuustasolla testauksen seuraavissa vaiheissa. 10 eläintä.

([b]) Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Oletetun myrkyllisyyden tai esikokeen tulosten perusteella on valittava pienemmät aloituspitoisuudet. Sääntelyyn liittyvien tai tieteellisten tarpeiden yhteydessä voidaan käyttää suurempia pitoisuuksia.

([c]) Eläinten altistusta seuraavalle pitoisuudelle on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Näin tutkimuksen johtaja voi mukauttaa seuraavan altistusryhmän tavoitepitoisuutta ja altistuksen kestoa.

([d]) Pienintä annosta (pitoisuus x aika), joka aiheutti kuolleisuutta alkupitoisuudella testattaessa (ensimmäinen altistuskerta), käytetään ohjenuorana määritettäessä seuraavaa pitoisuuden ja altistuksen keston yhdistelmää. Yleensä pitoisuutta pienennetään kaksinkertaisesti (1/2 L), ja eläimet altistetaan uudelle aikavälille, jota on tarkennettu siten, että altistusajat on jaettu kertoimella 1,4 (√2; katso viite 11) ensimmäisen altistuksen yhteydessä havaittuun pienimpään tappavaan annokseen (aika × pitoisuus) liittyvän ajan mukaisesti. Tässä kuvassa (kuva 1) altistuskerralla 1 havaittiin kuolleisuutta 15 minuutin kohdalla, joten altistuskerran II kestot sijoitetaan tällöin 30 minuutin ympärille, ja ne ovat 15, 21, 30, 42 ja 60 minuuttia. Kahden ensimmäisen altistuksen jälkeen on erittäin suositeltavaa piirtää tiedoista edellä olevan kuvan kaltainen kuva ja tarkistaa, onko pitoisuuden ja ajan välinen kulma 45 astetta (n = 1) vai onko pitoisuus-aika-vastesuhde loivempi (esimerkiksi N = 2) vai jyrkempi (esimerkiksi n = 0,8). Jälkimmäisissä tapauksissa on erittäin suositeltavaa muuttaa seuraavia pitoisuuksia ja kestoja vastaavasti.

▼M4

Altistuskerta IV – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää suuremmalle pitoisuudelle (e) (2 L) hieman lyhyemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

C × t -protokollalla saatujen tulosten matemaattinen käsittely

11. C × t -menettely, jossa on neljä tai viisi altistuspitoisuutta ja viisi kestoa, tuottaa 20 tai 25 datapistettä. Näiden datapisteiden avulla C × t -suhde voidaan laskea käyttämällä tilastollista analyysia (16):

Kaava 1

$$Probitti(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

jossa C = pitoisuus; t = altistuksen kesto, tai

Kaava 2

$$Vaste = f(C^n t)$$

jossan = b_1/b_2.

Kaavan 1 avulla LC_{50}-arvo voidaan laskea tietylle ajanjaksolle (esimerkiksi neljä tuntia, yksi tunti, 30 minuuttia tai mikä tahansa ajanjakso testatuilta ajanjaksoilta) käyttäen arvoa P = 5 (50 prosentin vaste). Haberin sääntöä voidaan soveltaa vain, kun n = 1. LC_{01}-arvo voidaan laskea käyttäen arvoa P = 2,67.

(e) Tietyissä tapauksissa voi olla tarpeen suurentaa pitoisuutta (2 L) uuden, vieläkin tarkemman aikavälin mukaisesti siten, että altistusajat jaetaan geometrisesti kertoimella 1,4 (√2) sen ajan mukaisesti, jolloin ensimmäisessä altistuksessa havaittiin pienin tappava pitoisuus. Altistuksen vähimmäiskeston on mielellään oltava yli viisi minuuttia, kun taas enimmäiskesto ei saa ylittää kahdeksaa tuntia.

▼B

B.3. **AKUUTTI MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Ainetta levitetään useaan ryhmään jaettujen eläinten iholle porrastettuina annoksina (yksi annos ryhmää kohti). Tämän jälkeen eläimiä tarkkaillaan oireiden ja kuolemien suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

Eläimet, joilla on vakavia ja pitkittyneitä ahdistuneisuuden ja kivun oireita, voidaan tarvittaessa lopettaa. Testattavia aineita ei tarvitse antaa tavalla, jonka tiedetään aiheuttavan selvää kipua ja ahdistusta syövyttävien tai ärsyttävien ominaisuuksien vuoksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittelyryhmiin. Noin 24 tuntia ennen testiä turkki leikataan tai ajetaan eläinten selkäalueelta varoen naarmuttamasta ihoa, koska naarmut saattaisivat muuttaa ihon läpäisevyyttä. Vähintään 10 % ihoa peittävästä karvasta on ajeltava tai leikattava. Kiinteät aineet voidaan tarvittaessa jauhaa, ja ne on kosteutettava riittävällä vesimäärällä tai tarvittaessa muulla liuottimella hyvän ihokontaktin varmistamiseksi. Jos käytetään liuotinta, on otettava huomioon liuottimen vaikutus aineen imeytymiseen iholta. Nestemäisiä aineita käytetään yleensä laimentamattomina.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Koe-eläiminä voidaan käyttää aikuisia rottia tai kaneja. Muiden lajien käyttö on perusteltava. Testiin käytetään yleisiä laboratoriokantoja. Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

▼B

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään viisi eläintä, joiden on oltava samaa sukupuolta. Jos käytetään naaraita, ne eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos on käytettävissä tietoja, joiden mukaan jompikumpi sukupuoli on selvästi toista herkempi, kokeessa on käytettävä tätä sukupuolta.

Huomautus: Käytettäessä rottaa kehittyneempiä eläimiä akuutin myrkyllisyyden testauksia varten on harkittava pienempää eläinmäärää kuin rottien kohdalla. Annokset valitaan huolella, ja kohtuullisen myrkyllisten annosten ylittämistä on vältettävä kaikin keinoin. Tällaisissa kokeissa on vältettävä tappavien annosten antamista.

1.6.2.3 *Annostasot*

Annostasoja on oltava tarpeellinen määrä, kuitenkin vähintään kolme. Annostasot jaetaan siten, että saadaan jakauma myrkytysoireiden ja kuolleisuuden suhteen. Annostasojen valinnassa on otettava huomioon mahdolliset ärsyttävät tai syövyttävät ominaisuudet. Tietojen perusteella tulisi voida piirtää pitoisuus/kuolleisuus-käyrä, ja LC_{50}-arvo tulisi määrittää aina kun se vain on mahdollista.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Voidaan tehdä yhden annostason rajatesti (vähintään 2 000 mg/kg) viiden koiraan ja viiden naaraan ryhmälle edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti. Jos aineeseen liittyvää kuolleisuutta esiintyy, on harkittava kattavaa testiä.

1.6.2.5 *Tarkkailujakso*

Tarkkailujakson minimipituus on 14 päivää. Jakson pituus ei ole ehdottoman kiinteä, vaan sitä voidaan tarvittaessa säätää myrkytysoireiden, oireiden alkamisnopeuden ja toipumisjakson mukaan. Myrkytysoireiden ilmestymis- ja häviämisajankohta sekä kuoleman ajankohta ovat tärkeät, etenkin jos kuolemilla on taipumus ”viivästyä”.

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä pidetään yksin häkeissä. Testattavaa ainetta levitetään tasaisesti alueelle, joka on noin 10 % kehon kokonaispinta-alasta. Erittäin myrkyllisten aineiden kohdalla voidaan käyttää pienempää pinta-alaa, mutta ainetta on levitettävä mahdollisimman ohuelti ja tasaisesti niin suurelle alueelle kuin mahdollista.

Testattava ihoalue peitetään harsositeellä ja ärsyttämättömällä laastarilla koko 24 tunnin altistusjakson ajaksi. Tämän lisäksi alue on peitettävä siten, että harsoside ja aine pysyvät paikallaan eikä eläin pääse syömään ainetta. Eläin voidaan sitoa osittain siten, että se ei pysty syömään ainetta. Täyttä liikkumattomuutta ei kuitenkaan suositella.

▼B

Altistusjakson jälkeen aineen jäännökset poistetaan vedellä tai muulla sopivalla ihonpuhdistusmenetelmällä.

Havainnot tehdään ja kirjataan systemaattisesti. Jokaisesta eläimestä tulee olla oma kirjanpitonsa. Ensimmäisen päivän aikana havaintoja on tehtävä usein. Vähintään kerran työpäivässä on tehtävä huolellinen kliininen tutkimus. Muut havainnot tehdään päivittäin ja eläinhukka minimoidaan soveltuvin toimenpitein (kuolleet eläimet jäädytetään tai niille tehdään ruumiinavaus ja heikot tai kuolevat eläimet eristetään tai lopetetaan).

Tarkkaillaan turkin, käsitellyn ihon, silmien, limakalvojen, hengitysteiden, verenkierron, autonomisen hermoston, keskushermoston, somatomotorisen aktiviteetin ja käyttäytymismallin muutoksia. Erityisesti on tarkkailtava vapinaa, kouristuksia, syljeneritystä, ripulia, letargiaa, unta ja koomaa. Kuoleman ajankohta on kirjattava niin tarkoin kuin mahdollista. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu. Kaikki huomattavan suuret patologiset muutokset on kirjattava. Histopatologista tutkimusta varten otetaan kudosnäytteet voimassa olevan ohjeen mukaan.

Arviointi myrkyllisyydestä toisen sukupuolen kohdalla

Kun toiselle sukupuolelle tehty koe on saatu päätökseen, ainetta annostellaan vähintään viiden toista sukupuolta olevan eläimen ryhmälle, jotta voitaisiin todeta, ovatko tämän sukupuolen eläimet aineelle huomattavasti herkempiä. Pienemmänkin eläinmäärän käyttöä voidaan perustella yksittäisissä tapauksissa. Jos on käytettävissä tietoja, joiden mukaan testatun sukupuolen eläimet ovat huomattavasti herkempiä, toista sukupuolta ei tarvitse testata.

2. **TIEDOT**

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa jokaisen ryhmän kohdalla on eläinten määrä kokeen alussa, yksittäisten eläinten kuolinajankohdat, niiden eläinten määrä, joilla on muita myrkyllisyydestä johtuvia oireita, myrkytysoireiden kuvaus ja ruumiinavauslöydökset. Yksittäisten eläinten painot on kirjattava välittömästi ennen aineen annostelua, sen jälkeen viikoittain ja lopuksi kuoleman jälkeen. Painonmuutokset on laskettava ja kirjattava, kun eläin pysyy hengissä kauemmin kuin yhden vuorokauden. Eläimet, jotka on lopetettu aineen aiheuttaman ahdistuksen ja kipujen takia, luokitellaan aineen vaikutuksesta kuolleiksi. LD_{50} voidaan määrittää yleisesti tunnetun menetelmän mukaan.

Tietojen arviointiin tulee sisältyä mahdolliset yhteydet eläimen aineelle altistamisen ja kaikkien poikkeavuuksien esiintymisen ja vakavuuden välillä. Tällaisia poikkeavuuksia ovat esimerkiksi käyttäytymismuutokset, kliiniset muutokset, painonmuutokset, kuolleisuus ja muut toksikologiset vaikutukset.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

▼B

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,

— testiolosuhteet (mukaan lukien ihonpuhdistusmenetelmä ja siteen tyyppi: okklusiivinen tai ei-okklusiivinen),

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien sekä mahdollinen testattavan aineen pitoisuus),

— altistettujen eläinten sukupuoli,

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan (kokeen aikana kuolleiden tai lopetettujen eläinten määrä, niiden eläinten määrä, joilla on myrkyllisyydestä johtuvia oireita, altistettujen eläinten määrä),

— annostelun jälkeisten kuolemien ajankohta, syyt ja kriteerit eläinten lopettamiseen,

— kaikki havainnot,

— LD_{50}-arvo sukupuolelle, jolle on tehty 14 päivän pituinen kattava koe (määritysmenetelmä on ilmoitettava),

— LD_{50}-arvon 95 prosentin luottamusväli (mahdollisuuksien mukaan),

— annos-kuolleisuuskäyrä ja sen kaltevuus (määritysmenetelmän sallimissa rajoissa),

— ruumiinavauslöydökset,

— muut histopatologiset löydökset,

— toisen sukupuolen testauksen tulokset (jos on tehty),

— tulosten pohdinta (erityistä huomiota on kiinnitettävä kokeen aikana tehtyjen koe-eläinten lopettamisien LD_{50}-arvoon kohdistamaan vaikutukseen),

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4. **VIITTEET**

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

▼M8

B.4. AKUUTTI IHOÄRSYTTÄVYYS/-SYÖVYTTÄVYYS

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 404 (2015). Kemikaalien testaamiseen tarkoitettuja OECD:n testiohjeita tarkistetaan säännöllisesti, jotta varmistetaan, että ne vastaavat parhaita käytettävissä olevia tieteellisiä menetelmiä. OECD:n testiohjeen 404 tarkistuksessa on erityisesti pyritty ottamaan huomioon eläinten hyvinvoinnin parantamiseen liittyvät näkökohdat sekä kaikkien testikemikaalista aiemmin saatujen tietojen arviointi, jotta voidaan välttää tarpeettomia eläinkokeita. OECD:n testiohjeen 404 (hyväksytty ensimmäisen kerran vuonna 1981, tarkistettu vuosina 1992, 2002 ja 2015) päivitetty versio sisältää viittauksia ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden testausta ja arviointia koskevat yhdennetyt lähestymistavat -ohjeeseen (1), jossa esitellään modulaarinen lähestymistapa ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden testaukseen. Yhdennetyissä lähestymistavoissa kuvataan useita moduuleita, joihin on ryhmitelty tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä annetaan i) ohjeita siitä, miten integroida ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja testauksen ulkopuolella saatuja tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa, ja ii) selostetaan, miten toimitaan, kun lisätestaus on tarpeen (1). Lisäksi kyseisessä ohjeessa suositellaan, että tarvittaessa *in vivo* -alkutestissä eläimelle asetetaan kolme testilappua peräkkäin eikä samanaikaisesti.

2. Ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden määritelmät esitetään tämän testimenetelmän lisäyksessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT

3. Järkevien tieteellisten menettelytapojen ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi *in vivo* -testausta ei tule tehdä, ennen kuin kaikkien testikemikaalin mahdollisen ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden kannalta oleellisten tietojen painoarvo on arvioitu ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevien ohjeiden mukaisesti. Tämä koskee tämän ohjeen kolmea osaa ja niitä vastaavia moduuleja (1). Osassa 1 aiempia tietoja käsitellään seitsemässä moduulissa, jotka koskevat ihmisillä saatuja tuloksia, *in vivo* -tietoja, *in vitro* -tietoja, fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia koskevia tietoja (esimerkiksi pH-arvoa ja varsinkin voimakasta happamuutta tai emäksisyyttä) ja muita kuin testaukseen perustuvia menetelmiä. Osassa 2 tehdään painoarvoanalyysi. Jos tietojen painoarvosta ei saada varmuutta, on jatkettava osaan 3, jossa tehdään lisätestejä *in vitro* -menetelmillä, ja *in vivo* -testausta käytetään vasta viimesijaisena keinona. Tällä analyysilla pyritään siis vähentämään *in vivo* -testien tarvetta sellaisten testikemikaalien kohdalla, joiden ihoärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä aiempi tutkimus on jo tuottanut riittävästi todisteita.

IN VIVO -TESTIN PERIAATE

4. Testikemikaali annostellaan yhtenä annoksena koe-eläimen iholle; eläimen ihon käsittelemättömät alueet toimivat kontrollina. Ärsyttävyyden/syövyttävyyden aste todetaan ja pisteytetään määrävälein, ja vauriota kuvaillaan vaikutusten arvioinnin täydentämiseksi. Testin on kestettävä niin pitkään, että havaittujen vaikutusten korjautuvuus tai korjautumattomuus voidaan arvioida.

▼M8

5. Eläimet, joissa havaitaan merkkejä jatkuvasta vakavasta kärsimyksestä ja/tai kivusta missä tahansa testin vaiheessa, on lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon testikemikaalin arvioinnissa. Kuolevien ja kärsivien eläinten lopettamiskriteereihin sovelletaan OECD:n erillistä ohjetta (2).

IN VIVO -TESTIN VALMISTELU

Eläinlajin valinta

6. Suositeltava koe-eläinlaji on albiinokaniini. Kokeessa käytetään nuoria ja terveitä täysikasvuisia yksilöitä. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

Eläinten valmistelu

7. Noin 24 tuntia ennen testiä eläinten selkäpuolen karva ajetaan pois. Ihoa on varottava hankaamasta. Testissä voidaan käyttää vain eläimiä, joiden iho on terve ja vahingoittumaton.

8. Joillakin kaniinikannoilla esiintyy tiheitä karvalaikkuja, jotka ovat tavallista voimakkaampia tiettyinä vuodenaikoina. Tällaisia tiheäkarvaisia alueita ei pidä käyttää testikohtina.

Koe-eläintilat ja ruokinta

9. Jokaisella eläimellä on oltava oma häkki. Koe-eläinhuoneen lämpötilan on oltava kaniineilla 20 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa täytyy käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

TESTIMENETTELY

Testikemikaalin annostelu

10. Testikemikaali annostellaan pienelle ihoalueelle (noin 6 cm^2) ja peitetään sideharsolapulla, joka kiinnitetään ihoa ärsyttämättömällä teipillä. Jos suora annostelu ei ole mahdollinen (esimerkiksi nesteiden tai joidenkin tahnojen kohdalla), testikemikaali annostellaan ensin sideharsolapulle, joka asetetaan iholle. Lappu on pidettävä kevyessä kosketuksessa ihoon sopivan, puolitiiviin siteen avulla koko altistusjakson ajan. Jos testikemikaali annostellaan lappuun, se on kiinnitettävä ihoon siten, että aine on hyvin kosketuksessa ihoon ja leviää tasaisesti. Eläimen yltäminen lappuun ja testikemikaalin nieleminen tai hengittäminen on estettävä.

11. Nestemäisiä testikemikaaleja käytetään yleensä laimentamattomina. Testattaessa kiinteitä aineita (jotka voidaan tarvittaessa jauhaa) testikemikaali on kostutettava mahdollisimman pienellä määrällä vettä (tai tarvittaessa jollain muulla sopivalla kantaja-aineella), jotta saadaan hyvä ihokosketus. Jos käytetään muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineen mahdollisen vaikutuksen testikemikaalin aiheuttamaan ihoärsytykseen pitäisi olla olematon tai mahdollisimman vähäinen.

12. Altistusjakso kestää tavallisesti neljä tuntia, ja sen lopussa ylimääräinen testikemikaali on poistettava, jos se on käytännössä mahdollista, vedellä tai sopivalla liuottimella muuttamatta orvaskeden senhetkistä vastetta tai eheyttä.

▼M8

Annostaso

13. Testikohtaan annostellaan 0,5 ml nestettä tai 0,5 g kiinteää ainetta tai tahnaa.

Alkutesti (ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden *in vivo* -testi yhdelle eläimelle)

14. Kun testikemikaali on määritetty painoarvoanalyysin tai aiemman *in vitro* -testauksen perusteella syövyttäväksi, ärsyttäväksi tai luokittelemattomaksi, muuta *in vivo* -testausta ei yleensä tarvita. Jos kuitenkin katsotaan, että kemikaalista tarvitaan lisää tietoa, *in vivo* -testi tehdään aluksi yhdellä eläimellä ja seuraavassa kuvattua lähestymistapaa noudattaen. Enintään kolme testilappua asetetaan yksi toisensa jälkeen eläimen iholle. Ensimmäinen niistä poistetaan kolmen minuutin kuluttua. Jos vakavaa ihoreaktiota ei havaita, toinen lappu asetetaan iholle eri kohtaan ja poistetaan tunnin kuluttua. Jos havainnot osoittavat tässä vaiheessa, että altistusta voidaan inhimillisesti jatkaa neljään tuntiin asti, kolmas lappu asetetaan paikoilleen ja poistetaan neljän tunnin kuluttua. Vaste pisteytetään.

15. Jos syövyttävä vaikutus havaitaan minkä tahansa kolmen peräkkäisen altistuksen aikana, testi lopetetaan heti. Jos syövyttävää vaikutusta ei havaita viimeisen lapun poistamisen jälkeen, eläintä tarkkaillaan 14 päivän ajan, mikäli syöpymistä ei kehity sitä ennen.

16. Jos testikemikaalin ei odoteta aiheuttavan syöpymistä vaan ärsytystä, eläimelle asetetaan yksi lappu neljän tunnin ajaksi.

Vahvistustesti (ihoärsyttävyyden *in vivo* -testi useille eläimille)

17. Jos alkutestissä ei havaita syövyttävää vaikutusta, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä kaksi eläintä. Kummallekin asetetaan lappu neljän tunnin altistusjakson ajaksi. Jos ärsyttävä vaikutus havaitaan alkutestissä, vahvistustesti voidaan tehdä peräkkäistestinä tai altistamalla kaksi lisäeläintä yhtäaikaisesti. Jos alkutestiä ei poikkeuksellisesti tehdä, kahdelle tai kolmelle eläimelle voidaan asettaa yksi lappu, joka poistetaan neljän tunnin kuluttua. Kun käytetään kahta eläintä, lisätestiä ei tarvita, jos molemmille kehittyy sama vaste. Muussa tapauksessa testataan myös kolmas eläin. Epäselvät vasteet täytyy mahdollisesti arvioida testaamalla lisää eläimiä.

Havainnointijakso

18. Tarkkailujakson on oltava riittävän pitkä, jotta havaittujen vaikutusten korjautuvuus voidaan arvioida kokonaisuudessaan. Testi on kuitenkin lopetettava heti, jos eläin osoittaa jatkuvia merkkejä kovasta kärsimyksestä tai kivusta. Vaikutusten korjautuvuuden määrittämiseksi eläimiä on tarkkailtava enintään 14 päivän ajan lappujen poistamisen jälkeen. Jos korjautuvuus todetaan ennen kuin 14 päivää on kulunut, testi on lopetettava silloin.

Kliiniset havainnot ja ihoreaktioiden pisteytys

19. Kaikista eläimistä tutkitaan eryteeman ja ödeeman merkit ja vasteet pisteytetään ensiksi 60 minuutin jälkeen ja sitten 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua lapun poistamisesta. Yhdelle eläimelle tehtävän alkutestin jälkeen testikohta tutkitaan myös heti lapun poistamisen jälkeen. Ihoreaktiot pisteytetään ja kirjataan jäljempänä esitetyn taulukon asteikon mukaan. Jos iholla esiintyy vaurioita, joita ei voida tunnistaa ärsytykseksi tai syöpymiseksi 72 tunnin kuluttua, havainnointia voi olla tarpeen jatkaa päivään 14 asti, jotta vaikutusten korjautuvuus voidaan todeta. Ärsytyksen lisäksi kaikki paikalliset toksiset vaikutukset, kuten

▼M8

ihon rasvan liukeneminen ja mitkä tahansa systeemiset haittavaikutukset (esimerkiksi vaikutukset kliinisiin toksisuuden merkkeihin ja painoon), on kuvattava ja kirjattava täydellisesti. Epäselvien vaurioiden yhteydessä on harkittava histopatologista tutkimusta.

20. Ihovasteiden pisteytys on väistämättä subjektiivista. Ihovasteiden pisteytyksen yhdenmukaistamiseksi sekä testilaboratorioiden ja havaintoja tekevien ja tulkitsevien henkilöiden työn helpottamiseksi havaintoja tekevä henkilöstö on perehdytettävä käytettävään pisteytysjärjestelmään (ks. jäljempänä oleva taulukko). Kuvitettu opas ihoärsytyksen ja muiden vaurioiden asteista voi olla hyödyllinen (3).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

21. Tutkimuksen tulokset on esitettävä taulukkona lopullisessa testiraportissa, ja niiden on sisällettävä kaikki kohdassa 24 luetellut asiat.

Tulosten arviointi

22. Ihoärsytyspisteet on arvioitava yhdessä vaurioiden luonteen ja vakavuuden sekä niiden korjautuvuuden tai korjautumattomuuden kanssa. Yksittäiset pisteet eivät edusta aineen ärsyttävyysominaisuuksien absoluuttista tasoa, koska myös testikemikaalin muut vaikutukset arvioidaan. Sen sijaan yksittäisiä pisteitä voidaan tarkastella viitearvoina, jotka on arvioitava kaikkien muiden tutkimuksessa tehtyjen havaintojen yhteydessä.

23. Ihovaurioiden korjautuvuus on otettava huomioon ärsytysvastetta arvioitaessa. Jos vasteet, kuten kaljuuntuminen (suppealla alueella), liikasarveistuminen, liikakasvu ja hilseily, jatkuvat 14 päivän tarkkailujakson loppuun asti, testikemikaali on luokiteltava ihoa ärsyttäväksi.

Testiraportti

24. Testiraportissa on oltava seuraavat tiedot:

Perustelut in vivo -testin tekemiselle:

— aiemmista tutkimuksista saatujen testitulosten painoarvoanalyysi, myös vaiheittaisen menettelyn tulokset

— aiemmista testeistä saatujen relevanttien tulosten kuvaus

— testausstrategian kustakin vaiheesta saadut tulokset

— kuvaus tehdyistä *in vitro* -testeistä, myös yksityiskohtaiset tiedot menettelyistä ja testi-/vertailuaineista saadut tulokset

— painoarvoanalyysi *in vivo* -testiä varten.

Testikemikaali:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

▼**M8**

— Useammasta ainesosasta koostuva aine, seos ja koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit (UVCB-aineet): luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrolliaineen käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Kantaja-aine:

— tunnistetiedot, pitoisuus (tarvittaessa), käytetty tilavuus

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläin (-eläimet):

— käytetty laji/kanta, perustelut muiden eläinten kuin albiinokaniinien käytölle

— uros- ja naaraseläinten määrä

— eläinyksilöiden paino(t) testin alussa ja lopussa

— eläinten ikä testin alussa

— eläimen (eläinten) alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio jne.

Testiolosuhteet:

— lapun asettamiskohdan valmistelumenetelmä

— käytettyjen lappumateriaalien ja lappujen asettamismenetelmän yksityiskohdat

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, annostelusta ja iholta poistamisesta.

Tulokset:

— kunkin eläimen ärsytys-/syöpymisvasteen pisteytys jokaiselta mittauskerralta taulukkona

— kuvaus kaikista havaituista vaurioista

— sanallinen kuvaus havaitun ärsytyksen/syöpymisen luonteesta ja asteesta sekä mahdolliset histopatologiset löydökset

— kuvaus muista paikallisista haittavaikutuksista (esimerkiksi ihon rasvan liukeneminen) ja systeemisistä vaikutuksista ihoärsytyksen-/syöpymisen lisäksi.

▼**M8**

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(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.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Taulukko

Ihoreaktioiden pisteytys

Eryteeman ja karstan muodostus

Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2
Keskivakava tai vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus) – karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

Suurin mahdollinen pistemäärä: 4

Ödeeman (turvotuksen) muodostus

Ei ödeemaa	0
Hyvin lievä ödeema (tuskin havaittava)	1
Lievä ödeema (selvärajainen alue, jonka reunat ovat koholla)	2
Keskivakava ödeema (noin 1 mm koholla)	3
Vakava ödeema (enemmän kuin 1 mm koholla ja levinnyt altistuskohtaa laajemmalle)	4

Suurin mahdollinen pistemäärä: 4

Epäselvien vaurioiden tapauksessa voidaan tehdä histopatologinen tutkimus.

▼**M8**

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Kemikaali on aine tai seos.

Ihoärsytys tarkoittaa korjautuvan ihovaurion syntymistä enintään neljä tuntia sen jälkeen, kun testikemikaalia on annosteltu.

Ihon syöpyminen tarkoittaa korjautumattoman ihovaurion syntymistä eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantumista enintään neljä tuntia sen jälkeen, kun testikemikaalia on annosteltu. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet sekä 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden tapauksessa olisi harkittava histopatologista tutkimusta.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M7

B.5. AKUUTTI SILMÄN ÄRSYTTÄVYYS/SYÖVYTTÄVYYS

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 405 (2012). OECD:n testiohjeita kemikaalien testaamiseksi on tarkistettava säännöllisesti, jotta ne heijastavat parhaita käytettävissä olevia tieteellisiä menetelmiä. Tämän testimenetelmän aikaisemmissa päivityksissä kiinnitettiin erityistä huomiota mahdollisiin parannuksiin arvioimalla kaikkia testikemikaalista aiemmin saatuja tietoja, jotta vältettäisiin tarpeettomat eläinkokeet ja siten vastattaisiin eläinten hyvinvointia koskeviin näkökohtiin. Testiohjeeseen 405 (joka hyväksyttiin vuonna 1981 ja jota päivitettiin vuosina 1987, 2002 ja 2012) sisältyy suositus, jonka mukaan ennen tässä kuvatun, aineen ärsyttävyyttä/syövyttävyyttä tutkivan *in vivo* -testin toteuttamista on arvioitava aiempien relevanttien tutkimustulosten painoarvo (1). Jos saatavissa olevat tiedot ovat puutteellisia, niitä voidaan täydentää vaiheittaisen menettelyn avulla (2) (3). Suositeltavaan testausstrategiaan, joka on selostettu tämän menetelmän täydennysosassa, sisältyy validoitujen ja hyväksyttyjen *in vitro* -testien suorittaminen. Kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 ([1]) mukaisesti integroitu testimenettely sisältyy myös asiaankuuluviin Euroopan kemikaaliviraston ohjeisiin (21). Eläinkokeita tulisi tehdä ainoastaan, jos niitä pidetään välttämättöminä sen jälkeen, kun on tarkasteltu käytettävissä olevia vaihtoehtoisia menetelmiä ja kun niiden käyttöä pidetään asianmukaisena. Tämän päivitetyn testimenetelmän valmistelun aikana on tullut esiin tapauksia, jolloin tämän testimenetelmän soveltamista pidetään edelleen tarpeellisena tai sitä edellytetään joidenkin sääntelyjärjestelmien perusteella.

Viimeisimmässä päivityksessä keskityttiin pääasiassa kipulääkkeiden ja anestesia-aineiden käyttöön muuttamatta testiohjeen perusajatusta ja rakennetta. ICCVAM ([2]) ja riippumaton kansainvälinen tieteellinen vertaisarviointiryhmä arvioivat pintapuudutteiden rutiinikäytön käyttökelpoisuutta, systeemisiä kipulääkkeitä ja inhimillisiä päätepisteitä silmänärsytyksen *in vivo* -testauksen aikana (12). Arvioinnissa päädyttiin siihen, että pintapuudutteiden ja systeemisten kipulääkkeiden käytöllä voitaisiin välttää kokonaan tai suurin osa kivusta ja kärsimyksestä testin tulokseen vaikuttamatta, ja suositeltiin, että näitä aineita käytettäisiin aina. Tämä arviointi otetaan huomioon tässä testimenetelmässä. Pintapuudutteita ja systeemisiä kipulääkkeitä on käytettävä ja inhimillisiä päätepisteitä sovellettava akuuttia silmän ärsytystä ja syövyttävyyttä tutkivassa *in vivo*-testauksessa. Poikkeukset niiden käyttöön on perusteltava. Tässä menetelmässä kuvatuilla tarkennuksilla vähennetään merkittävästi tai vältetään eläinten kipu ja kärsimys useimmissa testaustilanteissa, joissa *in vivo*-silmätestaus on edelleen tarpeen.

Tasapainoiseen ennaltaehkäisevään kivunhoitoon tulisi sisältyä (i) rutiininomainen esikäsittely pintapuudutteella (esim. proparakaiini ja tetrakaiini) ja systeemisellä kipulääkkeellä (kuten buprenorfiini); (ii) rutiininomainen jälkikäsittely systeemisellä kivunlievityksellä (kuten buprenorfiini ja meloksikaami); (iii) eläinten kivun ja/tai kärsimyksen kliinisten merkkien suunniteltu havainnointi, seuranta ja rekisteröinti; ja (iv) kaikkien silmävammojen luonteen, vakavuuden ja etenemisen suunniteltu havainnointi, seuranta ja rekisteröinti. Tarkempia tietoja

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta, EUVL L 304, 22.11.2007, s. 1.

([2]) Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea), Yhdysvallat.

▼M7

annetaan jäljempänä kuvatuissa päivitetyissä menettelyissä. Testikemikaalin annostelun jälkeen mitään muita pintapuudutteita tai kipulääkkeitä ei tulisi käyttää, jotta tutkimukseen ei vaikuteta. Kipulääkkeitä, joilla on anti-inflammatorinen vaikutus (esim. meloksikaami), ei pitäisi käyttää paikallisesti, ja systeemisesti käytettyjen annoksien ei pitäisi häiritä silmävaikutuksia.

Määritelmät annetaan tämän testimenetelmän lisäyksessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT

Sekä järkevien tieteellisten menettelytapojen että eläinten hyvinvoinnin vuoksi *in vivo* -testiä ei pidä suorittaa ennen kuin kaikkien saatavissa olevien kemikaalin mahdolliseen silmä-ärsyttävyyteen/syövyttävyyteen liittyvien tietojen painoarvo on arvioitu. Tällaisia tietoja ovat todisteet aiemmista ihmisille ja/tai koe-eläimille tehdyistä tutkimuksista, todisteet yhden tai usean rakenteellisesti samankaltaisen aineen tai ainetta sisältävän seoksen silmä-ärsyttävyydestä/syövyttävyydestä, kemikaalin voimakasta happamuutta tai emäksisyyttä osoittavat tulokset (4) (5) sekä validoidut ja hyväksytyt *in vitro*- tai *ex vivo* -ihoärsyttävyys-/-syövyttävyystestit (6) (13) (14) (15) (16) (17). Tutkimukset voivat olla painoarvoanalyysia aiemmin tehtyjä tai sen tuloksena syntyneitä.

Joidenkin kemikaalien kohdalla painoarvoanalyysi voi osoittaa, että *in vivo* -testi on tarpeen kemikaalin mahdollisen silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden selvittämiseksi. Kaikissa näissä tapauksissa, ennen kuin tarkastellaan *in vivo* -silmätestin käyttöä, olisi mieluiten tehtävä tutkimus *in vitro* ja/tai *in vivo* -testeissä siitä, mitä ihon syöpymisen vaikutuksia kemikaali aiheuttaa, ja tätä olisi arvioitava testimenetelmän B.4 vaiheittaisen testimenettelyn (7) tai kemikaaliviraston toimintaohjeissa kuvatun integroidun testimenettelyn (21) mukaisesti.

Vaiheittainen testimenetelmä, johon sisältyvät validoidut silmän ärsyttävyyden/syövyttävyyden *in vivo* tai *ex vivo* -testit, sisällytetään liitteenä tähän testimenetelmään ja REACH-asetuksen nojalla Euroopan kemikaaliviraston ohjeisiin (21). Tällaisen testimenetelmän käyttöä suositellaan ennen *in vivo* -testin suorittamista. Uusia kemikaaleja testattaessa on suositeltavaa soveltaa vaiheittaista testimenettelyä, jonka avulla voidaan saada tieteellisesti päteviä tuloksia kemikaalin ärsyttävyydestä/syövyttävyydestä. Sellaisten kemikaalien tapauksessa, joiden iho- ja silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä ei ole riittävästi tietoja, menettelytapaa voidaan käyttää puuttuvien tietojen hankkimiseen. Päätös käyttää jotain muuta menettelytapaa tai olla käyttämättä vaiheittaista menettelytapaa on perusteltava.

IN VIVO -TESTIN PERIAATE

Systeemisellä kipulääkkeellä ja asianmukaisella pintapuudutteella annettavan esikäsittelyn jälkeen testiaine annostellaan yhtenä annoksena koe-eläimen toiseen silmään. Käsittelemätön silmä toimii kontrollina. Silmän ärtymisen/syöpymisen aste arvioidaan pisteyttämällä sidekalvon, sarveiskalvon ja värikalvon vammat tietyin väliajoin. Muut silmään kohdistuvat vaikutukset ja koko elimistöön kohdistuvat haittavaikutukset kuvataan myös, jotta vaikutuksia voidaan arvioida kokonaisuudessaan. Testin on kestettävä niin pitkään, että havaittujen vaikutusten korjautuvuus tai korjautumattomuus voidaan arvioida.

Eläimet, joissa havaitaan merkkejä jatkuvasta vakavasta stressistä ja/tai tuskista missä tahansa testin vaiheessa tai vammoja, jotka ovat yhdenmukaisia tässä testimenetelmässä kuvattujen inhimillisten päätepisteiden kanssa (ks. 26 kohta), on lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon kemikaalin arvioinnissa. Kuolevien ja kärsivien eläinten lopettamiskriteereihin sovelletaan OECD:n ohjeasiakirjaa (8).

▼M7

IN VIVO -TESTIN VALMISTELU

Lajin valinta

Suositeltava koe-eläinlaji on albiinokaniini. Kokeessa käytetään nuoria ja terveitä täysikasvuisia yksilöitä. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

Eläinten valmistelu

Kunkin alustavasti testiin valitun koe-eläimen molemmat silmät tutkitaan testin alkua edeltävän 24 tunnin aikana. Eläimiä, joilla esiintyy silmien ärtyneisyyttä, silmävikoja tai aiempia sarveiskalvon vaurioita, ei voi käyttää testissä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

Jokaisella eläimellä on oltava oma häkki. Koe-eläinhuoneen lämpötilan on oltava kaniineilla 20 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden pitäisi olla vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa ja 12 tuntia pimeää). Liian voimakasta valoa on vältettävä. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

TESTIMENETTELY

Pintapuudutteiden ja systeemisten kipulääkkeiden käyttö

Seuraavia menetelmiä suositellaan, jotta kipua ja kärsimystä vältetään tai se minimoidaan silmätestausta koskevissa menettelyissä. Vaihtoehtoisia menettelyjä, joiden on todettu välttävän tai lievittävän kipua tai kärsimystä yhtä hyvin tai paremmin, voidaan käyttää niiden sijasta.

— Kuusikymmentä minuuttia ennen testikemikaalin antoa buprenorfiini 0,01 mg/kg annetaan ihonalaisena injektiona, ja sillä tarjotaan oikean hoitotason mukainen systeeminen kivunlievitys. Buprenorfiinin ja muiden vastaavien systeemisesti annosteltavien opioidianalgeettien ei tiedetä tai odoteta muuttavan silmävasteita (12)

— Viisi minuuttia ennen testikemikaalin annostelua yksi tai kaksi tippaa silmiin käytettävä paikallispuudutetta (esim. 0,5 %:n proparakaiinihydrokloridi tai 0,5 %:n tetrakaiinihydrokloridi) annostellaan kuhunkin silmään. Tutkimukselle aiheutuvien häiriöiden välttämiseksi suositellaan paikallispuudutetta, joka ei sisällä säilöntäaineita. Kontrollina toimii kunkin eläimen osalta se silmä, jota ei käsitellä testikemikaalilla, mutta joka käsitellään pintapuudutteella. Jos kemikaalin ennakoidaan aiheuttavan merkittävää kipua ja kärsimystä, sitä ei pitäisi normaalisti testata *in vivo*. Kuitenkin, mikäli epäilyjä esiintyy tai kun testaus on tarpeen, on harkittava, että paikallispuudutetta annetaan täydentäviä annoksia viiden minuutin välein ennen testikemikaalin annostelua. Käyttäjien on tiedettävä, että useat pintapuuduteannokset saattaa aiheuttaa lievää vaikeusasteen lisääntymistä ja/tai lisätä kemikaalien aiheuttamien vammojen korjaantumisaikaa

— Kahdeksan tuntia testikemikaalin annon jälkeen annostellaan buprenorfiinia 0,01 mg/kg ihonalaisena injektiona ja meloksikaamia 0,5 mg/kg ihonalaisena injektiona oikean hoitotason mukaiseksi systeemiseksi kivunlievitykseksi. Vaikka ei ole tietoa siitä, että meloksikaamilla on tulehdusta estävä vaikutus silmiin, kun sitä annetaan ihon alle kerran vuorokaudessa, meloksikaamia ei tulisi antaa ennen kuin vähintään 8 tuntia testikemikaalin annostuksen jälkeen, jotta mahdolliset häiriöt tutkimuksessa vältetään (12)

— Kun on kulunut ensimmäinen kahdeksan tuntia testikemikaalin annostuksen jälkeen, buprenorfiinia 0,01 mg/kg (ihonalaisena injektiona) tulisi antaa 12 tunnin välein yhdessä meloksikaamin 0,5 mg/kg (ihonalaisena injektiona) kanssa 24 tunnin välein kunnes silmävauriot korjaantuvat ja mitään kliinisiä

▼M7

merkkejä kivusta ja kärsimyksestä ei esiinny. On saatavilla pitkävaikutteisia kipulääkevalmisteita, joiden kohdalla voidaan harkita kipulääkkeiden annostustiheyden harventamista

— Välittömästi testikemikaalin annostelun jälkeen on annettava nopeaa kivunlievitystä, jos ehkäisevä kivunlievitys ja pintapuudutus eivät riitä. Jos eläin osoittaa merkkejä kivusta ja kärsimyksestä tutkimuksen aikana, on annettava välittömästi annos buprenorfiinia 0,03 mg/kg ihonalaisena injektiona ja sitä on toistettava tarvittaessa 8 tunnin välein, sen sijaan, että sitä annetaan 0,01 mg/kg 12 tunnin välein. Meloksikaami 0,5 mg/kg (ihonalainen injektio) annetaan 24 tunnin välein yhdessä nopeasti annettavan buprenorfiinin kanssa, mutta vasta vähintään 8 tunnin kuluttua testikemikaalin annostelun jälkeen.

Testikemikaalin annostelu

Eläimen alaluomea vedetään varovasti silmämunasta poispäin ja testikemikaali annostellaan eläimen toisen silmän sidekalvopussiin. Sen jälkeen luomia pidetään varovasti yhdessä sekunnin ajan, jotta aine ei valuisi ulos silmästä. Toinen silmä, jota ei käsitellä, toimii kontrollina.

Kosteutus

Koe-eläinten silmiä ei saa pestä vähintään 24 tuntiin testikemikaalin annostelun jälkeen, paitsi jos kyseessä on kiinteä aine (ks. 18 kohta) tai välitön ärsyttävä tai syövyttävä vaikutus. Silmät voidaan pestä 24 tunnin kuluttua, jos se katsotaan tarpeelliseksi.

Pesemisen vaikutuksen selvittämiseksi ei suositella kontrolliryhmää, paitsi jos sille on tieteellisiä perusteita. Jos kontrolliryhmä tarvitaan, käytetään kahta kaniinia. Pesuolosuhteet on dokumentoitava tarkasti, esimerkiksi pesuaika, pesuliuoksen koostumus ja lämpötila, pesun kesto, nesteen tilavuus ja virtausnopeus.

Annostaso

(1) *Nesteiden testaus*

Testattaessa nesteitä testiannos on 0,1 ml. Kemikaalia ei saa annostella suoraan suihkepumpusta silmään. Nestesuihke on ensin kerättävä astiaan ennen 0,1 ml:n annostelua silmään.

(2) *Kiinteiden kemikaalien testaus*

Testattaessa kiinteitä kemikaaleja, tahnoja ja hiukkasmaisia aineita annoksen tilavuuden on oltava 0,1 ml tai painon enintään 100 mg. Testikemikaali jauhetaan hienoksi pölyksi. Kiinteän aineen tilavuus mitataan, kun aine on ensin kevyesti tiivistetty esimerkiksi naputtamalla mitta-astiaa. Jos kiinteä testikemikaali ei ole poistunut koe-eläimen silmästä fysiologisten mekanismien seurauksena ensimmäiseen havainnointiaikaan mennessä eli tunnin kuluttua käsittelystä, silmä voidaan huuhdella fysiologisella suolaliuoksella tai tislatulla vedellä.

(3) *Aerosolien testaus*

On suositeltavaa kerätä kaikki pumpattavat suihkeet ja aerosolit ennen niiden annostelua silmään. Ainoa poikkeus ovat paineistetuissa aerosolisäiliöissä olevat kemikaalit, joita ei voida kerätä höyrystymisen takia. Sellaisessa tapauksessa silmää pidellään auki ja testikemikaali annostellaan silmään yhtenä sekunnin kestävänä purskauksena 10 cm:n etäisyydeltä suoraan silmän edestä. Välimatka voi vaihdella suihkesäiliön paineen ja sisällön mukaan. On varottava, ettei suihkesäiliön paine vahingoita silmää. Joissakin tapauksissa voi olla syytä arvioida suihkeen voimakkuuden silmälle mahdollisesti aiheuttamat ”mekaaniset” vauriot.

▼M7

Aerosoliannoksen suuruus voidaan arvioida simuloimalla testiä seuraavalla tavalla. Testikemikaali suihkutetaan punnituspaperille suoraan paperin edessä olevasta kaniinin silmän kokoisesta aukosta. Paperin painon lisäyksen avulla arvioidaan silmään suihkutettu määrä. Haihtuvien kemikaalien tapauksessa annoksen suuruus voidaan arvioida punnitsemalla keräysastia testikemikaalin poistamista ennen ja sen jälkeen.

Alkutesti (*in vivo* -silmä-ärsyttävyys/syövyttävyystesti yhdelle eläimelle)

On erittäin suositeltavaa suorittaa aluksi yhdelle eläimelle *in vivo* -testi (ks. tämän testimenetelmän täydennysosa: silmä-ärsyttävyyden ja -syövyttävyyden vaiheittainen testaus). Havainnoilla on voitava määrittää vakavuus ja korjautuvuus ennen kuin tehdään varmistustesti toisella eläimellä.

Jos testitulos osoittaa, että kemikaali on silmää syövyttävä tai vakavasti ärsyttävä kuvattua menettelyä käytettäessä, silmän ärtymistä ei pidä enää testata.

Vahvistustesti (*in vivo* -silmä-ärsyttävyystesti useille eläimille)

Jos alkutestissä ei havaita syöpymisoireita tai vakavia ärsytysoireita, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä enintään kaksi eläintä. Jos alkutestissä todetaan voimakas ärsyttävä vaikutus, on suositeltavampaa tehdä vahvistustesti vaiheittaisen menettelyn mukaan yhdelle eläimelle kerrallaan kuin altistaa kaksi eläintä samalla kertaa. Jos toisella eläimellä esiintyy syöpymisoireita tai vakavia ärsytysoireita, testiä ei jatketa. Jos toisesta eläimestä saadaan tarpeeksi tuloksia vaaraluokituspäätöksen tekemiseksi, muita testejä ei pitäisi enää tehdä.

Havainnointijakso

Tarkkailujakson on oltava riittävän pitkä, jotta havaittujen vaikutusten voimakkuus ja korjautuvuus arvioidaan täydellisesti. Testi on kuitenkin lopetettava heti, jos eläin osoittaa merkkejä kovista tuskista tai stressistä (8). Vaikutusten korjautuvuuden määrittämiseksi eläimiä on tarkkailtava tavallisesti 21 päivän ajan testikemikaalin antamisen jälkeen. Jos korjautuvuus todetaan ennen kuin 21 päivää on kulunut, testi on lopetettava silloin.

Kliiniset havainnot ja silmäreaktioiden pisteytys

Silmiä on arvioitava kattavasti silmävaurioiden esiintymisen tai puuttumisen osalta tunnin kuluttua testikemikaalin antamisesta ja tämän jälkeen ainakin kerran päivässä. Eläimiä on arvioitava useita kertoja päivässä ensimmäisen kolmen päivän aikana, jotta varmistetaan, että lopettamispäätökset tehdään ajoissa. Koeeläimiä on rutiininomaisesti arvioitava koko tutkimuksen keston ajan kivun ja/tai kärsimyksen kliinisten merkkien varalta (esim. silmien toistuva raapiminen tai hankaaminen, ylenmääräinen silmien räpyttely tai vuotaminen) (9) (10) (11) vähintään kaksi kertaa päivittäin, vähintään 6 tuntia havainnointien välillä, tai tarvittaessa useammin. Tämä on tarpeen, jotta (i) eläimiä arvioidaan asianmukaisesti kivun ja kärsimyksen merkkien varalta, jotta tehdään perusteltuja päätöksiä tarpeesta lisätä kipulääkkeiden annostusta ja (ii) eläimiä arvioidaan vakiintuneiden inhimillisten päätepisteiden osalta, jotta tehdään perusteltuja päätöksiä siitä, onko tarkoituksenmukaista lopettaa eläin humaanisti ja varmistaa, että tällaiset päätökset tehdään ajoissa. Fluoreseiinivärjäystä on käytettävä rutiininomaisesti ja rakolamppu- biomikroskopiaa käytetään tarpeen vaatiessa (esimerkiksi arvioitaessa sarveiskalvon haavauman yhteydessä vamman vakavuutta) havainnointivälineenä okulaarivaurion mittaamisessa ja arvioitaessa, onko humaanin lopettamisen osalta

▼M7

vahvistetut päätepistettä koskevat perusteet täytetty. Digitaalivalokuvia havaituista vaurioista voidaan kerätä viitteeksi ja tarjoamaan pysyvä aineisto okulaarivaurion laajuudesta. Eläintä ei saa pitää testattavana sen jälkeen kun lopulliset tiedot on saatu. Eläimet, jotka osoittavat stressin tai vakavien tuskien merkkejä, on viipymättä lopetettava inhimillisellä tavalla, ja tämä on otettava huomioon testikemikaalin vaikutusten arvioinnissa.

Inhimillisellä tavalla on lopetettava eläimet, joilla esiintyy testiaineen annostelun jälkeen seuraavia silmävammoja (ks. taulukko 1 vaurioiden asteista): sarveiskalvon puhkeaminen tai huomattava sarveiskalvon haavauma mukaan luettuna pullistuma, verta silmän etukammiossa, asteen 4 sarveiskalvosamentuma, valorefleksin puuttuminen (värikalvon vaste 2), joka jatkuu 72 tuntia, sidekalvon haavauma, sidekalvon tai vilkkukalvon kuolio tai arpeutuminen. Näin menetellään siksi, että kyseiset vauriot ovat yleensä korjautumattomia. Lisäksi suositellaan, että seuraavia silmävammoja käytetään inhimillisinä päätepisteinä tutkimusten lopettamiseksi ennen suunniteltua 21 päivän tarkkailujaksoa. Näiden vaurioiden katsotaan osoittavan, että vamma aiheutuu vakavasti ärsyttävistä tai syövyttävistä kemikaaleista johtuvista vaurioista, joiden ei odoteta täysin poistuvan 21 päivän tarkkailujakson loppuun mennessä: vamman ulottuminen vakavaan syvyyteen (esim. sarveiskalvon haavauma, joka ulottuu strooman pintakerroksiin), sarveiskalvon rajan tuhoutuminen > 50 % (jota osoittaa sidekalvokudoksen vaalentuminen), ja vakava silmätulehdus (märkivä, rähmäinen silmä). Seuraavaa yhdistelmää voidaan pitää potentiaalisesti hyödyllisinä kriteereinä, jotka vaikuttavat kliiniseen päätökseen tutkimuksen ennenaikaisesta päättämisestä: sarveiskalvon pinnan verisuonittuminen (eli pannus); fluoreseiinivärjätty alue, jonka ala ei pienene ajan mittaan päivittäisen arvioinnin perusteella; ja re-epitelisaation puuttuminen viiden päivän kuluttua testikemikaalin antamisesta. Nämä havainnot eivät kuitenkaan riitä yksittäin perusteiksi tutkimuksen ennenaikaiselle päättämiselle. Kun vakavia silmävaikutuksia on havaittu, tarkkailijana olevaa/pätevää laboratorion eläinlääkäriä tai henkilöstöä, joka on koulutettu havaitsemaan kliiniset vammat, on kuultava kliinisessä tutkimuksessa, jossa määritetään, antaako näiden vaikutusten yhdistelmä aiheen päättää tutkimus varhaisessa vaiheessa. Silmänreaktioiden pisteytys (sidekalvo, sarveiskalvo ja värikalvo) on otettava ja kirjattava 1, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua testikemikaalin annostuksesta (taulukko 1). Eläimet, joille ei kehity silmävammoja, voidaan lopettaa aikaisintaan kolme päivää testikemikaalin annostelun jälkeen. Eläimiä, joilla esiintyy muita kuin vakavia vaurioita, on tarkkailtava, kunnes vauriot häviävät, tai 21 päivää, jolloin koe päätetään. Havainnot on tehtävä ja kirjattava vähintään 1 tunnin, 24 tunnin, 48 tunnin, 72 tunnin, 7 päivän, 14 päivän ja 21 päivän kuluttua, jotta voidaan määrittää vaurioiden tila ja niiden korjautuvuus tai korjautumattomuus. Havaintoja on tehtävä tarvittaessa tiheämmin, jotta määritetään, pitääkö koe-eläin lopettaa inhimillisistä syistä tai poistaa tutkimuksesta negatiivisten tulosten vuoksi.

Silmävaurioiden pisteytys (taulukko 1) on kirjattava kussakin tarkastelussa. Kaikki muut silmävauriot (esimerkiksi sarveiskalvoverho, värjäytyminen, etukammion muutokset) tai koko elimistöön kohdistuvat haittavaikutukset on myös raportoitava.

Reaktioiden tutkimista helpottaa luuppilasien, lampun, biomikroskoopin tai muiden sopivien laitteiden käyttö. Kun havainnot on kirjattu 24 tunnin jälkeen, silmiä voidaan edelleen tutkia fluoreskeiinin avulla.

Silmävasteiden pisteytys on väistämättä subjektiivista. Silmävasteiden pisteytyksen yhdenmukaistamiseksi sekä testilaboratorion ja havaintoja tekevien ja tulkitsevien henkilöiden työn helpottamiseksi havaintoja tekevän henkilöstön on oltava riittävän perehtynyttä pisteytysjärjestelmään.

▼M7

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten arviointi

Silmä-ärsytyspisteet on arvioitava yhdessä vammojen luonteen ja vakavuuden sekä niiden korjautuvuuden tai korjautumattomuuden kanssa. Yksittäiset pisteet eivät edusta kemikaalin ärsyttävyysominaisuuksien absoluuttista tasoa, koska testikemikaalin muutkin vaikutukset ovat arvioinnissa mukana. Sen sijaan yksittäisiä pisteitä pitäisi tarkastella viitearvoina, jotka ovat merkitseviä vain, kun kaikki muut havainnot ja niiden arviointi tukevat pisteiden antamaa tietoa.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Perustelut in vivo -testin tekemiselle: aiemmista tutkimuksista saatujen testitulosten painoarvon analyysi, mukaan luettuna vaiheittaisen menettelyn tulokset:

— aiemmista testeistä saatujen relevanttien tulosten kuvaus

— testimenettelyn kustakin vaiheesta saadut tulokset

— kuvaus tehdyistä *in vitro* -testeistä, mukaan luettuna niiden suorittamistapa ja testi-/viitekemikaalista saadut tulokset

— kuvaus tehdyistä *in vivo* -ihoärsyttävyys/-syövyttävyystesteistä sekä niiden tulokset

— painoarvoanalyysi *in vivo* -testiä varten.

Testikemikaali:

— tunnistetiedot (esim. kemikaalin nimi ja CAS-numero, jos se tiedetään, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, alkuperä, erän numero)

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esimerkiksi pH, haihtuvuus, liukoisuus, stabiilius, reaktiivisuus veden kanssa)

— jos kyseessä on seos, aineet on tunnistettava mukaan lukien tunnistetiedot ainesosista (esim. kemialliset nimet ja CAS-numerot, jos ne tiedetään) ja niiden pitoisuudet

— käytetty annos.

Kantaja-aine:

— tunnistetiedot, konsentraatio (tilanteen mukaan), käytetty tilavuus

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet:

— käytetty laji ja kanta, perustelut muiden eläinten kuin albiinokaniinien käytölle

— eläinten ikä testin alussa

— uros- ja naaraseläinten määrä testi- ja kontrolliryhmissä (jos tarpeen)

— eläinyksilöiden paino testin alussa ja lopussa

— eläinten alkuperä, häkkijärjestelyt, ruokavalio ja niin edelleen.

▼M7

Puudutusaineet ja kipulääkkeet

— annokset ja ajat, jolloin pintapuudutteita ja systeemisiä kipulääkkeitä annettiin

— jos on käytetty paikallispuudutusainetta, sen tunnistetiedot, puhtaus, laji ja mahdollinen yhdysvaikutus testikemikaalin kanssa.

Tulokset:

— kuvaus ärsytyksen pisteytyksessä käytetystä välineestä kullakin havaintokerralla (esimerkiksi lamppu, biomikroskooppi, fluoreskeiini)

— taulukkomuotoiset tiedot kunkin eläimen ärsytys-/syöpymisvasteesta kullakin havaintokerralla siihen asti, kun eläin on poistettu testistä

— sanallinen kuvaus havaitun ärsytyksen/syöpymisen luonteesta ja asteesta

— kuvaus kaikista silmässä havaituista vaurioista (esimerkiksi verisuonittuminen, sarveiskalvoverhon muodostus, umpeen muurautuminen, värjäytyminen)

— kuvaus muualle kuin silmään kohdistuvista vaurioista sekä koko elimistöön kohdistuvista haittavaikutuksista, kivun ja kärsimyksen kliinisten merkkien kirjaaminen, digitaalivalokuvat ja mahdolliset histopatologiset löydökset.

Tulosten pohdinta

Tulosten tulkinta

Koe-eläimille tehtyjen silmä-ärsytystestien tulosten ekstrapolointi ihmisiä koskeviksi on vain rajoitetusti pätevää. Monissa tapauksissa albiinokaniini on ihmistä herkempi silmää ärsyttäville tai syövyttäville aineille.

Tulosten tulkinnassa on huolellisesti erotettava sekundäärisestä tulehduksesta johtuva ärsytys.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410–429.

(2) de Silva, O., *et al.* (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., *et al.* (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., *et al.* (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, s. 483–524.

(7) Tässä liitteessä oleva B.4 luku, *Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys*.

▼M7

(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://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20–36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Tässä liittessä oleva B.40 luku: *In vitro -ihosyövyttävyys*: *ihon sähkövastusmääritystesti (TER)*.

(14) Tässä liitteessä oleva B.40 a luku: *In vitro -ihosyövyttävyys*: *Ihmisihomallitesti*.

(15) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

(16) Tässä liitteessä oleva B.47 luku: Naudan sarveiskalvon sameuden ja läpäisevyyden testimenetelmä, jolla voidaan määrittää i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta.

(17) Tässä liitteessä oleva B.48 luku: Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä, jolla tunnistetaan i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta.

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3. painos, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) YK (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). 4. tarkistettu painos. United Nations Publications.

(20) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta. Euroopan unionin virallinen lehti L 353, s. 1-1355.

(21) ECHA:n ohjeet tietovaatimuksista ja kemikaaliturvallisuusarvioinnista, R.7a luku: Päätepisteitä koskevat erityisohjeet (Endpoint specific guidance)

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

Taulukko 1

Silmävaurioiden pisteytys

Sarveiskalvo	Pisteytys
Samentuma: tiheysaste (mittausarvot otettava tiheimmästä kohdasta) (*)	
Ei haavaumia tai samentumaa	0
Yksittäisiä tai hajanaisia samentuma-alueita (muu kuin lievä normaalin kiillon himmentyminen); värikalvon yksityiskohdat selvästi nähtävissä	1
Selvästi erottuva läpinäkyvä alue; värikalvon yksityiskohdat hiukan peittyneet	2
Helmiäishohtoinen alue; värikalvon yksityiskohtia ei erotu lainkaan; pupilli tuskin erottuva	3
Samea sarveiskalvo; värikalvo ei erotu samentuman läpi	4
Suurin mahdollinen pistemäärä: 4	
Värikalvo	
Tavanomainen	0
Selvästi syventyneet poimut, verentungosta, turvotusta, keskinkertaista verekkyyttä sarveiskalvon ympärillä tai injektio; värikalvon reagoiminen valoon (viivästynyt reaktio katsotaan testiaineen vaikutukseksi	1
Verenvuoto, vakavasti tuhoutunut värikalvo tai ei reaktiota valoon	2
Suurin mahdollinen pistemäärä: 2	
Sidekalvo	
Punaisuus (viittaa luomen ja silmämunan sidekalvoon; pois lukien sarveiskalvo ja värikalvo)	
Tavanomainen	0
Joitakin hypereemisiä verisuonia (injektoitu)	1
Laajalle levinnyt helakka punaisuus; yksittäiset suonet eivät erotu selvästi	2
Laajalle levinnyt voimakas punaisuus	3
Suurin mahdollinen pistemäärä: 3	
Sidekalvopöhö	
Turvotus (viittaa luomiin ja/tai vilkkukalvoon)	
Tavanomainen	0
Hiukan normaalia enemmän turvotusta	1
Selvää turvotusta, luomet osittain kääntyneet ympäri	2
Turvotusta, luomet puoliksi muurautuneet umpeen	3
Turvotusta, luomet enemmän kuin puoliksi muurautuneet umpeen	4
Suurin mahdollinen pistemäärä: 4	

(*) Sarveiskalvosamentuman alue on mainittava.

▼**M7**

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Ei-ärsyttävä: Aineita, joita ei ole luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan I, II tai III silmää ärsyttäviksi aineiksi; tai GHS:n kategoriaan 1, 2, 2A tai 2B; tai EU-kategoriaan 1 tai 2 (17) (18) (19).

Happo-/emäsreservi: Kun kyse on happamista valmisteista, tämä on määrä (grammaa) natriumhydroksidia/100 g valmistetta, jota tarvitaan tietyn pH-arvon tuottamiseen. Kun kyse on emäksisistä valmisteista, tämä on määrä (grammaa) natriumhydroksidia, joka vastaa (grammaa) rikkihappoa/100 g valmistetta, jota tarvitaan tietyn pH-arvon tuottamiseen (Young et al. 1988).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Porrastettu menettely: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Lisätestausta ei tarvita, jos testikemikaalin ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella. Jos testikemikaalin ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Silmää syövyttävä aine: a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmään palautumatonta kudosvauriota; b) kemikaalit, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1, EPA-järjestelmän kategoriaan I silmää ärsyttäviksi aineiksi tai EU:n kategoriaan 1 (17) (18) (19).

Silmää vakavasti ärsyttävä aine: a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmälle kudosvauriota, joka ei korjaudu 21 päivän kuluessa annostelusta tai joka aiheuttaa näkökyvyn vakavaa fyysistä rappiota; b) kemikaalit, jotka on luokiteltu GHS:n kategoriaan 1 silmää ärsyttäviksi aineiksi tai EPAn kategoriaan I silmää ärsyttäviksi aineiksi tai EU:n kategoriaan 1 (17) (18) (19).

Silmää ärsyttävä aine: a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmään palautuvan muutoksen; b) kemikaalit, jotka on luokiteltu EPA-järjestelmän kategoriaan II tai III silmää ärsyttäviksi aineiksi; tai GHS:n kategoriaan 2, 2A tai 2B silmää ärsyttäviksi aineiksi; tai EU:n kategoriaan 2 (17) (18) (19).

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Todistusnäyttö (todistusnäyttöprosessi): Tiedon kokoamisen vahvuuksia ja heikkouksia käytetään perustana päättelylle, joka ei välttämättä käy ilmi yksittäisistä tiedoista.

▼M7

TESTIMENETELMÄN B.5 TÄYDENNYS ([1])

SILMÄ-ÄRSYTTÄVYYDEN JA -SYÖVYTTÄVYYDEN VAIHEITTAINEN TESTAUS

Yleisiä huomautuksia

Sekä järkevien tieteellisten menettelytapojen että eläinten hyvinvoinnin vuoksi on tärkeää välttää tarpeettomia eläinkokeita ja tehdä mahdollisimman vähän sellaisia testejä, jotka todennäköisesti aiheuttavat elämissä vakavia vasteita. Ennen *in vivo* -testin suunnittelemista on arvioitava kaikki tiedot testikemikaalin mahdollisesta silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä. Riittävät todisteet testikemikaalin silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden luokittelemiseksi voivat jo olla olemassa, jolloin koe-eläintestejä ei tarvita. Painoarvoanalyysin ja vaiheittaisen menettelyn käyttö vähentää *in vivo* -testien tarvetta, erityisesti jos on todennäköistä, että testikemikaali aiheuttaa vakavia reaktioita.

On suositeltavaa arvioida aineiden silmä-ärsyttävyydestä/-syövyttävyydestä saatavissa olevien tietojen painoarvo, jotta voidaan päättää, tarvitaanko kemikaalin silmä-ärsyttävyyspotentiaalin määrittämiseksi muita testejä kuin *in vivo* -silmätesti. Jos muita testejä tarvitaan, on suositeltavaa käyttää vaiheittaista menettelyä relevanttien koetulosten hankkimiseksi. Jos ainetta ei ole testattu aikaisemmin, vaiheittaisen menettelyn avulla voidaan hankkia silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden arviointiin tarvittavat tulokset. Tässä täydennyksessä kuvattu alkuperäinen testimenetelmä kehitettiin OECD:n työryhmässä (1). Se on vahvistettu ja laajennettu myöhemmin järjestelmässä Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, sellaisena kuin se vahvistettiin kemikaalikomitean ja kemikaalityöryhmän 28. yhteisessä kokouksessa marraskuussa 1998 (2) ja kuten OECD:n asiantuntijatyöryhmä päivitti sitä vuonna 2011.

Vaikka tämä vaiheittainen testausstrategia ei ole olennainen osa testimenetelmää B.5, siinä kuvataan suositeltavaa lähestymistapaa aineen silmä-ärsyttävyys-/-syövyttävyysominaisuuksien määrittämiseen. Tämä lähestymistapa edustaa sekä parhaita käytäntöjä että eettistä vertailukohdetta silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden *in vivo* -testauksessa. Siinä annetaan ohjeita *in vivo* -testin suorittamiseen ja esitetään yhteenveto tekijöistä, jotka on käsiteltävä ennen testin aloittamista. Strategia tarjoaa lähestymistavan aiemmin saatujen tulosten arviointiin testiaineen silmä-ärsyttävyys-/-syövyttävyysominaisuuksien selvittämiseksi, ja sen avulla voidaan vaihe vaiheelta tuottaa merkitseviä tuloksia kemikaaleista, joista tarvitaan lisätietoja tai joita ei ole aikaisemmin tutkittu. Strategiassa suositellaan myös käyttämään ensin validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro*- tai *ex vivo* -testejä ja sen jälkeen tietyissä tapauksissa testimenetelmän B.4 tutkimuksia (3) (4).

Vaiheittaisen testausstrategian kuvaus

Ennen vaiheittaiseen menettelyyn sisältyvien testien suorittamista (kaavio) on analysoitava kaikki saatavissa olevat tiedot, jotta *in vivo* -silmätestauksen tarve voidaan määrittää. Vaikka yksittäisistä parametreista (esimerkiksi äärimmäiset pH-arvot) voidaan saada merkitseviä tietoja, on syytä ottaa huomioon tulokset

([1]) Käytettäessä REACH-asetuksen mukaista silmän ärsytyksen integroitua testimenetelmää, ks. myös ECHA:n ohjeet tietovaatimuksista ja kemikaaliturvallisuusarvioinnista, R.7a luku: Päätepisteitä koskevat erityisohjeet (Endpoint specific guidance) http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

kokonaisuudessaan. Kaikkien kyseessä olevan kemikaalin tai sitä rakenteeltaan vastaavan kemikaalin vaikutustietojen painoarvo on arvioitava testauspäätöksen yhteydessä, ja päätökselle on esitettävä perustelut. Ensisijaisesti on painotettava sekä ihmis- että eläintesteillä kemikaalista aiemmin saatuja tuloksia ja seuraavaksi *in vitro*- tai *ex vivo* -testien tuloksia. Syövyttävien kemikaalien *in vivo* -testejä on vältettävä aina kun se on mahdollista. Testimenettelyssä on otettava huomioon seuraavat asiat:

Arviointi olemassa olevista ihmistä ja/tai eläintä koskevista tiedoista ja/tai *in vitro* -tiedoista validoiduissa ja kansainvälisesti hyväksytyissä menetelmissä (Vaihe 1).

Aiemmat ihmisillä saadut tulokset, esimerkiksi kliiniset tai työperäiseen altistukseen liittyvät tutkimustulokset ja tapausselostukset ja/tai eläinkokeiden tulokset silmätesteistä ja/tai *in vitro* -tiedoista validoiduissa ja kansainvälisesti hyväksytyissä silmä-ärsyttävyyttä/syövyttävyyttä koskevissa menetelmissä, on otettava ensiksi huomioon, koska niistä saadaan suoraan aineen silmävaikutuksiin liittyviä tietoja. Sen jälkeen on arvioitavia saatavissa olevat tiedot ihmisillä ja/tai eläimillä tehdyistä ihoärsyttävyys/-syövyttävyystesteistä ja/tai validoiduista ja kansainvälisesti hyväksyttävistä ihosyövyttävyyttä koskevista *in vitro* -tutkimuksista. Eläinten silmiin ei saa annostella kemikaaleja, joiden tiedetään olevan syövyttäviä tai voimakkaasti ärsyttäviä, eikä kemikaaleja, joilla on ihoa ärsyttävä/syövyttävä vaikutus; tällaisten kemikaalien voidaan katsoa vaikuttavan myös silmiin. *In vivo* -testejä ei tehdä kemikaaleista, joiden silmä-ärsyttävyys tai -syövyttävyys tiedetään, eikä aineista, joista on selvästi todistettu, etteivät ärsyttäviä tai syövyttäviä.

Rakenne-aktiivisuusanalyysi (SAR) (vaihe 2).

Jos saatavilla on rakenteellisesti samankaltaisten aineiden testituloksia, ne on otettava huomioon. Kun rakenteellisesti samankaltaisista aineista tai niitä sisältävistä seoksista on saatavilla riittävästi ihmisille tehtyjen testien ja eläinkokeiden tuloksia, jotka osoittavat niiden silmä-ärsyttävyys/-syövyttävyyspotentiaalin, voidaan olettaa, että arvioitava testikemikaali tuottaa samanlaiset vasteet. Tällaisessa tapauksessa kemikaalia ei kenties tarvitse testata. Negatiiviset tulokset rakenteellisesti samankaltaisten aineiden tai sellaisista aineista koostuvien seosten tutkimuksista eivät vaiheittaisessa menettelyssä ole riittävä todiste siitä, ettei kemikaali ole ärsyttävä tai syövyttävä. Sekä silmä- että ihoärsyttävyys ja -syövyttävyys on selvitettävä validoitujen ja hyväksyttyjen SAR-menettelytapojen avulla.

Fysikokemialliset ominaisuudet ja kemiallinen reaktiivisuus (vaihe 3).

Kemikaalilla, jolla esiintyy äärimmäisiä pH-arvoja, kuten $\leq$ 2,0 tai $\geq$ 11,5, voi olla voimakkaita paikallisvaikutuksia. Jos kemikaali määritetään silmää syövyttäväksi äärimmäisen pH-arvon perusteella, sen happo-/emäsreservi (eli puskurointikyky) voidaan myös ottaa huomioon (5) (6) (7). Jos puskurointikyky viittaa siihen, ettei kemikaali ole silmää syövyttävä (eli kemikaalit, joilla on äärimmäinen pH-arvo ja alhainen happo/emäsreservi), tämän vahvistamiseksi on tehtävä jatkotesti, jonka on ensisijaisesti oltava validoitu ja hyväksytty *in vitro*- tai *ex vivo* -testi (ks. 10 kohta).

Muiden aiempien tietojen ottaminen huomioon (vaihe 4).

Kaikki saatavissa olevat tiedot koko elimistöön ihon kautta kohdistuvasta toksisuudesta on arvioitava tässä vaiheessa. Testikemikaalin akuutti toksisuus ihon kautta saatuna on myös otettava huomioon. Jos testikemikaali on osoitettu erittäin toksiseksi ihon kautta saatuna, sitä ei kenties tarvitse testata silmille. Vaikkakaan

▼M7

akuutin ihotoksisuuden ja silmä-ärsyttävyyden/-syövyttävyyden välillä ei välttämättä ole suhdetta, voidaan olettaa, että jos aine on erittäin toksinen ihon kautta saatuna, se on erittäin toksinen myös silmään annosteltuna. Tällaiset tiedot voidaan ottaa huomioon myös vaiheiden 2 ja 3 välissä.

Kemikaalin ihosyövyttävyyden arviointi, jos sitä edellytetään myös sääntelytarkoituksiin (vaihe 5).

Ihosyövyttävyyttä ja voimakasta ärsytystä koskevaa mahdollisuutta on arvioitava ensin testimenetelmän B.4 (4) ja sen liitteen (8) mukaisesti, mukaan lukien validoidut ja kansainvälisesti hyväksytyt *in vitro* -testimenetelmät ihosyövyttävyyden toteamiseksi (9) (10) (11). Jos kemikaalin osoitetaan aiheuttavan ihon syöpymistä tai vakavaa ärsytystä, sitä on syytä pitää syövyttävänä ja silmä-ärsytystä aiheuttavana. Lisäkokeet eivät ole näin ollen tarpeen. Jos kemikaali ei ole ihoa syövyttävä tai vakavasti ärsyttävä, on tehtävä *in vivo* tai *ex vivo* -silmätesti.

In vitro- tai *ex vivo* -testien tulokset (vaihe 6).

Kemikaaleja, joilla on todettu olevan syövyttäviä tai vakavasti ärsyttäviä ominaisuuksia validoiduissa ja kansainvälisesti hyväksytyissä, nimenomaan silmä- ja ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden mittaamista varten kehitetyissä *in vitro*- tai *ex vivo* -testeissä (12) (13), ei tarvitse testata eläimillä. Voidaan olettaa, että tällaiset kemikaalit aiheuttavat samoja vaikutuksia *in vivo* -testeissä. Jos validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro*-/*ex vivo* -testejä ei ole saatavissa, vaiheet 5 ja 6 ohitetaan ja siirrytään suoraan vaiheeseen 7.

In vivo -testi kaniineilla (vaiheet 7 ja 8).

In vivo -silmätesti on aloitettava testaamalla ensin yksi eläin. Jos tämän testin tulokset osoittavat, että kemikaali on silmiä vakavasti ärsyttävä tai syövyttävä, jatkotestiä ei pidä tehdä. Jos alkutestissä ei todeta vakavasti ärsyttävää tai syövyttävää vaikutusta, ärsyttävyys tai negatiivinen vaste on vahvistettava testaamalla vielä enintään kaksi eläintä. Vahvistavan testin tuloksista riippuen voidaan tarvita täydentäviä testejä. [ks. testimenetelmä B.5].

▼M7

SILMÄ-ÄRSYTTÄVYYDEN/-SYÖVYTTÄVYYDEN TESTAUS- JA ARVIOINTIMENETTELY

	Toiminta	Havainto	Päätelmät
1	Olemassa olevat ihmistä ja/tai eläintä koskevat tiedot ja/tai *in vitro* -tiedot validoiduista ja kansainvälisesti hyväksytyistä menetelmistä, jotka osoittavat vaikutuksen silmiin	Vakavia silmävaurioita	Apikaalinen päätepiste; katsotaan, että aine syövyttää silmiä. Testiä ei tarvita.
		Silmiä ärsyttävä	Apikaalinen päätepiste; katsotaan, että aine ärsyttää silmiä. Testiä ei tarvita.
		Ei silmiä syövyttävä eikä ärsyttävä	Apikaalinen päätepiste; katsotaan, että aine ei ole silmiä syövyttävä eikä ärsyttävä. Testiä ei tarvita.
	Olemassa olevat ihmistä ja/tai eläintä koskevat tiedot ja/tai *in vitro* -tiedot validoiduista ja kansainvälisesti hyväksytyistä menetelmistä, jotka osoittavat syövyttävän vaikutuksen ihoon	Ihoa syövyttävä	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	Olemassa olevat ihmistä ja/tai eläintä koskevat tiedot ja/tai *in vitro* -tiedot validoiduista ja kansainvälisesti hyväksytyistä menetelmistä, jotka osoittavat voimakkaasti ärsyttävän vaikutuksen ihoon	Vakavaa ihoärsytystä aiheuttava	Oletetaan silmiä ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Tietoja ei saatavilla tai saatavat tiedot eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä		
	↓		
2	Suorita silmäsyövyttävyyden/-ärsyttävyyden SAR-arviointi	Ennustaa vakavia silmävaurioita	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
		Ennustaa silmä-ärsytystä	Oletetaan silmiä ärsyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	Harkitse ihoärsyttävyyden SAR-arviointia	Ennustaa ihosyövyttävyyttä	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	Ennusteita ei voida tehdä tai ennusteet ovat negatiivisia tai eivät mahdollista lopullista johtopäätöstä		
	↓		
3	Mittaa pH (puskurointikyky tarpeen mukaan)	pH ≤ 2 tai ≥ 11,5 (suuri puskurointikyky, jos relevanttia)	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Testiä ei tarvita.
	↓		
	2 < pH < 11,5, tai pH ≤ 2,0 tai ≥ 11,5 ja puskurointikyky alhainen tai olematon, jos relevanttia		
	↓		
4	Tarkastele olemassa olevia ihon kautta saatuun systeemiseen toksisuuteen liittyviä tietoja	Erittäin toksinen silmätestauksissa käytettävinä pitoisuuksina.	Kemikaali on liian toksinen testattavaksi. Testiä ei tarvita.

▼M7

	Toiminta	Havainto	Päätelmät
	↓		
	Mainittuja tietoja ei ole saatavilla tai kemikaali ei ole erittäin toksinen		
	↓		
5	Arvioi kokeellisesti ihosyövyttävyyden mahdollisuutta tässä liitteessä olevan B.4 luvun testimenetelmän mukaisesti, jos tätä tarvitaan sääntelytarkoituksiin	Syöpymisvaste tai vakava ärsytysvaste	Oletetaan silmiä syövyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓		
	Aine ei ole syövyttävä tai vakavasti ihoa ärsyttävä		
	↓		
6	Suorita validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro* tai *ex vivo* -silmätestejä.	Syöpymisvaste tai vakava ärsytysvaste	Oletetaan syövyttäväksi tai vakavasti ärsyttäväksi silmille, mikäli suoritettua testiä voidaan käyttää tunnistamaan oikein syövyttävät/vakavasti ärsyttävät kemikaalit, ja kemikaali on testin sovellusalan piirissä. Jatkotestiä ei tarvita.
		Ärsytysvaste	Oletetaan ärsyttäväksi silmille, mikäli suoritettua testiä voidaan käyttää tunnistamaan oikein syövyttävät/vakavasti ärsyttävät ja ärsyttävät kemikaalit, ja kemikaali on testin sovellusalan piirissä. Jatkotestiä ei tarvita.
		Ei-ärsyttävä vaste	Oletetaan ei-ärsyttäväksi silmille, mikäli suoritettua testiä voidaan käyttää tunnistamaan oikein ei-ärsyttävät aineet ja erottaa ne oikein kemikaaleista, jotka ovat ärsyttäviä, vakavasti ärsyttäviä tai silmää syövyttäviä aineita, ja kemikaali on testin sovellusalan piirissä. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓		
	Validoituja ja hyväksyttyjä in vitro- tai ex vivo -silmätestejä ei voida käyttää päätelmän tekemiseksi		
	↓		

▼M7

	Toiminta	Havainto	Päätelmät
7	Suorita *in vivo* -alkutesti yhdelle kaniinille silmävaikutuksen toteamiseksi	Vakavia silmävaurioita	Katsotaan silmiä syövyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
	↓		
	Ei vakavia vaurioita tai ei vastetta		
	↓		
8	Suorita vahvistustesti vielä yhdelle tai kahdelle eläimelle	Syövyttävä tai ärsyttävä	Katsotaan silmiä syövyttäväksi tai ärsyttäväksi. Jatkotestiä ei tarvita.
		Ei syövyttävä eikä ärsyttävä	Katsotaan, että aine ei ole ärsyttävä eikä syövyttävä. Jatkotestiä ei tarvita.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(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. Pidetty Solnassa, Ruotsissa, 22.–24. tammikuuta 1996 (http://www.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, marraskuu 1998 (http://www.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, s. 161–177.

(4) Tässä liitteessä oleva B.4 luku, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

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

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

(7) 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.

(8) Tässä liitteessä olevaan B.4 lukuun tehty lisäys, ihoärsyttävyyden ja -syövyttävyyden vaiheittainen tutkimusmenettely.

(9) Tässä liitteessä oleva B.40 luku, *In vitro* -ihosyövyttävyys: ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

(10) Tässä liitteessä oleva B.40 a luku, *In vitro* -ihosyövyttävyys: ihmisihomallitesti.

(11) OECD (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼**M7**

(12) Tässä liitteessä oleva B.47 luku, naudan sarveiskalvon sameutta ja läpäisevyyttä koskeva testimenetelmä silmää syövyttävien ja silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi.

(13) Tässä liitteessä oleva B.48 luku, eristettyä kanan silmää käyttävä testimenetelmä silmää syövyttävien ja silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi.

▼B

B.6. **IHON HERKISTYMINEN**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Huomautukset:

Testien herkkyys ja kyky havaita ihmisen ihoa mahdollisesti herkistäviä aineita on tärkeä kansanterveyteen liittyvän toksisuuden luokitusjärjestelmän kannalta.

Kaikkia ihmisen ihoa mahdollisesti herkistäviä aineita ei voida adekvaatisti tunnistaa millään yksittäisellä testimenetelmällä, joka myös sopisi kaikille aineille.

Sellaiset tekijät kuten aineen fysikaaliset ominaisuudet, mukaan lukien sen ihon läpäisykyky, on otettava huomioon testin valinnassa.

On kehitetty kahdentyyppisiä marsutestejä: adjuvanttityyppiset testit, joissa allergista tilaa voimistetaan liuottamalla tai suspensoimalla testiaine Freundin täydelliseen adjuvanttiin (FCA, Freunds Complete Adjuvant), ja muut kuin adjuvanttitestit.

Adjuvanttityyppiset testit todennäköisesti ennustavat aineen ihmisen ihoa mahdollisesti herkistävää vaikutusta tarkemmin kuin menetelmät, joissa ei käytetä FCA:ta, minkä vuoksi adjuvantti-tyyppisiä testejä suositaan.

Marsun maksimaatiotesti (Guinea-Pig Maximisation test, GPMT) on laajalti käytetty adjuvantti-tyyppinen testi. Vaikka aineen ihon herkistämisriski voidaan todeta useilla muillakin menetelmillä, marsun maksimaatiotesti on suositeltavin adjuvanttimenetelmistä.

Monien kemikaalien kohdalla muita kuin adjuvanttitestejä (joista suositeltavin on Buehlerin testi) pidetään vähemmän herkkinä.

Tietyissä tapauksissa voi olla perusteltua valita Buehlerin testi, jossa aine annostellaan paikallisesti eikä ihonsisäisesti kuten marsun maksimaatiotestissä. Buehlerin testin käytölle on esitettävä tieteelliset perusteet.

Marsun maksimaatiotesti ja Buehlerin testi kuvataan tässä menetelmässä. Myös muita menetelmiä voidaan käyttää edellyttäen, että ne on validoitu hyvin ja niiden käyttö on tieteellisesti perusteltua.

Jos tunnustetussa seulontatutkimuksessa saadaan positiivinen tulos, testiaine voidaan määrittää mahdollisesti herkistäväksi aineeksi eikä ole tarpeen enää tehdä marsutestiä. Jos tunnustetussa seulontatutkimuksessa saadaan negatiivinen tulos, marsutesti on tehtävä tämän testimenetelmän yhteydessä kuvattua menetelmää käyttäen.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ihon herkistyminen: (allerginen kosketusihottuma) Aineen aiheuttama immunologisesti välittyvä ihoreaktio. Ihmisellä vastereaktio voi olla kutina, punoitus, turvotus, näppylät, vesirakkulat, vesikellot tai jokin näiden yhdistelmä. Muilla eläinlajeilla reaktiot voivat olla erilaisia ja vain punoitusta ja turvotusta voi esiintyä.

lnduktioaltistus: Koehenkilön kokeellinen altistaminen testiaineelle tarkoituksena aikaansaada yliherkistymistila.

Induktiojakso: Induktioaltistusta seuraava vähintään viikon kestävä jakso, jonka aikana yliherkistymistila voi kehittyä.

Haastealtistus: Aiemmin käsitellyn koehenkilön kokeellinen altistaminen testiaineelle induktiojakson jälkeen koehenkilön mahdollisen yliherkistymisreaktion määrittämiseksi.

1.3. VERTAILUAINEET

Käytetyn koemenetelmän herkkyys ja luotettavuus tulee tutkia puolen vuoden välein aineilla, joiden tiedetään herkistävän ihoa lievästi tai kohtalaisesti.

Oikein suoritetussa adjuvanttitestissä vasteen voidaan odottaa olevan vähintään 30 % ja muussa kuin adjuvanttitestissä vähintään 15 % lievillä/kohtalaisilla herkistäjillä.

Seuraavia aineita suositellaan:

CAS-numerot	EINECS-numerot	EINECS-nimet	Geneeriset nimet
101-86-0	202-983-3	α-heksyylisinnaamialdehydi	α-heksyylisinnaamialdehydi
149-30-4	205-736-8	bentsotiatsoli-2-tioli (merkaptobentsotiatsoli)	kaptaksi
94-09-7	202-303-5	bentsokaiini	norkaiini

Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita vertailuaineita, jotka täyttävät edellä mainitut perusteet.

1.4 KOEMENETELMÄN PERIAATE

Koe-eläimet altistetaan testiaineelle aluksi ruiskuttamalla ainetta ihonsisäisesti ja/tai levittämällä sitä iholle (induktioaltistus). Lepojakson (10–14 vrk:n induktiojakso) aikana voi kehittyä immuunivaste. Lepojakson jälkeen eläimet altistetaan haasteannokselle. Haastealtistuksen testiryhmässä aiheuttamaa ihoreaktion laajuutta ja voimakkuutta verrataan verrokkieläimiin, joille annetaan induktion aikana lumekäsittely, mutta jotka saavat kuitenkin haastealtistuksen.

1.5 KOEMENETELMIEN KUVAUS

Jos testiaine on välttämättä poistettava, se tulee tehdä vedellä ja sopivalla liuottimella niin ettei saavutettu vaste muutu eikä ihon pinta rikkoonnu.

▼B

1.5.1 *Marsun maksimaatiotesti*

1.5.1.1 Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset albiinomarsut totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen testiä. Ennen testiä eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Karvat poistetaan leikkaamalla, ajelemalla tai mahdollisesti kemiallisella depilaatiolla käytetystä testimenetelmästä riippuen. Varovaisuutta on noudatettava, ettei iho naarmuunnu rikki. Eläimet punnitaan ennen testiä ja sen jälkeen.

1.5.1.2 Koeolosuhteet

1.5.1.2.1 Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytetään yleisesti käytettyjä albiinomarsun laboratoriokantoja.

1.5.1.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Testissä voidaan käyttää sekä uroksia että naaraita. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Testiryhmässä on oltava vähintään kymmenen eläintä ja verrokkiryhmässä vähintään viisi. Testeissä, joissa on käytetty alle 20 testimarsua ja alle 10 verrokkimarsua, eikä testiaineen herkistävyydestä voida tehdä johtopäätöksiä, suositellaan voimakkaasti lisätestejä siten, että testieläimiä on yhteensä vähintään 20 ja verrokkieläimiä kymmenen.

1.5.1.2.3 Annostasot

Testiaineen pitoisuus kutakin induktioaltistusta kohti tulee olla hyvin siedetty systeemisesti ja korkein mahdollinen lievän tai kohtalaisen ihoärsytyksen aiheuttamiseksi. Haastealtistuspitoisuuden tulee olla suurin ärsyttämätön annos. Mikäli on tarpeen, sopivat pitoisuudet voidaan määrittää esitutkimuksessa kahdella tai kolmella eläimellä. Tähän tarkoitukseen tulisi käyttää FCA:lla käsiteltyjä eläimiä.

1.5.1.3 Kokeen suorittaminen

1.5.1.3.1 Induktio

Päivä 0 — testiryhmä

Lapojen alueelle, jolta on poistettu karvat, pistetään kuusi ihonsisäistä 0,1 ml:n ruiskетta pareittain siten, että puolet (3) on keskiviivan vasemmalla ja puolet (3) oikealla puolella.

1. ruiske: 1:1 sekoitus (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta

2. ruiske: testiaine sopivassa vehikkelissä valitulla pitoisuudella

3. ruiske: testiaine valitulla pitoisuudella 1:1 seoksessa (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta.

Kolmannen ruiskeen vesiliukoiset aineet liuotetaan vesifaasiin ennen FCA:han sekoittamista. Rasvaliukoiset tai liukenemattomat aineet suspensoidaan FCA:han ennen vesifaasiin yhdistämistä. Testiaineen lopullisen pitoisuuden on oltava sama kuin toisessa ruiskeessa.

▼B

Ensimmäinen ja toinen ruiske pistetään lähekkäin lähimmäksi päätä. Kolmas ruiske pistetään testialueen hännänpuoleiseen osaan.

Päivä 0 — verrokkiryhmä

Kuusi ihonsisäistä 0,1 ml:n ruisketta pistetään samoihin kohtiin kuin testiryhmään kuuluville eläimille.

1. ruiske: 1:1 seos (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta

2. ruiske: laimentamatonta vehikkeliä

3. ruiske: 50-prosenttinen v/v -sekoitus vehikkeliä FCA:n ja veden tai fysiologisen keittosuolaliuoksen seoksessa suhteessa 1:1 (v/v).

Päivät 5. – 7. — testi- ja verrokkiryhmät

Jos aine on ihoa ärsyttämätön, testialuetta käsitellään noin 24 tuntia ennen paikallista induktiota karvojen huolellisen poisleikkaamisen ja/tai ajelemisen jälkeen 0,5 ml:lla 10-prosenttista natrium-lauryylisulfaatti-vaseliinia paikallisärsytyksen aiheuttamiseksi.

Päivät 6. – 8. — testiryhmä

Testialueelta poistetaan jälleen karvat. Sopivassa vehikkelissä olevalla testiaineella läpikotaisin kyllästetty suodatinpaperi (2 x 4 cm) asetetaan testialueelle ihoa vasten ja peitetään okkluusiositeellä 48 tunniksi. Vehikkelin valinta tulee perustella. Kiinteät aineet hienonnetaan ja yhdistetään sopivaan vehikkeliin. Nesteitä voidaan käyttää laimentamattomina, jos se on tarkoituksenmukaista.

Päivät 6. – 8. — verrokkiryhmä

Testialueelta poistetaan jälleen karvat. Pelkkä vehikkeli asetetaan testiaineen tavoin testialueelle ja peitetään okkluusiositeellä 48 tunniksi.

1.5.1.3.2 Haastealtistus

Päivät 20. – 22. — testi- ja verrokkiryhmät

Testi- ja verrokkieläinten kyljistä poistetaan karvapeite. Testiaineella kyllästetty lappu tai kupu asetetaan eläinten toiseen kylkeen ja tarvittaessa pelkällä vehikkelillä kyllästetty lappu tai kupu toiseen kylkeen. Lappujen annetaan olla ihoa vasten okkluusiositeen alla 24 tuntia.

1.5.1.3.3 Havainnointi ja pisteytys: testi- ja verrokkiryhmät

— noin 21 tuntia lapun poistamisen jälkeen haastealue puhdistetaan ja tarvittaessa karvat leikataan huolellisesti pois ja/tai ajellaan tai poistetaan depilaatiolla,

— noin kolme tuntia myöhemmin (noin 48 tunnin kuluttua haastealtistuksen aloittamisesta) havainnoidaan ihoreaktiota ja kirjataan se liitteen pisteytysasteikon mukaisesti,

— noin 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä havainnoinnista ihoreaktiota havainnoidaan uudestaan (72 h) ja tulokset kirjataan jälleen.

Testi- ja verrokkieläinten sokkoarviointia suositellaan.

Jos ensimmäisen haastealtistuksen tulokset vaativat selventämistä, on harkittava haastealtistuksen uusimista mahdollisesti uudella verrokkiryhmällä, jos se on tarkoituksenmukaista, noin viikon kuluttua ensimmäisestä haastealtistuksesta. Haastealtistus voidaan uusia myös alkuperäisellä verrokkiryhmällä.

▼B

Kaikki induktiosta ja haastetoimenpiteistä johtuvat ihoreaktiot ja epätavalliset löydökset, mukaan lukien systeemiset reaktiot, tulee havainnoida ja kirjata Magnusson/Kligman -pisteytysasteikon mukaan (ks. liite). Muita toimenpiteitä, esimerkiksi histopatologinen tutkimus ja ihopoimumittaus, voidaan suorittaa epäilyttävien reaktioiden selventämiseksi.

1.5.2 *Buehlerin testi*

1.5.2.1 Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset albiinomarsut totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen testiä. Ennen testiä eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Karvat poistetaan leikkaamalla, ajelemalla tai mahdollisesti kemiallisella depilaatiolla käytetystä testimenetelmästä riippuen. Varovaisuutta on noudatettava, ettei ihon pinta naarmuunnu rikki. Eläimet punnitaan ennen testiä ja sen jälkeen.

1.5.2.2 Koeolosuhteet

1.5.2.2.1 Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytetään yleisesti käytettyjä albiinomarsun laboratoriokantoja.

1.5.2.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Testissä voidaan käyttää sekä uroksia että naaraita. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Testiryhmässä on oltava vähintään 20 eläintä ja verrokkiryhmässä vähintään kymmenen.

1.5.2.2.3 Annostasot

Testiaineen pitoisuuden kutakin induktioaltistusta kohti tulee olla korkein mahdollinen lievän, mutta ei liiallisen ärsytyksen tuottamiseksi. Haastealtistuspitoisuuden tulee olla suurin ärsyttämätön annos. Mikäli on tarpeen, sopivat pitoisuudet voidaan määrittää esitutkimuksessa kahdella tai kolmella eläimellä.

Vesiliukoisten testiaineiden vehikkeliksi sopii vesi tai laimennettu ärsyttämätön pinta-aktiivinen liuos. Muiden testiaineiden vehikkeliksi suositellaan 80-prosenttista etanoli-vesiliuosta induktioon ja asetonia haastealtistukseen.

1.5.2.3 Kokeen suorittaminen

1.5.2.3.1 Induktio

Päivä 0 — testiryhmä

Eläimen toisesta kyljestä leikataan huolellisesti karvat pois. Testilapun tulee olla läpikotaisin kyllästetty sopivaan vehikkeliin (vehikkelin valinta tulee perustella; nestemäisiä testiaineita voidaan käyttää laimentamattomina, jos se on tarkoituksenmukaista) sekoitetulla testiaineella.

Testilappu asetetaan testialueelle ihoa vasten ja peitetään tiiviillä lapulla tai kuvulla ja sopivalla siteellä kuudeksi tunniksi.

▼B

Testilappujärjestelmän on oltava okklusiivinen. Tarkoitukseen sopii pyöreä tai neliskulmainen vanulappu, jonka pinta-ala on 4–6 cm^2. Tiiviyden varmistamiseen suositellaan sopivaa kiinnitysmekanismia. Kääreitä käytettäessä voidaan tarvita lisäaltistuskertoja.

Päivä 0 — verrokkiryhmä

Eläimen toisesta kyljestä leikataan huolellisesti karvat pois. Pelkkä vehikkeli asetetaan samoin kuin testiryhmässä. Testilapun annetaan olla ihoa vasten tiiviin lapun tai kuvun ja sopivan siteen alla kuusi tuntia. Jos voidaan osoittaa, ettei lumeverrokkiryhmää tarvita, voidaan käyttää käsittelemätöntä verrokkiryhmää.

Päivät 6.–8. ja 13.–15. — testi- ja verrokkiryhmät

Päivän 0 toimenpiteet tehdään samalle testialueelle (jolta poistetaan tarvittaessa karvat) eläimen samaan kylkeen päivinä 6.–8. ja uudelleen päivinä 13.–15.

1.5.2.3.2 Haastealtistus

Päivä 27.–29. — testi- ja verrokkiryhmät

Testi- ja verrokkiryhmien eläinten käsittelemättömästä kyljestä poistetaan karvat (huolellisesti leikkaamalla). Tiivis lappu tai kupu, joka sisältää sopivan määrän testiainetta korkeimpana mahdollisena ärsyttämättömänä pitoisuutena, asetetaan molempien ryhmien eläinten käsittelemättömän kyljen takaosaan.

Tarvittaessa asetetaan myös pelkkää vehikkeliä sisältävä tiivis lappu tai kupu molempien ryhmien eläinten käsittelemättömän kyljen etuosaan. Lappujen tai kupujen annetaan olla ihoa vasten sopivalla siteellä peitettyinä kuusi tuntia.

1.5.2.3.3 Havainnointi ja pisteytys

— noin 21 tuntia lapun poistamisen jälkeen haastealueelta poistetaan karvat,

— noin kolme tuntia myöhemmin (noin 30 tunnin kuluttua haastelapun asettamisesta) havainnoidaan ihoreaktioita ja kirjataan ne liitteen pisteytysasteikon mukaisesti,

— noin 24 tunnin kuluttua 30 ensimmäisen tunnin jälkeen suoritetusta havainnointikerrasta (noin 54 tuntia haastelapun asettamisesta) havainnoidaan ihoreaktioita uudelleen ja tulokset kirjataan.

Testi- ja verrokkieläinten sokkoarviointia suositellaan.

Jos ensimmäisen haastealtistuksen tulokset vaativat selventämistä, on harkittava haastealtistuksen uusimista mahdollisesti uudella verrokkiryhmällä, jos se on tarkoituksenmukaista, noin viikon kuluttua ensimmäisestä haastealtistuksesta. Haastealtistus voidaan uusia myös alkuperäisellä verrokkiryhmällä.

▼B

Kaikki induktiosta ja haastetoimenpiteistä johtuvat ihoreaktiot ja epätavalliset löydökset, mukaan lukien systeemiset reaktiot, tulee havainnoida ja kirjata Magnusson/Kligman -pisteytysasteikon mukaan (ks. liite). Muita toimenpiteitä, esimerkiksi histopatologinen tutkimus ja ihopoimumittaus, voidaan suorittaa epäilyttävien reaktioiden selventämiseksi.

2. **TULOKSET (GPMT JA BUEHLERIN TESTI)**

Yhteenveto tuloksista tulee esittää taulukossa, josta ilmenee kunkin eläimen ihoreaktiot kullakin havainnointikerralla.

3. **RAPORTOINTI (GPMT JA BUEHLERIN TESTI)**

Jos seulontatesti tehdään ennen marsutestiä, testin (esim. paikallinen imusolmuketesti, LLNA; hiiren korvan turpoamistesti, MEST) kuvaus tai viite, mukaan lukien toimenpiteen yksityiskohdat, on ilmoitettava testi- ja vertailuaineella saatujen tulosten yhteydessä.

Testiraportti (GPMT ja Buehlerin testi)

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

— käytetty marsukanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne., ja

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

— lapun asettamiskohdan valmistelumenetelmä,

— käytettyjen lappumateriaalien ja lappujen asettamismenetelmän yksityiskohdat,

— esitutkimustulokset ja niiden pohjalta tehty johtopäätös testissä käytettävistä induktio- ja haastepitoisuuksista,

— testiaineen valmistamisen, asettamisen ja poistamisen yksityiskohdat,

— vehikkelin valintaperusteet, ja

— induktio- ja haastealtistuksissa käytetyt vehikkeli- ja testiainepitoisuudet sekä induktiossa ja haastealtistuksessa käytetyn aineen kokonaismäärä.

Tulokset:

— yhteenveto tuoreimman herkkyys- ja luotettavuustarkistuksen tuloksista (ks. 1.3) mukaan lukien tiedot käytetystä aineesta, pitoisuudesta ja vehikkelistä,

▼B

— kunkin eläimen kohdalta mukaan lukien pisteytysjärjestelmä,

— selostuskuvaus havaittujen vaikutusten luonteesta ja voimakkuudesta, ja

— mahdolliset histopatologiset löydökset.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. **LÄHDELUETTELO**

Tämä menetelmä on analoginen OECD TG 406:n kanssa.

▼B

Lisäys

TAULUKKO

Magnusson/Kligman -pisteytysasteikko haastelapputestireaktioiden arvioimiseksi

0 = ei silmin havaittavia muutoksia

1 = lievä tai laikukas punoitus

2 = kohtalainen ja yhtenäinen punoitus

3 = voimakas punoitus ja turvotus

▼M4

B. 7 ORAALINEN TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS (28 PV) JYRSIJÖILLÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 407 (2008). Alkuperäinen testiohje nro 407 hyväksyttiin vuonna 1981. Vuonna 1995 hyväksyttiin tarkistettu versio, jonka tavoitteena oli saada lisätietoja tutkimuksessa käytetystä eläimestä eritoten neurotoksisuuden ja immunotoksisuuden osalta.

2. Vuonna 1998 OECD aloitti tärkeän toimenpiteen, olemassa olevien testiohjeiden uudistuksen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten (8). Osa tätä toimenpidettä oli ajantasaistaa OECD:n olemassa olevaa ohjetta ”Oraalinen toistuvan annostelun toksisuustutkimus (28 pv) jyrsijöillä” (TG 407) parametreilla, joilla voidaan havaita testikemikaalien hormonitoimintaan kohdistuva vaikutus. Tämä menettely kävi läpi laajan kansainvälisen ohjelman, jossa testattiin uusien parametrien merkityksellisyys ja käytännöllisyys, näiden parametrien suorituskyky (anti)estrogeenisia, (anti)androgeenisia ja kilpirauhasen toimintaa estäviä vaikutuksia omaaviin kemikaaleihin nähden, laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen toistettavuus sekä se, häiritsevätkö uudet parametrit ohjeen TG 407 vanhemmassa versiossa vaadittuja parametreja. Näin saatu valtava määrä tietoa on koottu yhteen ja arvioitu yksityiskohtaisesti OECD:n kattavassa raportissa (9). Tämä ajantasaistettu testimenetelmä B.7 (joka vastaa ohjetta TG 407) perustuu kansainvälisen testiohjelman aikana saatuihin kokemuksiin ja tuloksiin. Tämän testimenetelmän avulla hormonivälitteisiä vaikutuksia voidaan tarkastella muiden toksikologisten vaikutusten yhteydessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT JA RAJOITUKSET

3. Kun määritetään ja arvioidaan kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia, toistettujen annosten aiheuttama oraalinen myrkyllisyys voidaan määrittää sen jälkeen, kun akuutin myrkyllisyyden testistä on saatu alustavia tietoja myrkyllisyydestä. Tällä testimenetelmällä voidaan tutkia hyvin monenlaisia mahdollisia kohteita, joihin myrkylliset vaikutukset voivat kohdistua. Se antaa tietoa mahdollisista terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta suhteellisen lyhyen ajan kuluessa, mukaan luettuina hermostoon sekä immuuni- ja hormonijärjestelmiin kohdistuvat vaikutukset. Näiden erityisten tutkittavien ominaisuuksien osalta menetelmän avulla on voitava tunnistaa kemikaalit, jotka saattavat olla neurotoksisia, jolloin tarkemmat asiaa koskevat tutkimukset saattavat olla tarpeen, sekä kemikaalit, jotka häiritsevät kilpirauhasen fysiologiaa. Menetelmä voi myös tuottaa tietoa kemikaaleista, jotka vaikuttavat uroksen ja/tai naaraan lisääntymiselimiin nuorilla eläimillä, ja sen avulla voidaan saada myös viitteitä immunologisista vaikutuksista.

4. Tällä B.7-testimenetelmällä saatavia tuloksia on käytettävä vaarojen tunnistamisessa ja riskinarvioinnissa. Hormonitoimintaan liittyvien parametrien avulla saatuja tuloksia on tarkasteltava OECD:n asiakirjaan ”Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (11) (hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva toimintamalli) liittyvässä kontekstissa. Menetelmä koostuu tavanomaisesta toistuvan annoksen myrkyllisyystutkimuksesta, jota voidaan käyttää sellaisten kemikaalien testaamisessa, joiden osalta 90 päivän tutkimus ei ole perusteltu (kun esimerkiksi tuotantomäärä ei ylitä tiettyjä rajoja), tai pitkäaikaisen tutkimuksen esitutkimuksena. Altistuksen on kestettävä 28 päivää.

▼M4

5. Kansainvälinen ohjelma, joka koski sellaisten parametrien validointia, joiden avulla voidaan mahdollisesti havaita testikemikaalin hormonitoimintaan kohdistuva vaikutus, osoitti, että testauslaboratorion kokemus vaikuttaa suuresti testimenetelmällä B.7 saatujen tietojen laatuun. Tämä liittyy varsinkin naaraiden lisääntymiselimissä tapahtuvien syklisten muutosten histopatologiseen määrittämiseen sekä pienten hormoneista riippuvaisten elinten painon määrittämiseen, koska näitä elimiä on vaikea dissekoida. Histopatologiaa koskevia ohjeita on laadittu (19). Ne ovat saatavilla OECD:n julkisella verkkosivustolla kemikaalien testausta käsittelevässä kohdassa. Ohjeet on tarkoitettu patologeille avuksi tutkimuksiin ja määritysmenetelmän herkkyyden parantamiseen. Useiden parametrien havaittiin antavan viitteitä hormonitoimintaan liittyvästä myrkyllisyydestä, ja ne on sisällytetty testimenetelmään. Parametreja, joista oli saatavilla käyttökelpoisuuden vahvistamisen kannalta liian vähän tietoa, tai joiden kyvystä auttaa havaitsemaan hormonaalisia haitta-aineita saatiin validointiohjelmassa vain heikkoa näyttöä, ehdotetaan käytettäväksi valinnaisina päätepisteinä (katso lisäys 2).

6. Validointiprosessissa saatujen tietojen perusteella on korostettava, että tämän menetelmän herkkyys ei riitä kaikkien sellaisten aineiden tunnistamiseen, joilla on (anti)androgeenisia tai (anti)estrogeenisia vaikutustapoja (9). Testimenetelmää ei käytetä siinä elämänvaiheessa, joka on herkin hormonaalisille häiriöille. Validointiprosessin aikana testimenetelmällä tunnistettiin kuitenkin aineita, jotka vaikuttavat kilpirauhasen toimintaan heikosti ja voimakkaasti, sekä hormonitoimintaan estrogeeni- tai androgeenireseptoreiden kautta voimakkaasti tai kohtalaisesti vaikuttavia aineita, mutta useimmissa tapauksissa menetelmällä ei pystytty tunnistamaan sellaisia hormonitoimintaan vaikuttavia aineita, jotka vaikuttavat estrogeeni- tai androgeenireseptoreihin heikosti. Sitä ei siis voida pitää hormonitoimintaan kohdistuvan vaikutuksen seulontamenetelmänä.

7. Vastaavasti näihin vaikutustapoihin liittyvien vaikutusten puuttumista ei voida pitää osoituksena hormonijärjestelmään kohdistuvien vaikutusten puuttumisesta. Hormonivälitteisten vaikutusten osalta aineen luonnehdinnan ei tule sen vuoksi perustua pelkästään tällä testimenetelmällä saatuihin tuloksiin, vaan niitä tulee käyttää näyttöön perustuvan toimintatavan yhteydessä, ja siihen on sisällytettävä kaikki kemikaalista olemassa olevat tiedot, jotta mahdollista hormonitoimintaan vaikutusta voidaan luonnehtia. Tästä syystä sääntelyyn liittyvässä päätöksenteossa, joka koskee hormonitoimintaan kohdistuvia vaikutuksia (aineen luonnehdinta), on sovellettava laaja-alaista lähestymistapaa, eikä siinä tule tukeutua pelkästään tätä testimenetelmää soveltaen saatuihin tuloksiin.

8. Kaikissa eläimiin liittyvissä menettelyissä on noudatettava paikallisia eläintenhoitovaatimuksia. Jäljempänä olevat kuvaukset eläinten hoidosta ja käsittelystä ovat vähimmäisvaatimuksia, ja paikalliset määräykset ovat niihin nähden ensisijaisia, jos ne ovat tiukempia. OECD on antanut lisäohjeita eläinten humaanista käsittelystä (14).

9. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

10. Testikemikaali annostellaan useille koe-eläinryhmille suun kautta päivittäin asteittain suurenevina annoksina siten, että yksi ryhmä saa aina yhtä annostasoa 28 päivän ajan. Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin päivittäin toksisuusoireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus. Kahdenkymmenenkahdeksan päivän mittainen tutkimus antaa tietoa toistuvan oraalisen altistuksen vaikutuksesta, ja siitä voidaan myös saada viitteitä pitempiaikaisten tutkimusten

▼M4

tarpeesta. Lisäksi tutkimus voi antaa tietoa pitoisuuksien valinnasta pitkäaikaisia tutkimuksia varten. Testimenetelmän avulla saatujen tietojen perusteella tulisi voida luonnehtia testikemikaalin myrkyllisyyttä, jotta annos-vastesuhde ja taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL), voidaan määrittää.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

11. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää. Jos tässä testimenetelmässä B.7 määritettyjä parametreja tutkitaan muilla jyrsijöillä, on esitettävä yksityiskohtainen perustelu. Vaikka on biologisesti todennäköistä, että muut lajit reagoivat myrkkyihin samalla tavoin kuin rotta, pienempien lajien käyttö voi kuitenkin lisätä vaihtelua pienempien elinten dissekoimiseen liittyvien teknisten haasteiden vuoksi. Kansainvälisessä validointiohjelmassa, jossa tutkittiin hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemista, rotta oli ainoa käytetty laji. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Annostelun tulee alkaa mahdollisimman pian vieroituksen jälkeen ja ainakin ennen yhdeksättä elinviikkoa. Käytettävien eläinten paino ei saisi juurikaan vaihdella eikä ylittää ± 20:tä prosenttia kummankaan sukupuolen keskipainosta kokeen alussa. Mikäli toistuvan oraalisen annostelun tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, molemmissa tutkimuksissa tulee mieluiten käyttää samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

12. Kaikissa menettelyissä on noudatettava laboratorioeläinten hoitoa koskevia paikallisia vaatimuksia. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testiaineen ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna. Eläimet voidaan pitää häkeissä muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä tai yksittäin, jos se on tieteellisesti perusteltua. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä.

13. Eläinten ravinto on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta. Näyte ruokavaliosta on säilytettävä siihen saakka, kunnes tutkimusraportti on valmis.

Eläinten valmistelu

14. Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaisesti testi- ja verrokkiryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti, ja ne pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Annosten valmistelu

15. Testikemikaali annetaan ruokintaletkulla tai ruoan tai juomaveden kautta. Oraalisen annostelun menetelmä määräytyy tutkimuksen tarkoituksen sekä testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ja toksikokineettisten ominaisuuksien mukaan.

▼M4

16. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkkyominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiliteetti kantaja-aineessa on määritettävä.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

17. Kutakin annostasoa tulee testata vähintään kymmenellä eläimellä (viisi naarasta ja viisi urosta). Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken kokeen, eläinten määrää tulee lisätä saman verran kuin niitä aiotaan lopettaa ennen kokeen päättymistä. Myös ylimääräisen, kymmenestä eläimestä (viisi kumpaakin sukupuolta) koostuvan satelliittiryhmän käyttöä voidaan harkita verrokkiryhmässä ja suurimman annoksen ryhmässä, jotta toksisten vaikutusten korjaantuvuutta, jatkuvuutta ja ilmenemisen viivästymistä voidaan havainnoida vähintään 14 päivän ajan käsittelyn jälkeen.

Annostelu

18. Yleensä tulee käyttää vähintään kolmea testiryhmää ja yhtä verrokkiryhmää, mutta jos vaikutuksia ei muiden tietojen arvioinnin perusteella ole odotettavissa toistetulla vuorokausiannoksella 1 000 mg/kg, voidaan tehdä raja-annostesti. Jos sopivia tietoja ei ole saatavilla, voidaan tehdä annosalueen haarukointitesti (samaa sukupuolta ja samasta lähteestä olevia eläimiä käyttäen) käytettävien annosten määrittämisen helpottamiseksi. Testiaineen annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testiaineen annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

19. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki testikemikaaleista tai samankaltaisista kemikaaleista saatavilla olevat aiemmin saadut toksisuus- ja kinetiikkatiedot. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa toksisia vaikutuksia mutta ei kuolemaa tai vakavia kärsimyksiä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla (NOAEL). Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin 10-kertaisia).

20. Jos havaitaan yleisiä myrkyllisyysvaikutuksia (kuten ruumiinpainon pienenemistä, maksaan, sydämeen, keuhkoihin tai munuaisiin kohdistuvia vaikutuksia jne.) tai muita muutoksia, jotka eivät ole välttämättä toksisia (esimerkiksi ravinnonoton vähentymistä, maksan suurenemista), immuunijärjestelmän, hermoston tai hormonitoiminnan kannalta herkkiin tutkittaviin ominaisuuksiin kohdistuvia vaikutuksia on tulkittava varovaisesti.

Rajatesti

21. Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg painokiloa kohti / vrk tai jota annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna vastaava prosenttiosuus (painomääritysten perusteella), tehdyssä testissä, joka on tehty tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita myrkyllisiä vaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla kemikaaleilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

▼M4

Antotapa

22. Eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 28 vuorokauden ajan. Jos testikemikaali annetaan ruokintaletkun kautta, se on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Muutoin testitilavuuden vaihtelu tulee minimoida pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla voidaan käyttää tilavuudeltaan samaa nestemäärää.

23. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annostaso; käytetty tapa on mainittava. Jos kemikaali annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava tarvittaessa siten, että annostaso pysyy samana eläimen ruumiinpainoon nähden. Mikäli toistuvan annostelun tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, kummassakin tutkimuksessa on käytettävä samanlaista ruokavaliota.

Havainnot

24. Havainnointijakson on kestettävä 28 päivää. Seurantahavainnointiin tarkoitettuja satelliittiryhmän eläimiä tulisi pitää vähintään 14 päivää ilman annostelua, jotta viivästyneet toksiset vaikutukset, niiden jatkuminen tai niistä toipuminen voidaan todeta.

25. Eläimestä on tehtävä kliinisiä yleishavaintoja vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä ja ottaen huomioon, että odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Eläinten vointi on kirjattava. Eläinten sairastavuus ja kuolleisuus tarkistetaan vähintään kahdesti päivässä.

26. Kutakin eläintä on havainnoitava kliinisesti seikkaperäisesti kerran ennen ensimmäistä altistuskertaa (samaa koe-eläintä koskevia vertailuja varten) ja sen jälkeen vähintään kerran viikossa. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella vakioalueella mieluiten samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. Vaihtelut koeolosuhteissa on pyrittävä minimoimaan ja havainnoijien on mieluiten oltava annostelusta tietämättömiä henkilöitä. Huomiota tulee kiinnittää mm. ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, mahdollisten sisäeritteiden ja kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, hengitys) muutoksiin. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esim. ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esim. itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (2).

27. Neljännellä altistusviikolla arvioidaan aistien reaktiivisuutta erityyppisille ärsykkeille (2) (esim. kuulo, näkö ja asentotunto) (3) (4) (5), tarttumaotteen voimakkuutta (6) ja motorista toimintaa (7). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittausten mukaisia toimenpiteitä voidaan käyttää.

▼M4

28. Toiminnallisia havaintoja ei tarvitse tehdä neljännellä altistusviikolla, jos kyseessä on subkroonisen (90 päivän) tutkimuksen esitutkimus. Tällöin toiminnalliset havainnot tehdään seurantatutkimuksessa. Toisaalta toistuvan annostelun tutkimuksesta saatavat toiminnallisia havaintoja koskevat tiedot voivat helpottaa annostasojen valintaa subkroonista tutkimusta varten.

29. Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei myöskään tarvitse tehdä ryhmillä, joissa muutoin ilmenee merkkejä myrkyllisyydestä laajuudessa, joka häiritsisi merkitsevästi toiminnallisten kokeiden suorittamista.

30. Ruumiinavauksen yhteydessä kaikkien naaraiden kiimasykli voidaan määrittää (valinnaisesti) ottamalla niiltä irtosolunäytteet. Näistä havainnoista saadaan tietoa kiimasyklin vaiheesta eläimen lopettamisen ajankohtana, ja niistä on myös apua estrogeeniherkkien kudosten histologisessa arvioinnissa [katso histopatologiaa koskevat ohjeet (19)].

Ruumiinpaino ja ravinnon/veden kulutus

31. Kukin eläin on punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnon kulutus on mitattava vähintään viikoittain. Jos testikemikaali annostellaan juomavedessä, myös veden kulutus on mitattava vähintään viikoittain.

Hematologia

32. Seuraavat verikokeet on tehtävä koejakson päätyttyä: hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, retikulosyytit, leukosyyttien kokonaismäärä ja erittelylaskenta, trombosyyttien määrä ja veren hyytymisajan/-potentiaalin mittaus. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalilla tai sen oletetuilla metaboliiteilla on tai epäillään olevan hapettavia ominaisuuksia, ovat methemoglobiinipitoisuus ja Heinzin kappaleet.

33. Verinäytteet tulee ottaa nimetystä kohdasta juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Näytteet tulee säilyttää asianmukaisissa olosuhteissa. Eläinten ruokintaa on siirrettävä lopettamista edeltävän yön yli ([1]).

Kliininen biokemia

34. Kliiniset biokemialliset määritykset tärkeimpien toksisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan kustakin eläimestä juuri ennen lopettamista tai sen yhteydessä (lukuun ottamatta eläimiä, jotka on löydetty kuolemaisillaan ja/tai lopetettu kesken kokeen). Plasma- ja seerumikokeiden tulee kattaa natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, kreatiniini, kokonaisproteiini ja albumiini, vähintään kaksi hepatosellulaarisia vaikutuksia osoittavaa entsyymiä (kuten alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitranspeptidaasi ja glutamaattidehydrotenaasi) ja sappihapot. Muiden entsyymien (maksasta tai muualta peräisin olevien) ja bilirubiinin mittauksista voidaan saada hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa.

35. Vaihtoehtoisesti voidaan tehdä seuraavat virtsa-analyysit viimeisellä tutkimusviikolla ajastetun virtsankeräyksen avulla: ulkonäkö, määrä, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH-arvo, proteiini, glukoosi ja veri/verisolut.

([1]) Ruokinnan siirtämistä yön yli suositellaan monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksissa. Tärkein syy tälle suositukselle on se, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta ruokinnan siirtäminen yön yli voi häiritä eläinten yleistä metaboliaa ja etenkin ruokintatutkimuksissa päivittäistä altistusta testikemikaalille. Jos eläimen ruokinta siirretään yli yön, kliiniset biokemialliset mittaukset tulee tehdä neljännellä tutkimusviikolla suoritettavien toiminnallisten havaintojen jälkeen.

▼M4

36. Lisäksi tulee tutkia, esiintyykö seerumissa yleisiä kudosvaurioita osoittavia merkkiaineita. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalin tunnetut ominaisuudet voivat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan siihen liittyviin metaboliaprofiileihin, ovat kalsium, fosfaatti, triglyseridit, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliiniesteraasi. Nämä on selvitettävä tiettyjen luokkien aineista tai tapauskohtaisesti.

37. Vaikka hormonitoimintaan liittyvien tutkittavien ominaisuuksien kansainvälisessä arvioinnissa ei voitu osoittaa, että kilpirauhashormonien (T3, T4) ja TSH:n määrittämisestä olisi selvää hyötyä, plasma- ja seeruminäytteet kannattaa kuitenkin säilyttää T3- ja T4-arvojen sekä TSH-arvon (valinnainen) mittaamista varten, jos näyttää siltä, että kemikaali vaikuttaa aivolisäke-kilpirauhasakseliin. Nämä näytteet voidaan pakastaa –20 °C:ssa säilytystä varten. Seuraavat seikat saattavat vaikuttaa hormonimääritysten vaihteluun ja absoluuttisiin pitoisuuksiin:

— lopettamisaika hormonipitoisuuksien vuorokausivaihtelun takia

— lopettamistapa, jotta vältetään aiheuttamasta eläimille turhaa stressiä, joka voi vaikuttaa hormonipitoisuuksiin

— hormonimääritysten testipaketit, joiden standardikäyrät voivat vaihdella.

Kilpirauhaseen vaikuttavat kemikaalit tunnistetaan varmemmin ja luotettavammin käyttämällä hormonipitoisuuksien sijasta mieluummin histopatologista analyysia.

38. Plasmanäytteet, jotka on nimenomaisesti tarkoitettu hormonimäärityksiin, on otettava samaan aikaan päivästä. On suositeltavaa harkita T3-, T4- ja THS-määrityksiä, jos kilpirauhasen histopatologiset muutokset antavat siihen aihetta. Hormonipitoisuuksien analysoimisesta saadaan toisenlaisia numeerisia arvoja kuin erilaisten kaupallisten testipakettien avulla. Näin ollen yhtenäisiin aiempiin tietoihin perustuvia vaatimuksia ei voida välttämättä laatia. Vaihtoehtoisesti laboratorioiden on pyrittävä pitämään variaatiokertoimet T3:n ja T4:n osalta pienempinä kuin 25 ja TSH:n osalta pienempänä kuin 35. Kaikki pitoisuudet on kirjattava käyttäen yksikköä ng/ml.

39. Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömiä, hematologiset ja kliiniset biokemialliset muuttujat on määritettävä ennen annostelun aloittamista tai mieluiten ryhmässä eläimiä, jotka eivät kuulu koeryhmiin.

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

40. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta lopetettuja) maksa, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat kokonaisuudessaan, kateenkorva, perna, aivot ja sydän on puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne on punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi. Eturauhaskokonaisuuden puhdistamisessa on oltava huolellinen, jotta nestettä sisältävät rakkularauhaset eivät puhkea. Rakkularauhaset ja eturauhanen voidaan puhdistaa ja punnita myös kiinnittämisen jälkeen.

▼M4

41. Lisäksi voidaan valinnaisesti punnita kaksi muuta kudosta mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi: munasarjat (märkäpaino), kohtu ja kohdunkaula (ohjeita kohtukudosten irrottamisesta ja valmistelusta punnitusta varten on OECD:n ohjeessa TG 440 (18)).

42. Kilpirauhasen paino (valinnainen) voidaan määrittää kiinnittämisen jälkeen. Puhdistus on tehtävä hyvin varovasti ja vasta kiinnittämisen jälkeen kudosvaurioiden välttämiseksi. Kudosvauriot voivat haitata histopatologista analyysia.

43. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (katso 47 kohta): kaikki silmin havaittavat vauriot, aivot (edustavat alueet, mukaan lukien iso- ja pikkuaivot ja aivosilta), selkäydin, mahalaukku, ohutsuoli, paksusuoli (mukaan lukien Peyerin levyt), maksa, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, kateenkorva, kilpirauhanen, henkitorvi ja keuhkot (säilytetään puhaltamalla keuhkot täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla ne sitten kiinnitysaineeseen), sukurauhaset (kivekset ja munasarjat), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, eturauhanen ja rakkularauhanen sekä niiden etuosat), vagina, virtsarakko, imusolmukkeet [proksimaalisimman imusolmukkeen lisäksi on otettava vielä toinen imusolmuke laboratorion kokemuksen perusteella (15)], ääreishermo (lonkka- tai säärihermo) mieluiten läheltä lihasta, luurankolihas ja luu sekä osa luuydintä (tai vaihtoehtoisesti tuore luuydinaspiraatti). Kivekset suositellaan kiinnitettävän upottamalla ne Bouinin tai muunneltuun Davidsonin kiinnitysaineeseen (16) (17). Tunica albugineaan on tehtävä varovasti pieni reikä neulalla elimen molempiin päihin, jotta kiinnitysaine pääsee tunkeutumaan sisään nopeasti. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä.

44. Seuraavista kudoksista voi löytyä tärkeitä merkkejä hormonitoimintaan liittyvistä vaikutuksista: sukurauhaset (munasarjat ja kivekset), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, rakkularauhanen ja sen etuosa, dorsolateraalinen ja ventraalinen eturauhanen), vagina, aivolisäke, uroksen rintarauhanen sekä kilpirauhanen ja lisämunuainen. Uroksen rintarauhasten muutoksia ei ole dokumentoitu riittävästi, mutta tämä parametri voi olla hyvin herkkä aineille, joilla on estrogeenisia vaikutuksia. Niiden elinten/kudosten, joita ei ole lueteltu 43 kohdassa, havainnointi ei ole pakollista (katso lisäys 2).

45. Histopatologiaa koskevissa ohjeissa (19) on tarkempia tietoja endokriinisten kudosten dissektiosta, kiinnittämisestä, mikrotomiasta ja histopatologiasta.

46. Kansainvälisestä testiohjelmasta saatiin jonkin verran näyttöä siitä, että sellaisten kemikaalien, jotka vaikuttavat sukupuolihormonien tasapainoon vain vähän, lievät hormonitoimintaan kohdistuvat vaikutukset voidaan tunnistaa kiimasyklin synkronoinnin häiriintymisestä eri kudoksissa eikä niinkään suoraan naaraan sukupuolielinten histopatologisista muutoksista. Vaikkei tällaisista vaikutuksista saatu varmoja todisteita, on suositeltavaa ottaa huomioon todisteet kiimasyklin epäsynkroniasta, kun tulkitaan munasarjojen (follikkeli-, teeka- ja granuloosasolut), kohdun, kohdunkaulan ja vaginan histopatologiaa. Jos syklin vaihe on arvioitu vaginan irtosolunäytteestä, myös tämä tieto voidaan sisällyttää tähän vertailuun.

▼M4

Histopatologia

47. Kaikkien verrokkien ja suuriannoksiseen ryhmään kuuluneiden eläinten säilytetyt elimet ja kudokset tutkitaan perusteellisesti histopatologisesti. Histopatologiset tutkimukset tulee tehdä myös kaikille muiden annostusryhmien eläimille, jos käsittelyyn liittyviä muutoksia havaitaan suuren annoksen ryhmässä.

48. Kaikki silmin havaittavat vauriot on tutkittava.

49. Mahdolliseen satelliittiryhmään kuuluvilta eläimiltä tulee tutkia histopatologisesti sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

50. Koetulokset tulee esittää yksilöidysti. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin koeryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen toksisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin.

51. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Verrattaessa vaikutusta pitoisuusalueen mukaan on vältettävä monien t-testien käyttöä. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimusasetelman suunnitteluvaiheessa.

52. Laadunvalvontaa varten on suositeltavaa kerätä vertailutietoja aiemmista tutkimuksista ja laskea vaihtelukertoimista numeeriset tiedot varsinkin sellaisista parametreista, jotka liittyvät hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseen. Näitä tietoja voidaan käyttää vertailutarkoituksiin, kun varsinaisia tutkimuksia arvioidaan.

Testiraportti

53. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa

— lajin valinnan perustelut, jos se on muu kuin rotta.

Testiolosuhteet:

— annostason valintaperustelut

— yksityiskohdat testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta, sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

▼**M4**

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— ravinnossa/juomavedessä olevan testikemikaalin määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Valinnaiset tutkitut ominaisuudet

— luettelo valinnaisista ominaisuuksista, jotka on tutkittu.

Tulokset:

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon ja tarvittaessa veden kulutus

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, mukaan lukien toksisuusoireet

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)

— arvioinnit aistitoiminnoista, tarttumaotteen voimakkuudesta ja motorisesta toiminnasta

— verikokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— kliiniset biokemialliset kokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— ruumiinpaino eläimen lopettamisen yhteydessä ja eri elinten painotiedot

— ruumiinavauslöydökset

— kaikkien histopatologisten löydösten seikkaperäinen kuvaus

— tiedot imeytymisestä, mikäli saatavilla

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

▼M4

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Androgeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) tavoin.

Annos on annetun testikemikaalin määrä. Annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg päivässä) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina (ppm).

Annostelu on yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

Antiandrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Antiestrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Estrogeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) tavoin.

Ilmeinen toksisuus on yleistermi, jolla tarkoitetaan testikemikaalin antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden oireita. Niitä on oltava riittävästi vaaran arviointia varten, ja niiden on oltava sellaisia, että annetun annoksen suurentamisen voidaan odottaa aiheuttavan vakavia merkkejä myrkyllisyydestä ja todennäköisesti kuolleisuutta.

Kilpirauhasen kaltainen vaikutus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) tavoin.

Kilpirauhasen toimintaa estävä vaikutus on kemikaalin kyky estää luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

NOAEL on lyhennys englanninkielisistä sanoista no-observed-adverse-effect level (taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta). Se on siis suurin annos, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Validointi on tieteellinen menettely, jonka tarkoituksena on luonnehtia testimenetelmän toiminnallisia vaatimuksia ja rajoituksia sekä osoittaa sen luotettavuus ja merkityksellisyys tiettyyn tarkoitukseen nähden.

▼M4

Lisäys 2

Testimenetelmässä B.7 tutkittavat ominaisuudet hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseksi

Pakolliset tutkittavat kohteet	Valinnaiset tutkittavat kohteet
Paino	
— Kivekset	— Munasarja
— Lisäkivekset	— Kohtu ja kohdunkaula
— Lisämunuaiset	— Kilpirauhanen
— Eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat	
Histopatologia	
— Sukupuolirauhaset:	— Vaginan irtosolunäytteet
— Kivekset	— Urosten maitorauhaset
— Munasarjat	— Aivolisäke
— Lisäsukupuolirauhaset:	
— Lisäkivekset	
— Eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat	
— Kohtu ja kohdunkaula	
— Lisämunuaiset	
— Kilpirauhanen	
— Vagina	
Hormonimääritys	
	— T3- ja T4-hormonien pitoisuus verenkierrossa
	— TSH-hormonin pitoisuus verenkierrossa

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691–704.

5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

▼M4

7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404–407.

16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, s. 52–85.

17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524–533.

18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8 SUBAKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 28 PÄIVÄN TUTKIMUS

TIIVISTELMÄ

Tämän tarkistetun testimenetelmän B.8 tarkoituksena on luonnehtia kokonaisvaltaisesti testikemikaalin myrkyllisyyttä hengitettynä toistuvan altistuksen jälkeen tietyllä ajanjaksolla (28 päivää) ja tuottaa tietoa määrällistä riskinarviointia varten. Jyrsijäryhmät, joissa on vähintään viisi urosta ja viisi naarasta, altistetaan kuuden tunnin ajan päivittäin 28 päivän ajan a) testikemikaalille kolmella tai useammalla pitoisuudella, b) suodatetulle ilmalle (negatiivinen kontrolli) ja/tai kantaja-aineelle (kantaja-ainekontrolli). Eläimiä altistetaan yleensä viitenä päivänä viikossa, mutta myös seitsemän päivän altistus viikossa on mahdollista. Sekä uroksia että naaraita testataan aina, mutta ne voidaan altistaa eri pitoisuuksille, jos jommankumman tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille. Tässä menetelmässä tutkimuksen johtajalla on mahdollisuus sisällyttää tutkimukseen satelliittiryhmiä (vaikutusten korjaantuvuus), bronkoalveolaarinen huuhtelu (BAL), neurologisia testejä sekä muita kliiniskemiallisia ja histopatologisia arviointeja, jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia paremmin.

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 412 (2009). Alkuperäinen subakuuttia inhalaatiotestiä koskeva testiohje nro 412 (TG 412) hyväksyttiin vuonna 1981. Tätä testimenetelmää B.8 (joka vastaa tarkistettua ohjetta TG 412) on ajantasaistettu, jotta tieteellinen kehitys voidaan ottaa huomioon ja jotta nykyiset ja tulevat sääntelyvaatimukset voidaan täyttää.

2. Tämän menetelmän avulla voidaan luonnehtia haittavaikutuksia, joita seuraa toistuvasta altistumisesta testikemikaalille päivittäin hengityksen kautta 28 päivän ajan. Tietoja, jotka saadaan 28 päivän mittaisista, subakuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevista tutkimuksista, voidaan käyttää määrällisissä riskinarvioinneissa [jos niiden jälkeen ei tehdä 90 päivän tutkimusta subkroonisesta myrkyllisyydestä hengitettynä (tämän liitteen luku B.29)]. Tiedoista voi olla apua myös valittaessa pitoisuuksia pitkäkestoisempiin tutkimuksiin, kuten 90 päivän tutkimukseen, jossa tarkastellaan subkroonista myrkyllisyyttä hengitettynä. Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALUSTAVAT HUOMIOT

3. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tietoihin, joista voi olla apua asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa olevat käytöt ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista sekä akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevista testeistä saadut tulokset. Jos oletetaan tai havaitaan, että tutkimuksen aikana ilmenee neurotoksisuutta, tutkimuksen johtaja voi sisällyttää tutkimukseen asianmukaisia arviointeja, kuten toiminnallisen havaintosarjan (FOB:n) ja motorisen aktiivisuuden mittauksen. Vaikka altistuksen ajoitus voi olla kriittinen tietyissä tutkimuksissa, näiden ylimääräisten toimien toteuttaminen ei saa häiritä perustutkimuksen rakennetta.

▼M4

4. Syövyttävien tai ärsyttävien testikemikaalien laimennoksia voidaan testata sellaisina pitoisuuksina, joilla saadaan aikaan haluttu myrkyllisyyden aste [katso GD 39 (2)]. Kun eläimiä altistetaan näille materiaaleille, tavoitepitoisuuksien on oltava riittävän pienet, jotta eläimille ei aiheudu suurta kipua ja stressiä, mutta kuitenkin tarpeeksi suuret, jotta pitoisuus-vastekäyrä on riittävä sääntelyyn liittyvien ja tieteellisten testaustavoitteiden saavuttamiseksi. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja niiden tulee ensisijaisesti perustua asianmukaisesti suunniteltuun annosalueen määritystestiin, josta saadaan tietoa kriittisestä tutkittavasta ominaisuudesta, ärsytysrajasta ja oireiden alkamisajankohdasta (katso 11–13 kohta). Pitoisuuden valinnalle on esitettävä perusteet.

5. Kuolemaisillaan olevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti. Kuolemaisillaan olevia eläimiä käsitellään samalla tavalla kuin eläimiä, jotka kuolevat testissä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

6. Kokeessa tulee käyttää terveitä nuoria täysikasvuisia jyrsijöitä, jotka kuuluvat yleisesti käytettyihin koe-eläinkantoihin. Suositeltavin laji on rotta. Jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

7. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Satunnaistamispäivänä eläinten on oltava nuoria ja täysikasvuisia, ja niiden iän on oltava 7–9 viikkoa. Ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Eläinten hoito

8. Eläimet on voitava erottaa toisistaan esimerkiksi ihon alle asennettavien lähettimien avulla havainnoinnin helpottamiseksi ja sekaannuksien välttämiseksi. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

▼M4

Inhalaatiokammiot

9. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistustapa on vain nasaalisesti (nose-only; tähän termiin kuuluvat altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti -altistuksen ja koko kehoon kohdistuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET

Rajapitoisuudet

10. Toisin kuin akuuteissa tutkimuksissa, 28 päivän subakuuteissa tutkimuksissa, joissa tarkastellaan myrkyllisyyttä hengitettynä, ei ole määritettyjä rajapitoisuuksia. Testatun enimmäispitoisuuden osalta on otettava huomioon seuraavat seikat: 1) suurin mahdollinen pitoisuus, 2) ihmisen altistustaso pahimmassa tapauksessa, 3) tarve ylläpitää riittävä hapensyöttö ja/tai 4) eläinten hyvinvointiin liittyvät seikat. Koska tietoon perustuvia rajoja ei siis ole, voidaan käyttää asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (13) mukaisia akuutteja rajoja (ts. enimmäispitoisuus aerosolien osalta on 5 mg/l, höyryjen osalta 20 mg/l ja kaasujen osalta 20 000 ppm), ks. GD 39 (2). Jos nämä rajat täytyy ylittää esimerkiksi testattaessa kaasuja tai erittäin haihtuvia testikemikaaleja (esimerkiksi jäähdytysaineita), sille on esitettävä perustelut. Rajapitoisuudella on saatava aikaan selvä myrkyllisyys, joka ei saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

Annosalueen määritystutkimus

11. Ennen päätutkimuksen aloittamista voi olla tarpeen tehdä annosalueen määritystutkimus. Annosalueen määritystutkimus on esikoetta kattavampi, koska sitä ei ole rajattu pitoisuuden valintaan. Annosalueen määritystutkimuksesta karttunut tieto voi edistää päätutkimuksen onnistumista. Annosalueen määritystutkimuksesta voidaan saada esimerkiksi teknistä tietoa analyysimenetelmistä, hiukkasten koosta, toksisten mekanismien löytämisestä, kliinisestä patologiasta ja histopatologiasta, ja sen avulla voidaan arvioida, mitkä ovat päätutkimuksen NOAEL- ja MTC-pitoisuudet. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa annosalueen määritystutkimuksen, jotta tiedetään, mikä on hengityselimistöä ärsyttävä pitoisuus (esimerkiksi hengityselimistön histopatologia, keuhkojen toiminnan testaus tai bronkoalveolaarinen huuhtelu), mikä on siedettävän pitoisuuden yläraja, joka ei aiheuta eläimille tarpeetonta stressiä, ja millä parametreilla testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia parhaiten.

12. Annosalueen määritystutkimuksessa voi olla yksi tai useampi pitoisuustaso. Kullekin pitoisuustasolle saa altistaa enintään kolme urosta ja kolme naarasta. Annosalueen määritystutkimuksen on kestettävä vähintään viisi päivää, yleensä ei enempää kuin 14 päivää. Tutkimusraportissa on esitettävä perustelut päätutkimuksen pitoisuuksien valinnalle. Päätutkimuksen tavoite on osoittaa sellainen pitoisuus-vastesuhde, joka perustuu herkimmäksi oletettuun tutkittavaan ominaisuuteen. Pienen pitoisuuden on mielellään oltava sellainen, joka ei aiheuta havaittavia haittavaikutuksia, kun taas suuren pitoisuuden on aiheutettava selvä myrkyllisyys, joka ei kuitenkaan saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

▼M4

13. Kun valitaan annosalueen määritystutkimuksen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös rakenne-aktiivisuussuhdetta koskevia tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja (katso 3 kohta). Annosalueen määritystutkimuksessa voidaan vahvistaa tai kumota se, mitä pidetään herkimpänä mekanistisesti perusteltuna tutkittavana ominaisuutena, esimerkiksi koliiniesteraasin esto organofosfaateilla, methemoglobiinin muodostus erytrosytotoksisilla aineilla, kilpirauhashormonit (T_3, T_4) kilpirauhaselle myrkyllisillä aineilla sekä proteiini, LDH tai neutrofiilit bronkoalveolaarisessa huuhtelussa vaarattomilla huonosti liukenevilla hiukkasilla tai keuhkoja ärsyttävillä aerosoleilla.

Päätutkimus

14. Subakuuttia myrkyllisyyttä koskeva päätutkimus sisältää yleensä kolme pitoisuustasoa ja tarvittaessa myös samanaikaiset negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän ja/tai kantaja-aineverrokkiryhmän (katso 17 kohta). Asianmukaisten altistustasojen valinnassa on käytettävä apuna kaikkia saatavilla olevia tietoja, mukaan luettuina tulokset systeemisistä myrkyllisyystutkimuksista sekä metabolia ja kinetiikka (erityisesti on pyrittävä välttämään suuria pitoisuuksia, joiden vuoksi kineettiset prosessit saturoituvat). Jokainen testiryhmä sisältää vähintään 10 jyrsijää (viisi urosta ja viisi naarasta), jotka altistetaan testikemikaalille kuuden tunnin ajaksi päivittäin viitenä päivänä viikossa neljän viikon ajanjaksolla (tutkimuksen kokonaiskesto on 28 päivää). Eläimet voidaan altistaa myös seitsemänä päivänä viikossa (esimerkiksi testattaessa inhaloitavia lääkkeitä). Jos jommankumman sukupuolen tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille, sukupuolet voidaan altistaa eri pitoisuuksille pitoisuus-vasteen optimoimiseksi 15 kohdassa kuvatun mukaisesti. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoja voidaan mukauttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Perustelut on esitettävä, jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä tai jos on toteutettava pitkäkestoinen (esimerkiksi 22 tuntia/päivä) koko kehoon kohdistuvan altistuksen tutkimus [katso GD 39 (2)]. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana, paitsi jos altistus kestää yli kuusi tuntia. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

15. Valituilla tavoitepitoisuuksilla tulee voida tunnistaa kohde-elin (-elimet) ja osoittaa selvä pitoisuus-vaste:

— Suurimman pitoisuuden tulee aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia, mutta ne eivät saa lievittyä tai aiheuttaa kuolleisuutta, koska se estää mielekkään arvioinnin.

— Keskisuuri pitoisuus (keskisuuret pitoisuudet) on valittava siten, että myrkylliset vaikutukset porrastuvat pienimmän ja suurimman pitoisuuden välille.

— Pienimmän pitoisuuden tulee aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan oireita myrkyllisyydestä.

Satelliittitutkimus (vaikutusten korjaantuvuus)

16. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) avulla voidaan tarkkailla myrkytysoireiden korjaantuvuutta, pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö viivästyneitä myrkytysoireita käsittelyn jälkeisellä jaksolla, jonka on oltava riittävän pitkä, vähintään kuitenkin 14 päivää. Satelliittiryhmissä (korjaantuvuusryhmissä) on viisi urosta ja viisi naarasta, jotka altistetaan samaan aikaan kuin päätutkimuksen koe-eläimet. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) ryhmät on altistettava testikemikaalille suurimmalla pitoisuudella, ja tarvittaessa tutkimuksissa on oltava rinnakkaiset ilma- ja/tai kantaja-aineverrokit (katso 17 kohta).

▼M4

Verrokkieläimet

17. Rinnakkaisryhmien negatiivisia (ilma)verrokkieläimiä on käsiteltävä samalla tavalla kuin testiryhmän eläimiä muutoin paitsi että ne altistetaan suodatetulle ilmalle testikemikaalin sijasta. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna vettä tai muuta ainetta, tutkimukseen on sisällytettävä kantaja-aineverrokkiryhmä negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän sijasta. Kantaja-aineena on käytettävä vettä, mikäli mahdollista. Jos kantaja-aineena käytetään vettä, verrokkieläimet on altistettava ilmalle, jonka suhteellinen kosteus on sama kuin altistusryhmissä. Sopiva kantaja-aine on valittava asianmukaisesti toteutetun esitutkimuksen tai aiempien tietojen pohjalta. Jos kantaja-aineen myrkyllisyyttä ei tiedetä, tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää sekä negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ja kantaja-aineverrokkiryhmää, joskaan se ei ole suositeltavaa. Jos aiemmat tiedot osoittavat, että kantaja-aine on myrkytön, negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ei tarvita, ja tällöin tulee käyttää vain kantaja-aineverrokkia. Jos esitutkimus osoittaa, ettei kantaja-aineessa oleva testikemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa sitä, että kantaja-aine on myrkytön testatulla pitoisuudella, ja tällöin on käytettävä tätä kantaja-aineverrokkia.

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

18. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti hiukkaskoon pienentämisen vuoksi. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Hiukkaskokojakauma

19. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–3 μm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (4). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset ja kuidut voivat olla vaatimusta suurempia.

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

20. Testikemikaali on testattava mielellään ilman kantaja-ainetta. Jos kantaja-aineen käyttö on tarpeellista asianmukaisen testikemikaalipitoisuuden ja hiukkaskoon tuottamiseksi, on käytettävä ensisijaisesti vettä. Aina kun testikemikaali liuotetaan kantaja-aineeseen, sen stabiilius on osoitettava.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

21. Ilman virtausta altistuskammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai ajallisen stabiiliuden) reaaliaikainen seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia inhalaatioparametreja. Jos pitoisuutta seurataan reaaliajassa, ilmavirtausten mittaustaajuutta voidaan vähentää yhteen mittaukseen altistusta kohti päivässä. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen,

▼M4

että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisesti -altistuksen kammioissa. Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava. Jos ensimmäisenä altistuspäivänä tehdyt mittaukset osoittavat, että näiden kaasujen pitoisuus on asianmukainen, myöhemmät mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

22. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava kerran tunnissa kunkin altistuksen aikana, mikäli mahdollista. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

23. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

24. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit.

25. Jos mahdollista, koko tutkimuksen keston ajan on käytettävä yhdestä erästä peräisin olevaa testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

▼M4

26. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana. Altistusolosuhteiden stabiiliuden osoittamiseen voidaan käyttää reaaliaikaista seurantalaitetta, kuten aerosolifotometria aerosoleille tai hiilivetyanalysaattoria höyryille. Kammion todellinen pitoisuus on mitattava vähintään kolme kertaa jokaisena altistuspäivänä ja jokaiselta altistustasolta. Jos se ei ole mahdollista pienen ilmavirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, yksi näyte altistuskertaa kohti hyväksytään. Tällöin tämä näyte on mielellään kerättävä koko altistuskerran ajalta. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan. Tässä otetaan huomioon hajoamiseen ja kammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95}). Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

27. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin. Sen vuoksi jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava koko seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai indikaattoriaineen (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

28. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kerran viikossa jokaisesta pitoisuudesta käyttämällä kaskadierotinta tai jotain vaihtoehtoista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, vaihtoehtoista laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan.

29. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetristä suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa kaikkien pitoisuuksien osalta tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa.

30. Höyryjen osalta hiukkaskoko on määritettävä, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyryatmosfäärissä, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia.

HAVAINNOT

31. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti ennen altistusjaksoa, sen aikana ja sen jälkeen. Tiiviimpi tarkkailu voi olla aiheenmukaista sen perusteella, millainen vaste eläimille muodostuu altistuksen aikana. Kun eläinten tarkkailu ei ole mahdollista immobilisointiputkien, huonosti valaistujen koko kehon altistuskammioiden tai läpinäkymättömien ilmakehien vuoksi, eläimiä on tarkkailtava huolellisesti altistuksen jälkeen. Myrkyllisten vaikutusten korjaantuvuutta tai pahenemista voidaan arvioida ennen seuraavan päivän altistusta tehtävillä havainnoilla.

▼M4

32. Kaikki havainnot kirjataan jokaisesta eläimestä erikseen. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

33. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, hermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljenerityksen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta. Tutkimussuunnitelmaan voidaan sisällyttää muita arviointeja, kuten kinetiikka, biomonitorointi, keuhkojen toiminta, huonosti liukenevien, keuhkokudokseen kertyvien materiaalien retentio sekä käyttäytymisen muutokset.

RUUMIINPAINOT

34. Eläinyksilöiden painot on kirjattava vähän ennen ensimmäistä altistusta (päivä 0) ja sen jälkeen kahdesti viikossa (esimerkiksi perjantaisin ja maanantaisin, jotta voidaan osoittaa toipuminen altistuksettoman viikonlopun tai tietyn ajan jälkeen systeemisen toksisuuden arvioimiseksi) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä. Jos eläimessä ei ilmene vaikutuksia kahden ensimmäisen viikon aikana, ruumiinpainot voidaan punnita kerran viikossa tutkimuksen loppuun saakka. Satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläinten (jos käytössä) punnitsemista viikoittain on jatkettava koko toipumisjakson ajan. Tutkimuksen päättyessä kaikki eläimet on punnittava vähän ennen niiden lopettamista, jotta elinten ja ruumiinpainon väliset suhteet voidaan laskea ilman vääristymiä.

RAVINNON JA VEDEN KULUTUS

35. Ravinnon kulutus on mitattava viikoittain. Myös veden kulutus voidaan mitata.

KLIININEN KEMIA

36. Kaikista eläimistä, myös verrokki- ja satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläimistä, on tehtävä kliinis-kemialliset arvioinnit, kun ne lopetetaan. Altistuksen päättymisen ja verinäytteen ottamisen välinen aika on merkittävä muistiin varsinkin, jos kyseinen tutkittava ominaisuus rekonstituoituu nopeasti. Niistä parametreista, joiden puoliintumisaika plasmassa on lyhyt (esimerkiksi COHb, CHE ja MetHb), on syytä ottaa näyte heti altistuksen päätyttyä.

37. Taulukossa 1 luetellaan ne kliinis-kemialliset parametrit, jotka yleensä vaaditaan kaikissa toksikologisissa tutkimuksissa. Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta. Jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voitaisiin luonnehtia tarkemmin, tutkimuksen johtaja voi päättää arvioida myös muita parametreja (esimerkiksi koliiniesteraasi, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini tai Heinzin kappaleet, kreatiinikinaasi, myelosyyttien ja punasolujen suhde, troponiinit, valtimoverikaasut, laktaattidehydrogenaasi, sorbitolidehydrogenaasi, glumaattidehydrogenaasi ja gammaglutamyylitranspeptidaasi).

▼M4

Taulukko 1

Kliinis-kemialliset vakioparametrit

Hematologia	
Punasolujen määrä	Valkosolujen kokonaismäärä
Hematokriitti	Valkosolujen erittely
Hemoglobiinipitoisuus	Verihiutaleiden määrä
Keskihemoglobiini (MCH)	Hyytymisominaisuudet (valittava yksi):
Punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV)	— Protrombiiniaika
Keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC)	— Hyytymisaika
Retikulosyytit	— Partiaalinen tromboplastiiniaika
Kliininen kemia	
Glukoosi (*)	Alaniiniaminotransferaasi
Kokonaiskolesteroli	Aspartaattiaminotransferaasi
Triglyseridit	Alkaalifosfataasi
Veren ureatyppi	Kalium
Kokonaisbilirubiini	Natrium
Kreatiniini	Kalsium
Kokonaisproteiini	Fosfori
Albumiini	Kloridi
Globuliini	
Virtsa-analyysi (valinnainen)	
Ulkonäkö (väri ja sameus)	Kokonaisproteiini
Määrä	Glukoosi
Ominaistiheys tai osmolaliteetti	Veri/verisolut
pH	

(*) Koska pitkähkö paastojakso voi vääristää glukoosinmittauksen tuloksia (käsitellyt eläimet vs. verrokkieläimet), tutkimuksen johtajan on päätettävä, onko eläinten pitäminen ravinnotta tarpeen. Jos paastojaksoa käytetään, sen on oltava käytetyille lajeille sopiva, esimerkiksi rotalle paastoajan pituus voi olla 16 h (ravinnotta yli yön). Paastoverensokeri voidaan määrittää yli yön toteutetun paaston jälkeen viimeisellä altistusviikolla tai yli yön paastoamisen jälkeen ennen ruumiinavausta (jälkimmäisessä tapauksessa on määritettävä myös kaikki muut kliinis-kemialliset parametrit).

38. Jos on todisteita siitä, että alemmat hengitystiet (esimerkiksi keuhkorakkulat) ovat ensisijainen kertymä- ja retentiopaikka, bronkoalveolaarinen huuhtelu voi olla sopiva tekniikka analysoida määrällisesti hypoteesiperusteiset annos-vaikutus-parametrit, jotka kohdistuvat keuhkorakkulatulehdukseen, keuhkotulehdukseen ja fosfolipidoosiin. Tämän avulla voidaan testata annosvaste ja keuhkorakkuloiden vaurioiden ajalliset muutokset. Huuhtelunesteestä voidaan analysoida valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erottelu, kokonaisproteiini ja laktaattidehydrogenaasi. Lisäksi voidaan analysoida parametreja, jotka viittaavat lysosomien vaurioihin, fosfolipidoosiin, fibroosiin sekä ärsytyksen aiheuttamaan tai allergiseen tulehdukseen, johon voi sisältyä esitulehduksellisten sytokiinien/kemokiinien määritys. Bronkoalveolaariseen huuhteluun perustuvat mittaukset yleensä täydentävät histopatologisten tutkimusten tuloksia mutta eivät korvaa niitä. Ohjeita keuhkohuuhtelun tekemisestä on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOOPPISET MUUTOKSET JA ELINTEN PAINOT

39. Kaikille koe-eläimille, myös kokeen aikana kuolleille tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetuille ja tutkimuksesta poistetuille, on tehtävä täydellinen verenlasku ja ruumiinavaus. Jokaisen eläimen viimeisen altistuksen ja lopetuksen välinen aika on merkittävä muistiin. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kun eläimen on havaittu kuolleen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

40. Taulukossa 2 on lueteltu kaikki elimet ja kudokset, jotka on säilytettävä sopivassa aineessa histopatologista tutkimusta varten. [Hakasulkeisiin] merkittyjen elinten ja kudosten säilyttämisestä päättää tutkimuksen johtaja. **Lihavoidut** elimet ja kudokset on puhdistettava ja punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen välttämiseksi. Kilpirauhanen ja lisäkivekset on punnittava vain tarvittaessa, koska puhdistuksen aiheuttamat vahingot voivat estää histopatologisen arvioinnin. Kudokset ja elimet on kiinnitettävä 10-prosenttisella puskuroidulla formaliinilla tai muulla sopivalla kiinnitysaineella heti ruumiinavauksen jälkeen, vähintään 24–48 tuntia ennen puhdistusta sen mukaan, mitä kiinnitysainetta käytetään.

Taulukko 2

Ruumiinavauksen aikana säilöttävät elimet ja kudokset

Lisämunuaiset	Rakkularauhaset
Luuydin (ja/tai tuore aspiraatti)	Selkäydin (kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	**Perna**
[Silmät (verkkokalvo, silmähermo) ja silmäluomet]	Maha
Sydän	**Kivekset**
Munuaiset	**Kateenkorva**
Kurkunpää (kolmesta kohdasta, joista yhden on oltava kurkunkansi)	Kilpirauhanen
Maksa	Henkitorvi (vähintään kahdesta kohdasta siten, että mukana on yksi pitkittäinen leikkaus harjun läpi ja yksi poikittainen leikkaus)
Keuhkot (kaikki lohkot yhdestä kohdasta, mukaan luettuina pääkeuhkoputket)	[Virtsarakko]
Imusolmukkeet keuhkoportin alueelta etenkin huonosti liukenevien hiukkasmaisten testikemikaalien yhteydessä. Tarkempia kokeita ja/tai tutkimuksia, joissa keskitytään immunologiaan, voidaan käyttää myös muita imusolmukkeita esimerkiksi välikarsinan, servikaaliselta/submandibulaariselta ja/tai aurikulaariselta alueelta.	Kohtu Kaikki suuret leesiot
Nenänielun kudokset (vähintään neljästä kohdasta, yhden kohdan on oltava nenänielukanava ja NALT-imukudos (Nasal Associated Lymphoid Tissue)	
Ruokatorvi	
[Hajurauhanen]	
Munasarjat	

▼M4

41. Keuhkot on poistettava kokonaisina, punnittava ja täytettävä sopivalla kiinnitysaineella 20–30 cm:n syvyisen veden paineessa, jotta niiden rakenne säilyy (5). Leikkeet on kerättävä kaikista lohkoista yhdestä kohdasta pääkeuhkoputket mukaan luettuina, mutta jos tehdään keuhkohuuhtelu, huuhtelemattomasta lohkosta on otettava leikkeet kolmesta kohdasta (ei sarjaleikkeitä).

42. Nenänielun kudoksista on tutkittava vähintään neljästä kohdasta otetut näytteet, joista yhden on oltava nenänielukanava (5, 6, 7, 8, 9), jotta levyepiteeli, välimuotoinen epiteeli (värekarvaton hengitysepiteeli), hengitysepiteeli (värekarvallinen), hajuepiteeli sekä imukudos (NALT; 10, 11) voidaan tutkia. Kurkunpäästä on tutkittava kolmesta kohdasta otetut leikkeet, ja yhden niistä on oltava kurkunpään kansi (12). Henkitorvesta on tutkittava vähintään kahdesta kohdasta otetut leikkeet, joista toisen on oltava pitkittäinen leike ekstrapulmonaalisten keuhkoputkien ja henkitorven harjun haarautuman läpi ja toisen poikittaisleike.

HISTOPATOLOGIA

43. Histopatologinen arviointi on tehtävä kaikkien taulukossa 2 lueteltujen elinten ja kudosten osalta niin verrokkiryhmästä kuin suuren pitoisuuden ryhmästä sekä kaikista eläimistä, jotka kuolevat tai jotka lopetetaan tutkimuksen aikana. Erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteihin, kohde-elimiin ja näkyviin vammoihin. Ne elimet ja kudokset, joissa suuren pitoisuuden ryhmän eläimillä on leesioita, on tutkittava kaikista ryhmistä. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa histopatologiset arvioinnit myös muista ryhmistä selvän pitoisuus-vasteen osoittamiseksi. Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä (korjaantuvuus), sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä, on tutkittava histopatologisesti. Jos suuren pitoisuuden ryhmässä on hyvin paljon varhaisia kuolemantapauksia tai muita ongelmia, jotka vaarantavat tietojen merkityksellisyyden, seuraava pienemmän pitoisuuden ryhmä on tutkittava histopatologisesti. Silmämääräisten havaintojen ja mikroskooppisten löydösten välille on pyrittävä löytämään korrelaatio.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

44. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava seuraavat tiedot: ruumiinpaino, ravinnonkulutus, kliinis-kemialliset tiedot, makroskooppiset muutokset sekä histopatologiset löydökset. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset. Kaikki tulokset, niin määrälliset kuin satunnaiset, on arvioitava sopivalla tilastomenetelmällä. Kaikkia yleisesti hyväksyttyjä tilastomenetelmiä voi käyttää, ja ne on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

Testiraportti

45. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

▼M4

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle tietoja lähteestä ja aiemmin saatuja tietoja voi ilmoittaa, jos ne koskevat eläimiä, jotka on altistettu samankaltaisessa altistuksessa ja joiden asumis- ja paasto-olosuhteet ovat olleet samat

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— yksityiskohtainen kuvaus inhalaatiokammiosta, mukaan luettuina tilavuus ja kaavakuva

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilman lähde ja ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti kammiossa (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— tulo- ja poistoilman käsittely

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuusmuutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

▼M4

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin kokonaismassa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava mieluummin massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.) kuin tilavuusyksikköinä (ppm, ppb jne.)

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä

— (mieluiten kaavion sisältävä) kuvaus testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— yksityiskohdat kammion lämpötilan, kosteuden ja ilmanvirtauksen seuraamiseen käytetystä laitteistosta (esimerkiksi kalibrointikäyrän laatiminen)

— yksityiskohdat kammion pitoisuuden ja hiukkaskokojakauman määrittämisessä tarvittavien näytteiden keräämiseen tarkoitetusta laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— satunnaistamismenetelmä, jolla eläimet jaettiin testi- ja verrokkiryhmiin

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— kunkin eläimen vastetulosten ja pitoisuustason taulukot (ts. eläimet, joilla ilmeni toksisuusoireita, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste, alkamisajankohta ja kesto)

▼M4

— taulukko kunkin eläimen painoista

— taulukko ravinnonkulutuksesta

— taulukko kliinis-kemiallisista tiedoista

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— taulukko muista mitatuista parametreista.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittämiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Kohde-elin (-elimet) on määritettävä.

— NOAEL- ja LOAEL-arvot on määritettävä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼B

B.9. **TOISTETUN ANNOKSEN (28 PÄIVÄÄ) MYRKYLLISYYS (IHON KAUTTA NAUTITTAVAT AINEET)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Katso yleistä johdantoa, osa B (A).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Katso yleistä johdantoa, osa B (B).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei ole.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa ainetta levitetään useisiin ryhmiin jaettujen eläinten iholle porrastettuina annoksina (yksi annos ryhmää kohti) säännöllisesti 28 päivän koejakson aikana. Jakson aikana eläimiä tarkkaillaan myrkytysoireiden suhteen. Ruumiinavaus tehdään kokeen aikana kuolleille eläimille ja kokeen päätyttyä myös henkiin jääneille eläimille, kun ne on ensin lopetettu.

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä ei ole.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

1.6.1 **Valmistelut**

Ennen testiä eläinten elinolosuhteet pidetään tietyntyyppisinä vähintään viiden päivän ajan testin suorittamista silmälläpitäen. Terveiden aikuisten eläinten joukosta otetaan satunnaisotos, joka jaetaan käsittely- ja vertailuryhmiin. Noin 24 tuntia ennen testiä turkki leikataan tai ajetaan eläinten selkäalueelta varoen naarmuttamasta ihoa, koska naarmut saattavat muuttaa ihon läpäisevyyttä. Turkinpoisto on yleensä uusittava noin viikon välein. Vähintään 10 % kehon pinta-alaa peittävästä karvasta on ajeltava tai leikattava. Koe-eläimen paino on otettava huomioon suunniteltaessa paljastettavan alueen ja siteen suuruutta. Kiinteät aineet voidaan tarvittaessa jauhaa, ja ne on kosteutettava riittävällä vesimäärällä tai tarvittaessa muulla liuottimella hyvän ihokontaktin varmistamiseksi. Nestemäisiä aineita käytetään yleensä laimentamattomina. Käsittely toistetaan päivittäin 5–7 päivänä viikossa.

1.6.2 **Testiolosuhteet**

1.6.2.1 *Koe-eläimet*

Koe-eläiminä voidaan käyttää aikuisia rottia, kaneja tai marsuja. Muiden lajien käyttö on perusteltava.

▼B

Testin alussa kumpaakaan sukupuolta edustavien eläinten painonvaihtelut eivät saa olla enempää kuin ± 20 % sukupuolen keskiarvosta.

1.6.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Jokaista annostasoa kohti tarvitaan vähintään kymmenen eläintä (viisi naarasta ja viisi urosta). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineitä. Jos suunnitellaan testin kuluessa tapahtuvia lopettamisia, eläinten määrää on lisättävä vastaavasti. Tarvittaessa testiin voidaan ottaa kymmenen eläimen apuryhmä (viisi naarasta ja viisi urosta), jota altistetaan suurille annoksille 28 päivän ajan tarkkaillen myrkytysoireiden palautumista ja pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö käsittelyä seuraavan 14 päivän jakson aikana viivästyneitä myrkytysoireita. Tarvitaan myös kymmenen vertailueläimen (viiden naaran ja viiden uroksen) apuryhmä.

1.6.2.3 *Altistuspitoisuudet*

Tarvitaan vähintään kolme pitoisuustasoa ja yksi kontrolliryhmä. Jos testattava aine liuotetaan apuaineeseen, tätä varten tarvitaan erillinen kontrolliryhmä. Päivittäisen altistuksen on kestettävä vähintään kuusi tuntia. Ainetta levitetään samaan aikaan joka päivä, ja annosta säädetään 1-2 viikon välein siten, että pitoisuustasot pysyvät vakiona eläimen painoon nähden. Aineella käsittelyä lukuun ottamatta kontrolliryhmän ja käsittelyryhmien eläimiä on käsiteltävä samalla tavalla. Jos annostelun yhteydessä käytetään liuotinta apuaineena, liuotinta annostellaan kontrolliryhmän eläimille samalla menetelmällä kuin käsittelyryhmän eläimille määränä, joka vastaa suurinta käsittelyannosta. Suurimman annostason on aiheutettava myrkytysoireita, mutta vain vähän tai ei lainkaan kuolleisuutta. Pienimmän annostason ei pidä aiheuttaa lainkaan myrkytysoireita. Jos käytettävissä on soveltuva arvio ihmisaltistumisesta, pienimmän annostason on ylitettävä tämä taso. Keskimmäisen annostason tulee aiheuttaa mahdollisimman vähän myrkytysoireita. Jos käytetään useita välitasoja, ne on valittava siten, että myrkytysoireet porrastuvat. Alimman annostason ja välitason ryhmissä sekä kontrolliryhmissä kuolleisuuden on oltava pieni, jotta tuloksia voidaan arvioida merkityksellisellä tavalla.

Jos aine aiheuttaa vakavaa ihoärsytystä iholle levitettynä, pitoisuuksia on pienennettävä, mikä voi aiheuttaa suurannosryhmän eläimille muiden myrkytysoireiden vähenemistä tai oireiden häviämisen. Jos eläimen iho on pahoin vaurioitunut, voi olla tarpeen keskeyttää koe ja uusia se pienempiä pitoisuuksia käyttäen.

1.6.2.4 *Rajatesti*

Jos suoritetaan alustava koe käyttäen annostasoa 1 000 mg/kg tai tätä korkeampaa tasoa, joka perustuu tunnettuun ihmisaltistukseen, eikä tällainen testi aiheuta myrkytysoireita, lisätestit voidaan katsoa tarpeettomiksi.

1.6.2.5 *Tarkkailujakso*

Kaikkia eläimiä on tarkkailtava päivittäin myrkytysoireiden suhteen. Kuolinajankohta ja myrkytysoireiden llmestymis- sekä häviämisajankohta kirjataan.

▼B

1.6.3 **Testin suorittaminen**

Eläimiä pidetään yksin häkeissä. Eläimiä käsitellään testattavalla aineella mieluiten seitsemänä päivänä viikossa 28 päivän ajan. Seurantaa varten koottuja apuryhmiä tarkkaillaan altistusjakson jälkeen vielä 14 päivän ajan ilman käsittelyä, jotta voidaan todeta, ovatko myrkytysoireet häviäviä vai pysyviä. Päivittäisen altistuksen on kestettävä vähintään kuusi tuntia.

Testattavaa ainetta levitetään tasaisesti alueelle, joka vastaa noin 10 %:a kehon kokonaispinta-alasta. Erittäin myrkyllisten aineiden kohdalla voidaan käyttää pienempää pinta-alaa, mutta ainetta on levitettävä mahdollisimman ohuelti ja tasaisesti niin suurelle alueelle kuin mahdollista.

Altistuksen aikana ihoalue peitetään harsositeellä ja ärsyttämättömällä laastarilla. Tämän lisäksi alue on peitettävä, niin että harsoside ja aine pysyvät paikallaan eikä eläin pääse syömään ainetta. Eläin voidaan sitoa osittain siten, ettei se pysty syömään ainetta. Täydellistä liikkumattomuutta ei kuitenkaan suositella. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää suojakaulusta.

Altistusjakson jälkeen aineen jäännökset poistetaan vedellä tai muulla sopivalla ihonpuhdistusmenetelmällä.

Eläimiä on tarkkailtava säännöllisesti, jotta voidaan varmistaa, että mahdollisimman vähän eläimiä menetetään kannibalismin, kudosten autolyysin tai sijoitusvirheiden takia. Testijakson jälkeen kaikki aineelle altistuneet eläimet lopetetaan. Kuolemaisillaan olevat eläimet tai eläimet, joilla on vakavia ahdistuneisuuden tai kivun oireita, on poistettava ryhmästä ja lopetettava, minkä jälkeen niille tehdään ruumiinavaus.

Testijakson päätyttyä kaikki eläimet, kontrolliryhmien eläimet mukaan lukien, tutkitaan seuraavilta osin:

1) hematologia — vähintään hematokriitti, hemoglobiinipitoisuus, punasolujen lukumäärä, valkosolujen kokonaismäärä ja erittelylaskenta sekä hyytymistekijät;

2) kliininen veribiokemia — vähintään yksi parametri seuraavista maksan ja munuaisten toimintakokeista, alaniiniaminotransferaasi (ALAT), seeruminaspartaattiaminotransferaasi (ASAT), virtsa-aineen typpi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiini.

Muita, riittävän toksikologisen arvion kannalta tärkeitä määrityksiä ovat kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, paastoverensokeri, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini ja kolinesteraasiaktiivisuus.

▼B

Havaittujen oireiden tutkimista voidaan tarvittaessa laajentaa muita kliinisiä biokemianmäärityksiä käyttämällä.

1.6.4 **Kattava ruumiinavaus**

Kaikille kokeeseen osallistuneille eläimille on tehtävä kattava ruumiinavaus. Vähintään maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset on punnittava märkinä mahdollisimman pian dissektion jälkeen. Elimet ja kudokset (maksa, munuaiset, perna, kivekset, lisämunuaiset, sydän ja muut elimet, joissa on oleellisia vaurioita tai kokomuutoksia) on säilytettävä sopivassa aineessa mahdollisia myöhemmin tehtäviä histopatologisia tutkimuksia varten.

1.6.5 **Histopatologinen tutkimus**

Suurannosryhmän ja kontrolliryhmän eläinten säilötyille elimille ja kudoksille on tehtävä histologinen tutkimus. Jos suurimman annoksen saaneen ryhmän eläinten elimissä ja kudoksissa on testattavasta aineesta johtuvia vaurioita, myös pienempien annoskokojen ryhmien eläinten vastaavat elimet on tutkittava. Kaikkien apuryhmien eläimet on tutkittava histologisesti kiinnittäen erityistä huomiota niihin elimiin ja kudoksiin, joissa on havaittu muutoksia käsiteltyjen ryhmien kohdalla.

2. **TIEDOT**

Yhteenveto tiedoista esitetään taulukkona, jossa esitetään eläinten määrä kokeen alussa ja eläinten määrä kutakin vauriota kohti ryhmittäin.

Kaikki havaintotulokset on arvioitava soveltuvan tilastollisen menetelmän avulla. Tarkoitukseen voidaan käyttää kaikkia yleisiä menetelmiä.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTIRAPORTTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— laji, kanta, toimittaja, ympäristöolosuhteet, ruokavalio jne.,

— testiolosuhteet (mukaan lukien siteen tyyppi, okklusiivinen tai ei-okklusiivinen),

— annostasot (annoksen suuruus apuaine mukaan lukien ja mahdollinen testattavan aineen pitoisuus),

— oireita tuottamaton annostaso, mikäli mahdollista,

— vastetietojen luokittelu sukupuolen ja annostason mukaan,

— kuolinajankohdat kokeen aikana tai eläinten hengissäpysyminen kokeen loppuun,

— myrkytysoireet ja muut vaikutukset,

— ajankohdat, jolloin on havaittu poikkeavuuksia, ja poikkeavuuksien kehittyminen jatkossa,

— tiedot ruoasta ja kehonpainosta,

— käytetyt hematologiset testit tuloksineen,

▼B

— käytetyt kliinis-biokemialliset testit tuloksineen,

— ruumiinavauslöydökset,

— histopatologisten löydösten yksityiskohtaiset kuvaukset,

— tulosten tilastollinen käsittely soveltuvin osin,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Katso yleistä johdantoa, osa B (D).

4. **VIITTEET**

Katso yleistä johdantoa, osa B (E).

▼M7

B.10. *IN VITRO*-KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKÄSSOLUILLA

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 473 (2016). Se on osa geneettisen toksikologian testimenetelmiä. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1).

In vitro -kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa kemikaalit, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkässoluissa (2) (3) (4). Rakenteelliset poikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Polyploidiaa (mukaan lukien endoreduplikaatio) voi aiheutua kromosomipoikkeavuutta koskevissa määritysmenetelmissä *in vitro*. Aneugeenit voivat aiheuttaa polyploidiaa; polyploidia ei yksinään osoita aneugeenistä mahdollisuutta, se voi yksinkertaisesti osoittaa solysyklin häiriön tai sytotoksisuuden (5). Tätä testiä ei ole suunniteltu mittaamaan aneuploidiaa, vaan aneuploidian havaitsemiseen on suositeltavaa käyttää *in vitro* -mikrotumatestiä (6).

In vitro -kromosomipoikkeavuustestissä voidaan käyttää ihmisen tai jyrsijän pysyvien solulinjojen tai solukantojen viljelmiä. Käytettävät solut on valittava sen mukaan, mikä on solujen kasvukyky viljelmässä, karyotyypin pysyvyys, (mukaan lukien kromosomiluku) ja kromosomipoikkeavuuksien spontaanifrekvenssi (7). Tällä hetkellä käytettävissä olevien tietojen perusteella ei voida esittää vankkoja suosituksia, vaan todeta, että kemiallisten vaarojen arvioinnissa on tärkeää ottaa huomioon *p53*-status, geneettinen (karyotyypin) pysyvyys, DNA:n korjaantumiskapasiteetti ja testaukseen valittujen solujen alkuperä (jyrsijä tai ihminen). Tämän testimenetelmän käyttäjiä kehotetaan siten harkitsemaan näiden ja muiden solujen ominaisuuksien vaikutusta solulinjan kykyyn havaita kromosomipoikkeavuuksien induktio, kun tietoa saadaan lisää tällä alalla.

Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

In vitro -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää, ellei solujen metabolia sovellu kyseisiin testikemikaaleihin. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita. On huolehdittava, että vältetään olosuhteet, jotka voisivat johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin, toisin sanoen kromosomivaurioihin, jotka eivät johdu testikemikaalien ja kromosomien suorasta vuorovaikutuksesta; tällaisiin olosuhteisiin sisältyvät pH:n tai osmolaalisuuden muutokset (8) (9) (10), yhdysvaikutus väliaineen komponenttien kanssa (11) (12) tai liian korkeat sytotoksisuustasot (13) (14) (15) (16).

Tätä testiä käytetään havaitsemaan klastogeenisistä tapahtumista mahdollisesti johtuvat kromosomipoikkeavuudet. Kromosomipoikkeavuuden induktion analyysi on tehtävä metafaasissa olevia soluja käyttämällä. Siksi on tärkeää, että solujen pitäisi edetä mitoosiin sekä käsitellyissä että käsittelemättömissä viljelmissä. Valmistettujen nanomateriaalien osalta tähän testimenetelmään voidaan joutua tekemään erityisiä mukautuksia, mutta niitä ei ole kuvattu tässä testimenetelmässä.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

▼M7

TESTIN PERIAATE

Ihmis- tai muut nisäkäsperäiset soluviljelmät altistetaan testikemikaalille sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa että ilman sitä, paitsi jos testissä käytetään soluja, joiden metabolointikyky on riittävä (ks. 13 kohta). Sen jälkeen kun soluviljelmien altistus testikemikaalille aloitetaan, ne käsitellään sopivin etukäteen määrätyin välein metafaasin pysäyttävällä kemikaalilla (esim. colcemidilla tai kolkisiinilla), solut kerätään ja värjätään, ja metafaasissa olevat solut analysoidaan mikroskooppisesti kromatidityyppisten ja kromosomityyppisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Valmisteet

Solut

Testissä voidaan käyttää erilaisia solulinjoja (esim. kiinanhamsterin munasarjat (CHO), kiinanhamsterin keuhkot V79, kiinanhamsterin keuhkot (CHL)/IU, TK6) tai primaarisia soluviljelmiä, myös ihmisen tai muun nisäkkään perifeerisen veren lymfosyyttejä (7). Käytettyjen solulinjojen valintaa on perusteltava tieteellisesti. Kun primaarisoluja käytetään, on käytettävä mahdollisuuksien mukaan ihmisestä peräisin olevia primaarisoluja, ja näytteet on otettava humaanien eettisten periaatteiden ja sääntöjen mukaisesti. Ihmisen perifeerisen veren lymfosyytit on saatava nuorilta (noin 18–35-vuotiailta), terveiltä ja tupakoimattomilta henkilöiltä, joiden ei tiedetä altistuneen äskettäin genotoksisille aineille (esim. kemikaaleille tai ionisoivalle säteilylle) sellaisilla tasoilla, jotka lisäisivät kromosomaalisten poikkeavuuksien taustaesiintyvyyttä. Tällä varmistetaan, että kromosomaalisten poikkeavuuksien taustaesiintyvyys on matala ja johdonmukainen. Kromosomaalisten poikkeavuuksien esiintyminen perustasolla lisääntyy iän myötä, ja tämä suuntaus on naisilla selvempi kuin miehillä (17) (18). Jos soluja kerätään useammalta kuin yhdeltä luovuttajalta, luovuttajien lukumäärä on ilmoitettava. On osoitettava, että solut ovat jakaantuneet testikemikaalilla käsittelyn aloittamisen ja solujen keräämisen välillä. Soluviljelmät pidetään eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa (solulinjat) tai niitä stimuloidaan jakaantumaan (lymfosyyttien primaariset viljelmät), jotta solut altistetaan solusyklin eri vaiheissa, koska soluasteiden herkkyys testikemikaaleille ei ole ehkä tiedossa. Primaarisolut, joita on stimuloitava jakaantumaan mitogeenisilla aineilla, eivät yleensä ole enää synkronoituja testikemikaalille altistamisen aikana (esim. ihmisen lymfosyytit 48 tuntia kestävän mitogeenisen stimulaation jälkeen). Synkronoitujen solujen käyttöä käsittelyn aikana ei suositella, mutta se voidaan perustelluissa tapauksissa hyväksyä.

Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet

Soluviljelmiä on viljeltävä soveltuvassa kasvatusväliaineessa ja inkubaatio-olosuhteissa (kasvatusastiat, tarvittaessa kosteutettu ilma, jonka CO_2-pitoisuus on 5 prosenttia, 37 °C:n inkubointilämpötila). Solulinjoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja varmistettava, ettei mykoplasmakontaminaatiota esiinny (7) (19); soluja ei pidä käyttää, jos ne ovat kontaminoituneet tai jos modaalinen kromosomimäärä on muuttunut. Normaali solusyklin kesto testauslaboratoriossa käytetyissä solulinjoissa tai primaarisissa soluviljelmissä on määritettävä ja sen on oltava solujen julkaistujen ominaisuuksien mukainen (20).

Soluviljelmien valmistelu

Solulinjat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä ja kylvetään kasvatusväliaineeseen sellaiseen tiheyteen, että suspensiossa tai yksikerrosviljelmässä olevat solut kasvavat eksponentiaalisesti keräämisajankohtaan asti (esimerkiksi konfluenssia on vältettävä yksikerrosviljelmissä kasvavien solujen osalta).

▼M7

Lymfosyytit: antikoagulantilla (esimerkiksi hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai erotettuja lymfosyyttejä viljellään (esim. 48 tunnin ajan ihmisen lymfosyyttien osalta) mitogeenin [esim. fytohemagglutiniini (PHA), kun kyse on ihmisen lymfosyyteistä] kanssa, solunjakautumisen aikaansaamiseksi ennen testikemikaalille altistamista.

Metabolinen aktivaatio

Jos solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä, on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä, jota suositellaan oletusarvoisesti, ellei toisin toimiminen ole perusteltua, on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (21) (22) (23) tai fenobarbitaalin ja ß-naftoflavonin (24) (25) (26) (27) (28) (29) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrsijöiden (yleensä rottien) maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmä ei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen kanssa (30), ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254 (24) (25) (26) (28). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue on 1–2 tilavuusprosenttia, mutta sen pitoisuutta voidaan nostaa 10 tilavuusprosenttiin lopullisessa testiväliaineessa. Mitoosi-indeksiä vähentäviä tuotteita, erityisesti kalsiumiakomplekseja aiheuttavia tuotteita (31) on vältettävä käsittelyn aikana. Testattavien kemikaalien luokka saattaa vaikuttaa siihen, mitä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tai metabolisen indusoijan tyyppiä ja pitoisuutta päätetään käyttää.

Testikemikaalin valmistus

Kiinteät testikemikaalit on valmistettava sopivissa liuottimissa ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä (ks. 23 kohta). Nestemäiset kemikaalit voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen testijärjestelmän käsittelyä. Kaasujen tai haituvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä asianmukaisia mukautuksia. Kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (32) (33) (34). Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen käsittelyä, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

Testiolosuhteet

Liuottimet

Liuotin on valittava siten, että testikemikaalien liukoisuus on mahdollisimman hyvä eikä se haittaa testin suorittamista esimerkiksi muuttamalla solukasvua, vaikuttamalla testikemikaalin eheyteen, reagoimalla viljelyastioiden kanssa tai haittaamalla metabolista aktivaatiojärjestelmää. Vesipitoisen liuottimen (tai viljelynesteen) käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Vakiintuneita liuottimia ovat esimerkiksi vesi tai dimetyylisulfoksidi. Yleensä orgaanisten liuottimien osuus ei saa ylittää yhtä ja vesipitoisten liuottimien (suolaliuos tai vesi) kymmentä tilavuusprosenttia lopullisessa kasvatusväliaineessa. Jos käytetään muita kuin vakiintuneita liuottimia (esim. etanolia tai asetonia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne ja testikemikaali sekä testijärjestelmä sopivat yhteen ja etteivät ne ole genotoksisia käytettyinä pitoisuuksina. Tällaisten perustelevien tietojen puuttuessa on tärkeää käyttää käsittelemättömiä kontrolleja (ks. lisäys 1), jotka osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta mitään haitallisia tai klastogeenisiä vaikutuksia.

Solujen proliferaation ja sytotoksisuuden mittaaminen ja käsittelypitoisuuksien valitseminen

Päätettäessä suurimmasta testikemikaalin pitoisuudesta on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta (ks. 22 kohta), saostumista väliaineeseen (ks. 23 kohta) tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (ks. 5 kohta). Jos testikemikaali aiheuttaa

▼M7

sitä lisättäessä väliaineen pH-arvon merkittävän muutoksen, pH-arvoa voidaan mukauttaa puskuroimalla lopullinen käsittelyväliaine väärien myönteisten tulosten välttämiseksi ja asianmukaisten viljelyolosuhteiden säilyttämiseksi.

Solujen proliferaation mittauksella varmistetaan, että riittävässä määrässä käsiteltyjä soluja on tapahtunut mitoosi testin aikana ja että käsittelyissä on käytetty asianmukaisia sytotoksisuustasoja (ks. 18 ja 22 kohta). Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solukuoleman ja solukasvun indikaattoreita. Vaikka sytotoksisuuden arviointi alustavassa testissä saattaa olla hyödyllinen, jotta voidaan määrittää pääasiallisessa kokeessa käytettävät pitoisuudet, alustava testi ei ole pakollinen. Jos se tehdään, se ei saa korvata sytotoksisuuden mittausta pääasiallisessa kokeessa.

Populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen (PSK) tai solumäärän suhteellinen lisääntyminen (SMSL) ovat sopivia menetelmiä sytotoksisuuden arviointiin sytogeneettisissä testeissä (13) (15) (35) (36) (55) (ks. kaavojen osalta lisäys 2). Mikäli kyse on pitkäaikaisesta käsittelystä ja näytteenottoajoista sen jälkeen kun on aloitettu käsittely, joka on pidempi kuin 1,5 normaalin solusyklin kesto (ts. yhteensä yli 3 solusykliä), PSK:ssa voidaan aliarvioida sytotoksisuus (37). Tällaisissa olosuhteissa SLSM saattaa olla parempi mittari, tai sytotoksisuuden arviointi 1,5 normaalia solusyklia vastaavan ajan jälkeen on hyödyllinen arvio PSK:ta käyttäen.

Kun kyse on lymfosyyteistä primaariviljelmissä, vaikka mitoosi-indeksi (MI) on sytotoksisten/sytostaattisten vaikutusten mitta, siihen vaikuttavat käsittelyn jälkeinen mittausaika, käytetty mitogeeni ja mahdolliset solusyklin häiriöt. MI on kuitenkin hyväksyttävä, koska muut sytotoksisuuden mitat saattavat olla hankalia ja epäkäytännöllisiä ja niitä ei mahdollisesti voida soveltaa PHA-stimulaation vaikutuksesta kasvavien lymfosyyttien kohdepopulaatioon.

Vaikka SMSL ja PSK solulinjojen tapauksessa ja MI primaarisissa lymfosyyttiviljelmissä ovat suositeltuja sytotoksisuuden parametrejä, muillakin indikaattoreilla (esim. solujen eheys, apoptoosi, nekroosi, solusykli) voidaan antaa hyödyllistä lisätietoa.

Vähintään kolmea hyväksyttävyysperusteet (asianmukainen sytotoksisuus, solumäärä jne.) täyttävää testipitoisuutta (pois lukien liuotinkontrolli ja positiiviset kontrollit) on arvioitava. Solujen tyypistä riippumatta (solulinjat tai primaariset lymfosyyttiviljelmät) kullekin testattavalle pitoisuudelle voidaan altistaa kaksi rinnakkaista viljelmää tai vain yksi viljelmä. Vaikka rinnakkaisten viljelmien käyttö on suositeltavaa, vain yhden viljelmän käyttö on myös hyväksyttävää edellyttäen, että yksittäisestä viljelmästä tai rinnakkaisviljelmistä lasketaan sama kokonaismäärä soluja. Yhden viljelmän käyttö on erityisen merkityksellistä, kun arvioidaan useampaa kuin kolmea pitoisuutta (ks. 31 kohta). Riippumattomista rinnakkaisviljelmistä tietyllä pitoisuudella saadut tulokset voidaan yhdistää analyysia varten (38). Sellaisten testikemikaalien kohdalla, jotka osoittavat vähän tai eivät lainkaan sytotoksisuutta, sopiva pitoisuuksien välinen kerroin on yleensä 2–3. Jos sytotoksisuutta esiintyy, valittujen testipitoisuuksien on katettava vaihteluväli 22 kohdassa kuvatusta sytotoksisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai

▼M7

tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan. Monien testikemikaalien pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, ja tietojen saamiseksi vähäisestä ja keskitason sytotoksisuustasosta tai annosvastesuhteen tutkimiseksi tarkasti on käytettävä pitoisuuksia, jotka ovat lähempänä toisiaan, ja/tai useampaa kuin kolmea pitoisuutta (yksittäisiä viljelmiä tai rinnakkaisviljelmiä) erityisesti tilanteissa, joissa tarvitaan toistettuja kokeita (ks. 47 kohta).

Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, suurimmassa pitoisuudessa sytotoksisuuden on oltava 55 ± 5 % käyttäen suositeltuja sytotoksisuuden parametrejä (solulinjojen SMSL:n ja PSK:n pieneneminen ja MI:n pieneneminen lymfosyyttien primaariviljelmissä 45 ± 5 %:iin rinnakkaisesta negatiivisesta kontrollista). On tulkittava varovaisesti positiivisia tuloksia, jotka on havaittu ainoastaan tämän sytotoksisuuden 55 ± 5 %:n vaihteluvälin yläpäässä (13).

Sellaisten huonosti liukenevien testikemikaalien kohdalla, jotka eivät ole sytotoksisia pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, suurimmassa analysoitavassa pitoisuudessa on esiinnyttävä testikemikaalilla käsittelyn päättyessä silmin tai käänteismikroskoopilla nähtävää sameutta tai saostumista. Vaikka sytotoksisuutta esiintyy pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, on suositeltavaa testata ainoastaan yksi sameutta tai näkyvää saostumista tuottava pitoisuus, koska saostuminen saattaa aiheuttaa vääriä vasteita. Saostumista aiheuttavissa pitoisuuksissa on huolehdittava siitä, ettei saostuminen vaikuta testin suorittamiseen (esim. värjäykseen tai pisteytykseen). Ennen koetta saattaa olla hyödyllistä määrittää liukoisuus soluviljelmän elatusaineeseen.

Jos ei havaita saostumista tai rajoittavaa sytotoksisuutta, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 10 mM, 2 mg/ml tai 2 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin (39) (40) (41). Jos testikemikaalin koostumusta ei ole määritelty eli se on esimerkiksi koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksien reaktiotuote tai biologinen materiaali (UVCB) (42) taikka ympäristöstä otettu näyte, suurimman pitoisuuden on riittävän sytotoksisuuden puuttuessa ehkä oltava suurempi (esim 5 mg/ml) kunkin osan pitoisuuden lisäämiseksi. On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (43).

Kontrollit

Jokaisena solujen keräämisajankohtana on otettava rinnakkaiset negatiiviset kontrollit (ks. 15 kohta), jotka koostuvat pelkästään tutkittavaa ainetta sisältävässä kasvatusväliaineessa olevasta liuottimesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä.

Samanaikaisia positiivisia kontrolleja tarvitaan osoittamaan laboratorion kyky tunnistaa klastogeenejä käytetyn testisuunnitelman olosuhteissa sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus, kun tämä on tarpeen. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista esitetään alla olevassa taulukossa 1. Vaihtoehtoisia positiivisia kontrollikemikaaleja voidaan käyttää perustelluissa tapauksissa. Koska nisäkässoluilla tehtävät *in vitro* -geenimutaatiotestit ovat riittävän standardoidut, positiivisten kontrollien käyttö voi rajoittua klastogeeniin, joka vaatii metabolista aktivaatiota. Jos tämä tehdään samanaikaisesti ei-aktivoidun testin kanssa samaa annostelukestoa soveltaen, tämä yksittäinen positiivinen kontrollivaste osoittaa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän aktiivisuuden että testausjärjestelmän herkkyyden. Pitkäaikaisessa käsittelyssä (ilman S9-jaetta) on kuitenkin oltava oma positiivinen kontrollinsa, koska käsittelyn kesto poikkeaa testistä, jossa käytetään metabolista aktivointia. Kutakin positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä yhtenä tai useampana pitoisuutena, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa oleva lisääntyminen taustaan verrattuna. Näin voidaan osoittaa testausjärjestelmän herkkyys (vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä), ja tässä testimenetelmässä määritetyt raja-arvot ylittävä sytotoksisuustaso ei saa vaarantaa vasteen luotettavuutta.

▼M7

Taulukko 1

Vertailukemikaalit, joita suositellaan laboratorion pätevyyden arvioimiseksi ja positiivisten kontrollien valintaan

Luokka	Kemikaali	CAS-nro
1. Klastogeenit, jotka ovat aktiivisia ilman metabolista aktivaatiota		
	Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3
	Mitomysiini C	50-07-7
	4-nitrokinoliini-N-oksidi	56-57-5
	Sytosiiniarabinosidi	147-94-4
2. Klastogeenit, jotka edellyttävät metabolista aktivaatiota		
	Bentso(a)pyreeni	50-32-8
	Syklofosfamidi	50-18-0

MENETTELY

Käsittely testikemikaalilla

Lisääntyvät solut altistetaan testikemikaalille metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa ja ilman sitä.

Näytteiden keräämisajankohdat

Negatiivisen tuloksen vahvistamiseksi tarvittavaa perusteellista arviointia varten testi on kuitenkin suoritettava kaikissa seuraavissa kolmessa testiolosuhteissa käyttäen lyhytaikaista käsittelyä metabolisen aktivointijärjestelmän kanssa ja ilman sitä sekä pitkäaikaista käsittelyä ilman metabolista aktivointia (ks. 43, 44 ja 45 kohta):

— soluja on altistettava testikemikaalille sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua altistuksen aloittamisesta (18)

— soluja on altistettava testikemikaalille metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua altistuksen aloittamisesta (18)

— soluja on altistettava jatkuvasti ilman metabolista aktivaatiojärjestelmää näytteenottoon saakka, joka tehdään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua. Tietyt kemialliset aineet (esim. nulkeosidianalogit) saatetaan havaita helpommin, kun altistus/näytteenottoaika on pitempi kuin 1,5 normaalia solusykliä (24).

Jos jokin edellä mainituista testiolosuhteista johtaa positiiviseen vasteeseen, muita altistusohjelmia ei ole välttämättä tarpeen tutkia.

Kromosomipreparaattien valmistus

Soluviljelmiä käsitellään colcemidilla tai kolkisiinilla yleensä 1–3 tunnin ajan ennen näytteiden keräämistä. Jokaisen viljelmän näytteet kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaattien valmistusta varten. Kromosomipreparaattien valmistukseen kuuluu solujen hypotoninen käsittely, fiksointi ja värjäys. Yhden

▼M7

solun vahvuisissa kerroksissa voi esiintyä mitoosissa olevia soluja (pyöreitä, irtoavat pinnasta) 3–6 tuntia kestävän käsittelyn päättyessä. Koska mitoosissa olevat solut irtoavat helposti, ne voivat hävitä testikemikaalia sisältävän väliaineen mukana, kun se kaadetaan pois. Jos mitoosissa olevien solujen määrän havaitaan lisääntyvän huomattavasti kontrolleihin verrattuna, mikä viittaa todennäköisesti mitoosin pysähtymiseen, solut on kerättävä sentrifugoimalla ja palautettava viljelmiin, jotta mitoosivaiheessa olevia soluja, joissa kromosomipoikkeavuuksia voi muodostua, ei menetetä keruuvaiheessa.

Analyysi

Kaikki objektilasit, myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta kromosomipoikkeavuuksista. Koska fiksaatio johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen kromosomien menettämiseen, lasketuissa soluissa tulisi olla sentromeerejä modaalista lukumäärää vastaava määrä ± 2.

Kustakin pitoisuudesta ja kontrollista on laskettava vähintään 300 hyvin levinnyttä metafaasia sen päättelemiseksi, että testikemikaali on selvästi negatiivinen (ks. 45 kohta). Nämä 300 solua jaetaan tasan rinnakkaisnäytteisiin, jos käytetään rinnakkaisviljelmiä. Jos käytetään yhtä viljelmää pitoisuutta kohti (ks. 21 kohta), viljelmästä on laskettava vähintään 300 hyvin levinnyttä metafaasia. Tämän 300 solun laskennan ansiosta testin tilastollista voimaa lisätään ja lisäksi nolla-arvoja havaitaan harvoin (niitä oletetaan olevan vain viisi prosenttia) (44). Laskettujen metafaasien määrää voidaan vähentää, kun havaitaan korkea määrä soluja, joissa on kromosomipoikkeavuuksia ja testikemikaalia pidetään selkeästi positiivisena.

Solut, joissa on rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia mukaan lukien ja ilman aukkoja (gaps), lasketaan. Katkeamiset (breaks) ja aukot määritellään liitteessä 1 lähteiden (45) ja (46) perusteella. Kromatidityyppiset ja kromosomityyppiset poikkeavuudet on kirjattava erikseen ja luokiteltava alatyypin mukaan (katkeamiset, vaihdokset). Laboratoriossa käytettävillä menettelyillä varmistetaan, että kromosomipoikkeavuuden analyysin tekevät hyvin koulutetut laskijat ja niitä vertaisarvioidaan tarvittaessa.

Vaikka testillä pyritään ensisijaisesti toteamaan rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet, on tärkeää rekisteröidä myös polyploidian ja endoreduplikaation esiintymistaajuudet, mikäli näitä esiintyy. (Ks. 2 kohta).

Laboratorion pätevyys

Jotta voidaan vahvistaa riittävä kokemus testin suorittamisesta ennen kuin sitä käytetään rutiinitestaukseen, laboratoriossa on teetettävä sarja kokeita positiivisilla vertailukemikaaleilla, jotka toimivat eri mekanismien kautta, ja erilaisia negatiivisia kontrolleja (käyttäen erilaisia liuottimia/kantaja-aineita). Näiden positiivisten ja negatiivisten kontrollien vasteiden on oltava lähdekirjallisuuden mukaisia. Tätä ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta, eli joista on 37 kohdassa määritelty laboratoriokohtainen tietokanta.

Tiettyjä positiivisia kontrollikemikaaleja (ks. 26 kohdassa oleva taulukko 1) on tutkittava lyhyillä ja pitkillä käsittelyillä ilman metabolista aktivaatiota, ja myös lyhyellä käsittelyllä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa, jotta pätevyys havaita klastogeenisia kemikaaleja osoitetaan ja metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus määritetään. Valittujen kemikaalien eri pitoisuudet valitaan siten, että ne aiheuttavat toistettavissa olevia ja pitoisuuteen liittyviä lisääntymisiä taustaan verrattuna, koejärjestelmän herkkyyden ja dynaamisen alueen osoittamiseksi.

▼M7

Aiemmat kontrollitiedot

Laboratorion on määritettävä:

— aiempien positiivisten kontrollien vaihteluväli ja jakauma

— aiempien negatiivisten kontrollien (käsittelemättömien ja liuotinkontrollien) vaihteluväli ja jakauma.

Kun ensimmäisen kerran saadaan tietoja aiemman negatiivisen kontrollin jakaumasta, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien pitäisi olla julkaistujen kontrollitietojen mukaisia, jos sellaisia on olemassa. Kun kontrollin jakaumaan lisätään enemmän kokeellista tietoa, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tulisi mieluiten sijoittua kyseisen jakauman 95 %:n kontrollirajojen sisälle (44) (47). Laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta on aluksi luotava vähintään 10 kokeelle, mutta sen olisi mieluiten koostuttava vähintään 20 kokeesta, jotka on suoritettu vastaavissa koeolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (48)), positiivisten ja negatiivisten kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja osoittaakseen, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän (44). Lisäsuosituksia aikaisempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aikaisempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksyttävyysperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (47).

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon järjestelyn yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aikaisempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aikaisempien kontrollien tietokanta.

Negatiivisten kontrollitietojen tulisi koostua kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuudesta yhdessä viljelmässä tai rinnakkaisten viljelmien summasta, kuten 21 kohdassa kuvataan. Rinnakkaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 %:n kontrollirajojen sisälle (44) (47). Jos rinnakkaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 %:n kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisemman kontrollien jakaumaan edellyttäen, etteivät ne ole äärimmäisiä harha-arvoja ja on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 37 kohta), sekä siitä, ettei kyse ole teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten esittäminen

On arvioitava niiden solujen prosenttiosuus, joissa on kromosomipoikkeavuuksia. Kromatidityyppiset ja kromosomityyppiset poikkeavuudet (katkeamiset, vaihdokset) on lueteltava erikseen ja niiden lukumäärät ja esiintymistaajuudet altistetuissa viljelmissä ja kontrolliviljelmissä on mainittava. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan, mutta niitä ei lasketa mukaan kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuteen. Polyploidian ja/tai endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen prosenttiosuus raportoidaan, kun tämä havaitaan.

Lisäksi pääasiallisissa kromosomipoikkeavuustesteissä on rekisteröitävä kaikissa testiviljelmissä sekä negatiivisissa ja positiivisissa kontrolliviljelmissä tehdyt samanaikaiset sytotoksisuusmittaukset.

Kustakin viljelmästä on esitettävä tiedot erikseen. Kaikista tiedoista on lisäksi esitettävä yhteenveto taulukkomuodossa.

Hyväksyttävyysperusteet

Testi hyväksytään seuraavilla perusteilla:

— rinnakkainen negatiivinen kontrolli katsotaan hyväksyttäväksi laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan 39 kohdan mukaisesti

▼M7

— rinnakkaisten positiivisten kontrollien (ks. 26 kohta) on indusoitava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

— solujen proliferaatiota koskevien kriteereiden on täytyttävä liuotinkontrollissa (17 ja 18 kohta)

— testi suoritettiin kaikissa kolmessa koeolosuhteessa, ellei jokin niistä tuottanut positiivisia tuloksia (ks. 28 kohta)

— riittävä määrä soluja ja pitoisuuksia on analysoitavissa (31 ja 21 kohta)

— suurimman pitoisuuden valintaperusteet vastaavat 22, 23 ja 24 kohdassa kuvattuja perusteita.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Mikäli kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi positiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista koeolosuhteista (ks. 28 kohta):

a) vähintään yksi testipitoisuuksista aiheuttaa tilastollisesti merkittävän lisääntymisen verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b) lisäys riippuu annoksesta, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä

c) jokin tuloksista on aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 prosentin kontrollirajat; ks. 39 kohta).

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan indusoida kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkässoluissa tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia sopivimmille tilastomenetelmille (49) (50) (51).

Mikäli kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi negatiiviseksi, jos kaikissa tarkastelluissa koeolosuhteissa (ks. 28 kohta):

a) mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkittävää lisääntymistä verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b) pitoisuudesta riippuvaa lisääntymistä ei esiinny asianmukaisella trenditestillä arvioituna

c) kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman sisällä (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuvat 95 prosentin kontrollirajat; ks. 39 kohta).

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali voi indusoida kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkässoluissa tässä testijärjestelmässä.

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen yllä kuvatulla tavalla tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea, tietoja tulee arvioida asiantuntija-arviossa ja /tai lisätutkimuksissa. Lisäsolujen laskeminen (tarvittaessa) tai kokeen toistaminen käyttäen mahdollisesti modifioituja koeolosuhteita (esimerkiksi pitoisuusvälit, muut metaboliset aktivaatiojärjestelmät [kuten S9-jakeen pitoisuus tai alkuperä]) saattaa olla hyödyllistä.

Saatujen tietojen pohjalta ei harvinaisissa tapauksissa lisätutkimustenkaan jälkeen voida saada positiivisia tai negatiivisia tuloksia, ja sen vuoksi testikemikaalin vaste jää epäselväksi.

▼M7

Polyploidisten solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaaleilla pystytään estämään mitoottisia prosesseja ja aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia (52). Endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaalit kykenevät estämään solusyklin etenemisen (53) (54) (ks. 2 kohta). Siksi polyploidiset solut ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävät solut on rekisteröitävä erikseen.

Testiraportti

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— pH-arvon mittaus, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus viljelynesteessä, johon testikemikaalia lisättiin, kun tätä tarvitaan.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa ja sen mukaan kun on mahdollista, epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot ja niin edelleen.

Useista aineosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistaajuuden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin:

— liuottimen valintaperusteet

— liuottimen osuus lopullisessa viljelynesteessä on myös ilmoitettava.

Solut

— solujen tyyppi ja lähde

— karyotyypin ominaisuudet ja käytetyn solutyypin soveltuvuus

— mykoplasman puuttuminen solulinjojen osalta

— solulinjojen osalta tiedot solysyklistä, kaksinkertaistumisajasta tai proliferaatioindeksistä

— verenluovuttajien sukupuoli, ikä ja kaikki merkitykselliset tiedot luovuttajasta, tieto siitä, onko testissä altistettu kokoverta vai eristettyjä lymfosyyttejä, käytetty mitogeeni

— solulinjojen osalta siirrostusten lukumäärä, jos saatavilla

— solulinjojen osalta soluviljelymenetelmät

— solulinjojen osalta kromosomien modaalinen lukumäärä.

▼M7

Testiolosuhteet:

— metafaasin estämiseen käytetty kemikaali, sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto

— testikemikaalin pitoisuus ilmaistuna lopullisena pitoisuutena viljelynesteessä (esim. µg tai mg/mL tai mM viljelynesteessä)

— pitoisuuksien ja viljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esim. sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset

— kasvatusväliaineen koostumus, tarvittaessa hiilidioksidipitoisuus, kosteustaso

— viljelynesteeseen lisätyn liuottimen ja testikemikaalin pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubointilämpötila

— inkubointiaika

— käsittelyn kesto

— käsittelyn jälkeinen keräämisajankohta

— solutiheys kylvämisen aikana, tarvittaessa

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, (S9-jakeen alkuperä, S9-seoksen valmistusmenetelmä, S9-seoksen ja S9-jakeen pitoisuus tai tilavuus lopullisessa viljelynesteessä, S9-jakeen laadunvalvonta)

— positiivisen ja negatiivisen kontrollin kemikaalit, kunkin käsittelyolosuhteen lopulliset pitoisuudet

— objektilasien preparointimenetelmät ja käytetyt värjäystekniikat

— määrityksien hyväksyttävyysperusteet

— kromosomipoikkeavuuksien laskentaperusteet

— analysoitujen metafaasien lukumäärä

— sytotoksisuuden mittausmenetelmät

— muut sytotoksisuuteen ja käytettyyn menetelmään liittyvät tiedot

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen määritysmenetelmät.

Tulokset:

— käsiteltyjen solujen määrä ja kutakin viljelmää varten kerättyjen solujen määrä, kun käytetään solulinjoja

— sytotoksisuuden mittaaminen, esim. PSK, SMSL, MI, muut huomautukset, jos niitä on

— solulinjojen osalta tiedot solysyklistä, kaksinkertaistumisajasta tai proliferaatioindeksistä

— saostumisen merkit ja määrittämisajankohta,

▼M7

— kromosomipoikkeavuuksien, myös aukkojen, määrittely (gaps)

— laskettujen solujen lukumäärä, kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ilmoitetaan kunkin altistetun viljelmän ja kontrolliviljelmän osalta erikseen, mukaan lukien ja ilman aukkoja

— ploidian (erikseen mainittavat polyploidiset solut ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävät solut) muutokset, jos niitä esiintyy

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— rinnakkaisten negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aikaisemman negatiivisen (liuotin) ja positiivisen kontrollin tiedot, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat, 95 %:n kontrollirajat jakaumille sekä tietojen määrä

— tilastoanalyysit; mahdolliset p-arvot.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (toim.), Plenum Press, New York and London, s. 1–29.

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture teoksessa *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (toim.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, s. 427–432.

(4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), Improving dose selection and identification of aneugens in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, s. 318–327.

(6) Tässä liitteessä oleva B.49 luku. *In vitro -mikrotumatesti nisäkässoluilla.*

(7) ILSI paper (luonnos), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, s. 147–204.

(9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, s. 297–305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, s. 789–886.

▼M7

(11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, s. 177–183.

(12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, s. 439–452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, s. 191–201.

(14) Kirkland, D. *et al*. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, s. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, s. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, s. 316–326.

(17) Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, s. 305–309.

(18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, s. 95–106.

(19) Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, s. 261–287.

(20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, s.163–167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, s. 347–363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, s. 173–215.

(23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, s. 83–90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, s. 277–290.

(25) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, s. 55–65.

(26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, s. 175–177.

▼M7

(27) Matsushima, T. *et al*. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (toim.), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, s. 241–261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, s. 51–59.

(30) UNEP (2001). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus. Saatavilla osoitteessa: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, s. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, teoksessa *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (toim.), Plenum, New York, s. 91–103.

(33) Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, s. 795–801.

(34) Asakura, M. *et al*. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, s. 122–130.

(35) Lorge, E. *et al*. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, s. 1–3.

(36) Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, s. 77–83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, s. 86–87.

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In vitro Cytogenetic Assays. Teoksessa: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (toim.) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (testiohjeet 473, 476 ja 487) ENV/JM/TG(2014)17. Saatavilla pyynnöstä.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, s. 32–56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, s. 36–43.

▼**M7**

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Saatavilla osoitteessa: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (toim.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al*. (1990), Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*, teoksessa *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 62–86.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, s. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), Analysis of Data from *In vitro* Cytogenetic Assays, teoksessa *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, s. 29–46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, s. 403–413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, s. 1362–1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, s. 139–149.

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aneuploidia: yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Apoptoosi: ohjelmoitunut solukuolema, jossa tietyt vaiheet johtavat solujen hajoamiseen solukalvon ympäröimiksi rakkuloiksi, jotka myöhemmin häviävät fagosytoosin tai puhkeamisen seurauksena.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen jälkeen tuma ei etene mitoosiin vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, … kromatidia.

Genotoksinen: yleisnimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa katkeamiselle, deleetioille, addukteille, nukleotidien muutoksille ja sidoksille, uudelleenjärjestäytymiselle, geenimutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Kemikaali: aine tai aineiden seos.

Klastogeeni: kemikaali, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solupopulaatioissa tai eukaryoottisten organismien populaatioissa.

Kromatidien aukko (chromatid gap): yhden kromatidin ei-värjätty alue (akromaattinen leesio), johon liittyy minimaalinen kromatidin siirtymä.

Kromatidien katkeaminen (chromatid break): yhden kromatidin katko, jossa on yhden kromatidin selvä siirtymä.

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Käsittelemättömät kontrollit: viljelmät, joita ei altisteta aineelle (eli niihin ei käytetä testikemikaalia eikä liuotinta) vaan ne käsitellään samanaikaisesti samalla tavalla kuin testikemikaalia saavat viljelmät.

Liuotinkontrolli: yleinen nimitys kontrolliviljelmille, joihin lisätään vain testikemikaalin liuottamiseen käytettyä liuotinta.

Maksasta eristetty S9-jae: maksahomogenaatin supernatantti 9 000 g sentrifugoinnin jälkeen, ts. käsittelemätön maksanäyte.

Mitoosi: solutuman jakautuminen, joka jaotellaan yleensä profaasiin, prometafaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin.

Mitoosi-indeksi (MI): suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Mutageeninen: aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

▼M7

Numeerinen poikkeavuus: käytetyille soluille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

p53-status: p53-proteiini osallistuu solukierron säätelyyn, apoptoosiin ja DNA:n korjaukseen. Solut, joista puuttuu toimiva p53-proteiini tai jotka eivät pysty pysäyttämään solusykliä tai hävittämään vahingoittuneita soluja apoptoosilla tai muilla p53-proteiinin toimintoihin liittyvillä mekanismeilla (esimerkiksi indusoimalla DNA:n korjautumisen, ovat teoriassa alttiimpia geenimutaatioille tai kromosomipoikkeavuuksille.

Pitoisuudet: viittaa testikemikaalin lopullisiin pitoisuuksiin viljelynesteessä.

Polyploidia: solujen tai organismien kromosomien lukumäärää koskeva poikkeavuus, joka koskee yksittäisen kromosomin tai tiettyjen kromosomien (aneuploidia) sijaan koko kromosomistoa.

Populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen (PSK): populaation kaksinkertaistumismäärän lisääntyminen kemikaalille altistetuissa viljelmissä verrattuna lisääntymiseen muissa kuin käsitellyissä viljelmissä; suhde ilmaistaan prosentteina.

Rakenteellinen poikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

S9-seos: S9-jakeen ja metabolisen entsyymitoiminnan kannalta välttämättömien kofaktorien seos.

Solujen proliferaatio: solujen määrän kasvaminen solujen mitoottisen jakautumisen seurauksena.

Solumäärän suhteellinen lisääntyminen (SMSL): solujen määrän lisääntyminen kemikaalille altistetuissa viljelmissä verrattuna lisääntymiseen muissa kuin käsitellyissä viljelmissä; suhde ilmaistaan prosentteina.

Sytotoksisuus: tämän testimenetelmän kattamissa analyyseissä solulinjoja käytettäessä sytotoksisuus määritetään aineelle altistettujen solujen populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen vähentymisenä tai solumäärän suhteellisena lisääntymisenä verrattuna negatiiviseen kontrolliin (ks. 17 kohta ja lisäys 2). Tämän testimenetelmän kattamissa analyyseissä primaarisia lymfosyyttiviljelmiä käytettäessä sytotoksisuus määritetään aineelle altistettujen solujen mitoosi-indeksin pienentymisenä verrattuna negatiiviseen kontrolliin (ks. 18 kohta ja lisäys 2).

Testikemikaali: aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M7

Lisäys 2

KAAVAT SYTOTOKSISUUDEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN

Mitoosi-indeksi (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\textbf{Mitoosissa olevien solujen määrä}}{\textbf{Laskettujen solujen kokonaismäärä}} \times 100$$

Solumäärän suhteellista lisääntymistä (SMSL) tai populaation suhteellista kaksinkertaistumista (PSK) suositellaan, koska molemmissa otetaan huomioon jakaantuneen solupopulaation osuus.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Solujen määrän kasvu käsitellyissä viljelmissä(loppu} - \text{alku}))}{(\text{Solujen määrän kasvu kontrolliviljelmissä(loppu–alku}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Populaatioiden kaksinkertaistumisten määrä käsitellyissä viljelmissä})}{(\text{Populaatioiden kaksinkertaistumisten määrä kontrolliviljelmissä})} \times 100$$

Jossa

populaation kaksinkertaistuminen = [log (solumäärä käsittelyn jälkeen ÷ alkuperäinen solumäärä)] ÷ log 2

Esimerkiksi jos SMSL tai PSK on 53 %, sytotoksisuus/sytostaasi on 47 % ja mitoosi-indeksillä (MI) mitattu 55 prosentin sytotoksisuus/sytostaasi tarkoittaa, että todellinen MI on 45 prosenttia kontrollista.

Joka tapauksessa solujen määrä ennen käsittelyä on laskettava ja sen on oltava sama käsitellyissä ja negatiivisissa kontrolliviljelmissä.

Vaikka suhteellisia solumääriä (eli solumääriä altistetuissa viljelmissä/solumääriä kontrolliviljelmissä) on käytetty aikaisemmin sytotoksisuuden parametrina, sitä ei enää suositella, koska se voi johtaa sytotoksisuuden aliarviointiin.

Negatiivisissa kontrolliviljelmissä populaation kaksinkertaistumisen on oltava yhteensopiva sen vaatimuksen kanssa, että soluista otetaan näyte ajalla, joka vastaa suunnilleen 1,5 solusykliä, ja mitoosi-indeksin pitäisi olla niin korkea, että saadaan riittävä määrä mitoosissa olevia soluja, jotta voidaan luotettavasti laskea 50 prosentin vähennys.

▼M7

B.11. NISÄKKÄIDEN LUUYTIMEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 475 (2016). Se on osa geneettisen toksikologian testimenetelmiä. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1).

Nisäkkäillä *in vivo* tehtävä luuytimen kromosomipoikkeavuustesti on erityisen relevantti genotoksisuuden arvioinnissa, koska vaikka lajien välillä voi olla vaihtelua, *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin liittyvät tekijät ovat aktiivisia ja voivat edistää vasteiden saantia. *In vivo* -analyysi on hyödyllinen myös *in vitro* -koejärjestelmässä havaitun genotoksisuuden jatkotutkimuksena.

Nisäkkäillä *in vivo* tehtävää kromosomipoikkeavuustestiä käytetään testikemikaalien aiheuttamien rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien osoittamiseen nisäkkäiden, yleensä jyrsijöiden, luuydinsoluissa (2) (3) (4) (5). Rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Vaikka genotoksisten kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, myös kromosomityyppisiä poikkeavuuksia esiintyy. Kromosomivauriot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että kun nämä vauriot ja niihin liittyvä tapahtumat aiheuttavat muutoksia somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä, ne ovat osallisina syövän synnyssä ihmisillä ja koejärjestelmissä. Polyploidiaa (mukaan lukien endoreduplikaatio) voi aiheutua kromosomipoikkeavuutta koskevissa määritysmenetelmissä *in vivo*. Polyploidian lisääntyminen ei yksinään osoita aneugeenista mahdollisuutta, vaan se voi yksinkertaisesti osoittaa solysyklin häiriön tai sytotoksisuuden. Tätä testiä ei ole suunniteltu mittaamaan aneuploidiaa. Mikrotumatesti nisäkkään punasoluissa *in vivo* (tässä liitteessä oleva B.12 luku) tai *in vitro* -mikrotumatesti nisäkässoluilla (tässä liitteessä oleva B.49 luku) ovat *in vivo*- ja *in vitro* -testejä, joita suositellaan aneuploidian havainnointiin.

Käytettyjen termien määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT HUOMIOT

Tässä testissä käytetään yleensä jyrsijöitä, mutta muut lajit voivat olla joissain tapauksissa sopivia, jos tämä on tieteellisesti perusteltua. Luuydin on tämän testin kohdekudos, sillä sen verisuonitus on hyvin runsasta ja se sisältää solupopulaation, jonka solusykli on nopea ja joka on helppo eristää ja prosessoida. Raportissa on esitettävä tieteelliset perustelut muiden lajien kuin rottien ja hiirten käytöstä. Jos käytetään muita lajeja kuin jyrsijöitä, on suositeltavaa, että luuytimen kromosomipoikkeavuuden mittaus sisällytetään toiseen sopivaan toksisuustestiin.

Jos on saatu viitteitä siitä, etteivät testikemikaalit tai niiden metaboliitit pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

▼M7

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Eläimet altistetaan testikemikaalille soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja ne lopetetaan humaanisti sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esim. kolkisiinia tai colcemidia). Tämän jälkeen luuydinsoluista tehdään kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevien solujen kromosomipoikkeavuudet analysoidaan.

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

Pätevyyttä koskevat tutkimukset

Jotta voidaan vahvistaa riittävä kokemus analyysin suorittamisesta ennen kuin sitä käytetään tavanomaiseen testaukseen, laboratorion on osoitettava, että se voi tuottaa odotettavissa olevat tulokset julkaistuista tiedoista (esim. (6)) kromosomipoikkeavuuden taajuuden mittaamiseen vähintään kahdella positiivisella kontrollikemikaalilla (mukaan lukien heikot vasteet, joita indusoivat pienet määrät positiivista kontrollikemikaalia), kuten ne, jotka luetellaan taulukossa 1 ja yhdessä yhteensopivien kantaja-aine-/liuotinkontrollien kanssa (ks. 22 kappale). Näissä kokeissa pitää käyttää annoksia, joista aiheutuu toistettavissa olevaa ja annoksesta riippuvaa lukumäärän suurenemista, ja niiden on osoitettava testausjärjestelmän herkkyys sekä dynaaminen vaihteluväli kohdekudoksessa (luuydin) ja käyttää laskentamenetelmää, jota voidaan soveltaa laboratoriossa. Tätä vaatimusta ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta, eli joilla on 10–14 kohdassa tarkoitettu aiemmin kerätty tietokanta.

Aiemmat kontrollitiedot

Pätevyyttä koskevissa tutkimuksissa laboratorion on määriteltävä:

— aiempi positiivisen kontrollin vaihteluväli ja jakauma, ja

— aiempi negatiivisen kontrollin vaihteluväli ja jakauma.

Hankittaessa ensin tietoja aiempien negatiivisten kontrollien jakaumaa varten, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien on oltava yhdenmukaisia julkaistujen kontrollitietojen kanssa, jos sellaisia on olemassa. Kun aikaisempien kontrollien jakaumaan lisätään enemmän kokeellisia tietoja, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava kyseisen jakauman 95 %:n kontrollirajojen sisälle. Laboratorion aikaisempia negatiivisia kontrolleja koskevan tietokannan pitäisi olla tilastollisesti vankka, jotta varmistetaan laboratorion kyky arvioida negatiivisten kontrollitietojensa jakaumaa. Lähdekirjallisuuden mukaan voidaan tarvita vähintään 10 koetta, mutta mieluiten olisi tehtävä ainakin 20 koetta vastaavissa koeolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (7)), tunnistamaan kuinka vaihtelevat niiden tiedot ovat, ja osoittaakseen, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän. Lisäsuosituksia aikaisempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aikaisempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksyttävyysperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (8).

Jos laboratorio ei suorita loppuun riittävää määrää kokeita tilastollisesti vankan negatiivisen kontrollin jakauman osoittamiseksi (ks. 11 kohta) pätevyyttä koskevissa tutkimuksissa (kuvataan 9 kohdassa), on hyväksyttävää, että jakauma voidaan luoda ensimmäisten rutiinitutkimuksien aikana. Tässä lähestymistavassa pitäisi noudattaa lähdekirjallisuudessa (8) esitettyjä suosituksia ja negatiivisen kontrollin tuloksia, ja näissä kokeissa saatujen negatiivisten kontrollien tulosten on oltava julkaistujen negatiivisten kontrollien tuloksien mukaisia.

▼M7

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon, miten ne vaikuttavat tuloksena olevien tietojen yhdenmukaisuuteen laboratorion olemassa olevan aiempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa. Vain suurien epäjohdonmukaisuuksien vuoksi on luotava uusi aiempien kontrollien tietokanta, jos asiantuntija-arviossa määritetään, että se eroaa edellisestä jakaumasta (ks. 11 kohta). Sen uudelleenluonnin aikana täysimittaista negatiivisten kontrollien tietokantaa ei ehkä tarvita varsinaisen testin suorittamiseen, jos laboratorio voi osoittaa, että sen rinnakkaisen negatiivisen kontrollin arvot ovat yhdenmukaisia aiemman tietokannan tai vastaavien julkistettujen tietojen kanssa.

Negatiivisen kontrollin tietojen tulisi koostua kunkin eläimen rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien (lukuun ottamatta aukkoja [gap]) esiintyvyydestä. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 %:n kontrollirajojen sisälle. Jos rinnakkaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 %:n kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisemman kontrollien jakaumaan edellyttäen, etteivät ne ole äärimmäisiä harha-arvoja ja että on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 11 kohta), ja ettei ole kyse teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

MENETELMÄN KUVAUS

Valmisteet

Eläinlajin valinta

Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Yleisesti käytetään rottia, ja hiirten käyttö voi olla asianmukaista. Kaikkia muita sopivia nisäkäslajeja voidaan käyttää, jos raportissa esitetään tieteellinen perustelu.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

Jyrsijöiden tapauksessa koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden olisi mieluiten oltava 50–60 prosenttia, sen olisi oltava ainakin 40 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Tilassa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Jyrsijät on sijoitettava samaa sukupuolta ja käsittelyryhmää edustaviin pienryhmiin (enintään viisi häkkiä kohti), jos mitään aggressiivista käytöstä ei odoteta, mieluiten kiinteisiin lattiahäkkeihin, joissa on asianmukainen virikkeellinen ympäristö. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin ainoastaan, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

Yleensä käytetään nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä (jyrsijät ovat mieluiten 6–10 viikon ikäisiä käsittelyn alussa, joskin hieman vanhemmat eläimet hyväksytään) ja ne jaetaan satunnaistetusti testi- ja kontrolliryhmiin. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti inhimillisellä minimaalisen invasiivisella toimenpiteellä (esim. rengastamalla, merkitsemällä, mikrosirulla tai biometrisellä tunnuksella, mutta ei korvia tai varpaita leikkaamalla) ja sopeuttamalla laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Ristikontaminaatiota positiivisella kontrollilla ja testikemikaalilla tulisi välttää. Tutkimuksen alkaessa eläinten painonvaihtelun on oltava vähäistä, ja se saa vaihdella korkeintaan ± 20 % kunkin sukupuolen tavanomaisesta keskiarvosta.

Annosten valmistelu

Kiinteät testattavat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testattavat kemikaalit voidaan antaa suoraan

▼M7

tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitystien kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikokemiallisista ominaisuuksista riippuen. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Liuotin/kantaja-aine

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista testikemikaalien kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä yhteensopivista liuottimista/kantaja-aineista ovat vesi, fysiologinen suolaliuos, metyyliselluloosaliuos, natriumkarboksimetyyliselluloosan suolaliuos, oliiviöljy ja maissiöljy. Jos ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja siitä, ettei valittu epätyypillinen liuotin/kantaja-aine aiheuta rakenteellisia poikkeavuuksia tai muita haitallisia vaikutuksia, on tehtävä alustava tutkimus, jolla voidaan määrittää liuotin-/kantajakontrollin hyväksyttävyys.

Kontrollit

Positiiviset kontrollit

Kuhunkin testiin pitäisi normaalisti sisällyttää ryhmä eläimiä, joita käsitellään positiivisella kontrollikemikaalilla. Tästä voidaan poiketa, jos testilaboratorio on osoittanut olevansa pätevä tekemään testin ja se on vahvistanut aikaisemman positiivisen kontrollin vaihteluvälin. Kun rinnakkaista positiivisen kontrollin ryhmää ei ole, kuhunkin kokeeseen on sisällytettävä pisteytyskontrollit (kiinteät ja värjätyt objektilasit). Nämä voidaan saada sisällyttämällä tutkimuksen pisteytykseen asianmukaiset vertailunäytteet, jotka on saatu ja joita säilytetään erillisestä määräajoin (esim. 6–18 kuukauden välein) tehtävästä positiivisen kontrollin kokeesta laboratoriossa, jossa koe tehdään; esimerkiksi pätevyyden testaamisen aikana ja säännöllisesti tämän jälkeen, jos tätä tarvitaan.

Positiivisten kontrollikemikaalien pitäisi luotettavasti tuottaa havaittavaa lisääntymistä rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuudessa spontaanitasoon verrattuna. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti laskijoille koodattujen näytteiden identiteettiä. On hyväksyttävää, että positiivinen kontrolliaine annetaan eri reittiä kuin testikemikaali käyttäen eri käsittelyaikataulua, ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää tarvittaessa samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita. Taulukkoon 1 sisältyy esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista

Kemikaali	CAS-nro
Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0
Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3
Etyylinitrosourea	759-73-9
Mitomysiini C	50-07-7
Syklofosfamidi (monohydraatti)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietyleenimelamiini	51-18-3

▼M7

Negatiiviset kontrollit

Negatiivisen kontrolliryhmän eläimet on sisällytettävä jokaiseen näytteenottokertaan ja niitä tulisi käsitellä aivan samalla tavalla kuin tutkimusryhmiä, paitsi ettei niitä altisteta testikemikaalille. Jos testikemikaalin annostelussa käytetään liuotinta/kantaja-ainetta, kontrolliryhmän pitää saada tätä liuotinta/kantaja-ainetta. Kuitenkin, jos aikaisemmista negatiivisen kontrollin tiedoista kullakin näytteenottokerralla testilaboratoriossa käy ilmi johdonmukaisia eläinten välisiä eroja ja rakenteellisia poikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuutta, negatiivista kontrollia varten voidaan tarvita vain yksi näytteenotto. Kun negatiiviseen kontrolliin käytetään yhtä näytteenottoa, kyse pitäisi olla tutkimuksessa käytetystä ensimmäisestä näytteenottokerrasta.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

Mikrotuman vaste on yleensä samanlainen uros- ja naaraspuolisilla eläimillä (9) ja on odotettavissa, että tämä pätee myös rakenteellisiin kromosomipoikkeavuuksiin; tästä syystä useimmat tutkimukset voidaan suorittaa kumpaakin sukupuolta käyttäen. Tiedot, jotka osoittavat merkittäviä eroja urosten ja naaraiden välillä (esim. systeemisen toksisuuden, aineenvaihdunnan, biologisen saatavuuden, luuytimeen liittyvän toksisuuden erot, mukaan lukien esimerkiksi raja-annostutkimus) voisivat kannustaa käyttämään molempia sukupuolia. Tässä tapauksessa voi olla tarkoituksenmukaista tehdä tutkimus molemmilla sukupuolilla esim. osana toistuvan annostelun toksisuustutkimusta. Molempia sukupuolia käytettäessä saattaa olla tarkoituksenmukaista tehdä yhdistelykoe. Tarkempia tietoja siitä, miten tietoja yhdistelykokeessa analysoidaan, annetaan lisäyksessä 2.

Ryhmäkoot varmistetaan tutkimuksen alussa, jotta tarjotaan vähintään viisi tutkimukseen soveltuvaa yhtä sukupuolta edustavaa eläintä, tai kustakin sukupuolesta (jos kumpiakin käytetään) ryhmää kohti. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemikaalille voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä. Ohjeelliseksi maksimimääräksi eläimiä koskevien vaatimusten osalta annetaan, että luuydintutkimus tehdään kahdella näytteenottokerralla, kolmella annosryhmällä ja rinnakkaisella negatiivisella kontrolliryhmällä (kussakin ryhmässä on viisi samaa sukupuolta edustavaa eläintä), ts. tarvitaan 45 eläintä.

Annostasot

Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska sopivia tietoja ei ole vielä käytettävissä annoksen valinnan opastukseen, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa (10). Tutkimuksessa on pyrittävä tunnistamaan suurin siedetty annos, joka määritellään korkeimmaksi annokseksi, jota siedetään ilman näyttöä tutkimusta rajoittavasta toksisuudesta suhteessa tutkimuksen kestoon (esim. se aiheuttaa ruumiinpainon laskua tai vertavuotavan kudoksen sytotoksisuutta), mutta joka ei aiheuta kuolemaa eikä kipua, tuskaa tai kärsimystä, jonka vuoksi eläin on lopetettava inhimillisesti (11).

Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin toksisuuteen viittaavia muutoksia luuytimessä.

Kemikaalit, jotka osoittavat toksikokineettisten ominaisuuksien saturaation tai aiheuttavat detoksikaatioprosesseja, jotka voivat johtaa altistuksen vähenemiseen pitkäaikaisen käsittelyn jälkeen, voivat muodostaa poikkeuksen annoksenmääritykriteereihin, ja niitä on arvioitava tapauskohtaisesti.

Jotta saadaan annosvastetiedot, täydelliseen tutkimukseen on sisällyttävä negatiivisen kontrollin ryhmä ja vähintään kolme annostelutasoa, jotka yleensä erotetaan kertoimella 2, mutta enintään kertoimella 4. Jos testikemikaali ei aiheuta toksisuusvaikutusta annoksenmääritystutkimuksessa tai olemassa olevien tietojen perusteella, suurin annos kerta-annostelulle pitäisi olla 2 000 mg/painokilo. Jos

▼M7

testikemikaali aiheuttaa toksisuusvaikutuksen, suurimman siedetyn annoksen pitäisi olla korkein annettava annos, ja käytettävien annostasojen olisi mieluiten katettava vaihteluväli maksimista annokseen, jonka toksisuusvaikutus on vähäinen tai jolla ei ole toksisuusvaikutusta. Kun kohdekudoksen (luuytimen) toksisuusvaikutus havaitaan kaikilla testatuilla annostasoilla, on suositeltavaa tehdä täydentävä tutkimus ei-toksisilla annoksilla. Tutkimukset, joiden tarkoituksena on kuvata täydellisesti määrällisiä annos-vastetietoja, voivat vaatia täydentäviä annosryhmiä. Nämä rajat voivat vaihdella tietyntyyppisten testikemikaalien osalta (esim. ihmisten lääkkeet), jotka kuuluvat erityisten vaatimusten piiriin.

Raja-annostesti

Jos pitoisuusalueenmäärittelykokeet tai olemassa olevat tiedot vastaavista eläinkannoista osoittavat, että vähintään raja-annokseen (kuvattu jäljempänä) perustuva altistusohjelma ei tuota havaittavia toksisuusvaikutuksia (ei esim. luuytimeen liittyvän proliferaation vähentymistä tai muita todisteita kohdekudoksen sytotoksisuudesta), ja jos genotoksisuuden ei oleteta perustuvan *in vitro* -genotoksisuustutkimuksiin tai tietoihin rakenteellisesti samankaltaisista kemikaaleista, täydellistä tutkimusta kolmella annostasolla ei ehkä pidetä tarpeellisena, mikäli on osoitettu, että testikemikaalit saavuttavat kohdekudoksen (luuytimen). Tällaisissa tapauksissa yksi annostaso raja-annoksena saattaa riittää. Kun annostelu kestää yli 14 päivää, annos on 1 000 mg/painokiloa/päivä. Kun annostelu kestää korkeintaan 14 päivää, annos on 2 000 mg/painokiloa/päivä.

Antotapa

Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi perustelluksi altistusreitiksi voidaan valita esim. ravinto tai juomavesi, ihonalainen, suonensisäinen, oraalinen (letkuruokinnalla), altistus hengitysteitse, henkitorven tai implantaation kautta kulkeva reitti. Joka tapauksessa reitti on valittava, jotta varmistetaan kohdekudosten riittävä altistus. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, koska se ei ole tarkoitettu ihmisen altistumisreitiksi, ja sitä tulisi käyttää vain erityisten tieteellisten perustelujen nojalla. Jos testikemikaali sekoitetaan ravintoon tai juomaveteen, varsinkin jos kyse on yhdestä annoksesta, vaikutuksien havaitsemiseksi on huolehdittava siitä, että viive ravinnon ja veden kulutuksen ja näytteenoton välillä on riittävä (ks. 33–34 kohta). Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa normaalisti ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä enimmäistilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Tätä suurempien määrien käyttö on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä testikemikaaleja, joiden vaikutukset yleensä pahenevat korkeammilla pitoisuuksilla, testikemikaalimäärän vaihtelu on minimoitava säätämällä pitoisuutta, jotta annostelun vakiotilavuus suhteessa ruumiinpainoon taataan kaikilla annostasoilla.

Altistusohjelma

Testikemikaalit annetaan yleensä yhtenä annoksena, mutta ne voidaan myös jakaa eri annoksiin (ts. kaksi tai useampaa altistuskertaa samana päivänä korkeintaan 2–3 tunnin välein), mikä helpottaa suurten määrien antamista. Näissä olosuhteissa, tai testikemikaalia hengitysteitse annettaessa, näytteenottoaika tulee ajoittaa edellisen annostelun tai altistuksen päättymisajan perusteella.

On vain vähän tietoa toistuvan annostelun menetelmän soveltuvuudesta tähän testiin. Olosuhteissa, joissa tämä testi halutaan sisällyttää toistuvan annostelun toksisuustutkimukseen, on pyrittävä välttämään kromosomivaurioisten mitoosissa olevien solujen menettäminen, mikä voi sattua toksisia annoksia käytettäessä.

▼M7

Sisällyttäminen on hyväksyttävää, kun korkein annos on suurempi tai yhtä suuri kuin raja-annos (ks. 29 kohta) ja annosryhmälle annetaan raja-annos koko altistusajan. Mikrotumatestiä (testimenetelmä B.12) on pidettävä soveltuvimpana kromosomipoikkeavuuksien *in vivo* -testinä, kun tällainen halutaan sisällyttää muihin tutkimuksiin.

Luuydinnäytteet on otettava kahtena eri ajankohtana eri altistuskertojen jälkeen. Jyrsijöillä ensimmäisen näytteenottovälin keston pitäisi olla 1,5 normaaliin solusykliin kuluva aika (solusykli on normaalisti 12–18 tuntia altistuksen jälkeen). Koska testikemikaalien soluunottoon ja metaboloitumiseen kuluva aika ja sen vaikutus solusyklin kinetiikkaan voi muuttaa kromosomipoikkeavuuksien optimaalista havaitsemisajankohtaa, myöhempi näyte tulisi kerätä 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä näytteestä. Ensimmäisellä näytteenottokerralla kaikkia annosryhmiä on altistettava ja näytteitä on kerättävä analyysiin; myöhemmillä näytteenottokerroilla tarvitsee ainoastaan antaa korkein annos. Jos tutkittavaa ainetta annetaan tieteellisen perusteen nojalla pidempään kuin yhden päivän ajan, yleensä on otettava yksi näyte korkeintaan noin 1,5 normaalin solusyklin kuluttua viimeisestä altistusajankohdasta.

Käsittelyn jälkeen ja ennen näytteenottoa eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos ainetta, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esim. colcemidia tai kolkisiinia), ja näytteet kerätään sen jälkeen sopivin välein. Hiirillä väli on noin 3–5 tuntia ennen keräämistä ja rotilla 2–5 tuntia. Solut kerätään luuytimestä, saatetaan turpoamaan, fiksoidaan, värjätään ja analysoidaan kromosomipoikkeavuuksien toteamiseksi (12).

Havainnot

Koe-eläimiä koskevia yleisiä kliinisiä havaintoja tulee tehdä ja kliinisiä oireita tulee kirjata ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa annostelun aikana. Eläimet on punnittava tutkimuksen alussa ja vähintään kerran viikossa toistuvan annoksen tutkimuksissa ja lopetettaessa. Vähintään viikon kestävissä tutkimuksissa ravinnonkulutuksen mittaus on tehtävä vähintään viikoittain. Mikäli testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutusta on mitattava, kun vesi vaihdetaan tai ainakin kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta myrkytysvaikutuksesta, on lopetettava inhimillisesti ennen tutkimusajan päättymistä (11).

Kohdekudoksen altistaminen

Verinäyte on otettava sopivana ajankohtana, jotta voidaan tutkia testikemikaalien plasmatasot luuytimen altistumisen osoittamiseksi, jos tämä on perusteltua ja jos muita altistustietoja ei ole (ks. 44 kohta).

Luuydin- ja kromosomipreparaatit

Heti inhimillisen lopettamisen jälkeen luuytimen solut otetaan eläinten reisi- tai sääriluista, pannaan hypotoniseen liuokseen ja fiksoidaan. Tämän jälkeen metafaasissa olevat solut levitetään objektilaseille ja värjätään vakiintuneilla menetelmillä (ks. (3) (12)).

▼M7

Analyysi

Kaikki objektilasit, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen tutkimusta ja jaettava satunnaisotannalla siten, että laskija ei tiedä altistusolosuhteista.

Mitoosi-indeksi on määritettävä sytotoksisuuden mittana vähintään 1 000 solusta eläintä kohti kaikista tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä (myös positiivisista kontrolleista), käsittelemättömistä tai kantaja-aineen/liuottimen negatiivisen kontrollin eläimistä.

Jokaista eläintä kohti tulisi analysoida vähintään 200 metafaasia rakenteellisista kromosomipoikkeavuuksista mukaan lukien ja ilman aukkoja (gaps) (6). Jos aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta kuitenkin osoittaa, että keskimääräisen kromosomipoikkeavuuksien taustaesiintyvyys on < 1 % testilaboratoriossa, on harkittava ylimääräisten solujen pisteytystä. Kromatidityyppiset ja kromosomityyppiset poikkeavuudet on kirjattava erikseen ja luokiteltava alatyypin mukaan (katkeamiset, vaihdokset). Laboratoriossa käytettävillä menettelyillä varmistetaan, että kromosomipoikkeavuuden analyysin tekevät hyvin koulutetut laskijat ja niitä vertaisarvioidaan tarvittaessa. Koska objektilasien valmistelu johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja siten kromosomien menettämiseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua 2n ± 2, jossa haploidinen kromosomiluku on n kyseisen lajin osalta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot on esitettävä taulukossa. Jokaisen eläimen osalta on arvioitava mitoosi-indeksi, laskettujen metafaasissa olevien solujen lukumäärä, poikkeavuuksien lukumäärä solua kohti ja niiden solujen prosentuaalinen osuus, joissa on yksi tai useampia rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia. Erityyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava, ja niiden lukumäärä ja esiintymistaajuus koe- ja kontrolliryhmien osalta on ilmoitettava. Aukot (gaps) sekä polyploidiset solut ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävät solut on rekisteröitävä erikseen. Aukkojen esiintymistaajuus ilmoitetaan, mutta sitä ei yleensä sisällytetä rakenteellisten poikkeavuuksien kokonaistaajuuden analyysiin. Ellei viitteitä sukupuolten välisistä vaste-eroista ole havaittavissa, tiedot voidaan yhdistää tilastollista analyysiä tehtäessä. Eläinten toksisuustiedot ja kliiniset oireet on myös raportoitava.

Hyväksyttävyysperusteet

Testin hyväksyttävyys määritetään seuraavilla kriteereillä:

a) Rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tietoja pidetään hyväksyttävinä lisättäviksi laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan (ks. 11–14 kohta).

b) Rinnakkaisten positiivisten kontrollien tai pisteytysvalvonnan on indusoitava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna negatiiviseen kontrolliin (ks. 20–21 kohta).

c) Asianmukainen määrä annoksia ja soluja on analysoitu.

d) Perusteet suurimman annoksen valitsemiseksi ovat yhdenmukaisia 25–28 kohdassa kuvattujen perusteiden kanssa.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, mikäli:

▼M7

a) ainakin yhdessä tutkimusryhmässä solujen rakenteellisten kromosomimuutoksien (paitsi aukot) taajuus on lisääntynyt tilastollisesti merkittävällä tavalla verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b) lisäys riippuu annoksesta ainakin yhdellä näyttöönottokerralla, kun sitä arvioidaan asianmukaisen trenditestin kanssa

c) jokin tuloksisista on aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat).

Jos vain suurinta annosta tutkitaan tietyllä näytteenottokerralla, testikemikaalia pidetään selvästi positiivisena, mikäli esiintyy tilastollisesti merkittävää kasvua rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna ja tulokset ovat aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat). Lähdekirjallisuudessa on suosituksia sopiville tilastomenetelmille (13). Kun tehdään annos–vaste-analyysi, on analysoitava ainakin kolmea altistettua annosryhmää. Tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä on käytettävä eläintä. Kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että testikemikaali aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä.

Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, jos kaikissa tutkituissa koeolosuhteissa:

a) yhdessäkään tutkimusryhmässä solujen rakenteellisten kromosomimuutoksien (lukuun ottamatta aukkoja [gaps]) taajuus ei ole lisääntynyt tilastollisesti merkittävällä tavalla verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b) annoksesta riippuvaa lisääntymistä ei esiinny millään näytteenottokerralla asianmukaisella trenditestillä arvioituna

c) kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman puitteissa (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat), ja

d) luuydin on altistunut testikemikaaleille.

Lähdekirjallisuudessa on suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (13). Näyttöön luuytimen altistumisesta testikemikaalille voi sisältyä mitoosi-indeksin alentuminen tai testikemikaalien plasman tai veritasojen mittaus. Laskimonsisäisen annostelun tapauksessa näyttöä altistumisesta ei tarvita. Vaihtoehtoisesti luuytimen altistumisen osoittamiseen voidaan käyttää samalla altistustavalla ja samalla eläinlajilla tehdyn riippumattoman tutkimuksen tietoja. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava kemikaali aiheuta koeolosuhteissa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä.

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea (esim. heikko tai rajatapaukseksi luokiteltava lisäys), tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvioinnissa ja/tai loppuun saatettuihin kokeisiin liittyvissä lisätutkimuksissa. Useampien solujen analysointi tai toistokokeen suorittaminen mahdollisesti käyttämällä mukautettuja koeolosuhteita voi olla joissakin tapauksissa hyödyllistä.

▼M7

Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia, ja sen vuoksi tutkimusta pidetään epäselvänä.

Polyploidisten ja/tai endoreduplikoituneiden solujen metafaasien esiintymistaajudet metafaasissa olevien solujen kokonaismäärässä on rekisteröitävä erikseen. Polyploidisten/endoreduplikoituneiden solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaaleilla pystytään estämään mitoottisia prosesseja tai solysyklin etenemistä (ks. 3 kohta).

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Yhteenveto

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut asiaankuuluvat fysikokemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa ja sen mukaan kuin on mahdollista, epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot ja niin edelleen.

Useista aineosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistaajuuden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testikemikaalin valmistus

— kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulointien analyyttiset määritelmät (kuten stabiilius, homogeenisyys, nimelliset pitoisuudet), kun niitä käytetään.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen käytölle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— menettely eläinten yksilölliseksi tunnistamiseksi

— lyhytkestoisissa tutkimuksissa: kunkin eläimen paino kokeen alkaessa ja päättyessä; yli viikon kestävissä tutkimuksissa: kunkin eläimen paino tutkimuksen aikana ja ravinnonkulutus. Kunkin ryhmän painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta on sisällytettävä kokeeseen.

▼M7

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— altistustavan ja annostelun keston valintaperusteet

— menetelmät, joilla on vahvistettu testikemikaalin pääsy yleiseen verenkiertoon tai luuytimeen

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— lopettamistapa

— kivunlievitysmenetelmä (jos sitä on käytetty)

— yksityiskohtaiset tiedot koe- ja näyteaikataulusta ja perustelut valinnoille

— objektilasien valmistusmenetelmät

— toksisuuden mittausmenetelmät

— metafaasin estämiseen käytetty kemikaali, sen pitoisuus, annos ja altistusaika ennen näytteenottoa

— menetelmät eristää ja säilöä näytteitä

— kromosomipoikkeavuuksien laskentaperusteet

— analysoitujen metafaasissa olevien solujen lukumäärä eläintä kohti ja mitoosi-indeksin määrittelyyn analysoitujen solujen määrä

— tutkimuksen hyväksyvyyttä koskevat perusteet

— perusteet, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana, mukaan lukien toksisuusoireet

— mitoosi-indeksi jokaisen eläimen osalta erikseen

— kromosomipoikkeavuuksien ja aberanttien solujen tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen

— kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat

— kromosomipoikkeavuuksia sisältäneiden solujen lukumäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy, mukaan lukien polyploidian ja/tai endoreduplikoituneiden solujen esiintymistaajuudet

▼M7

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät

— tiedot, jotka osoittavat luuytimen altistumisen

— rinnakkaisista negatiivisista ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat

— aikaisemman negatiivisen ja positiivisen kontrollin tiedot, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat, 95 prosentin kontrollirajat jakaumille sekä katettu aika ja havaintojen määrä

— perusteet positiiviselle tai negatiiviselle vasteelle.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

Viitteet.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (toim.), IRL Press, Washington, DC, s. 275–306.

(3) Preston, R.J. *et al*. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, s. 157–165.

(4) Richold, M. *et al*. (1990), *In vivo* Cytogenetics Assays, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115–141.

(5) Tice, R.R. *et al*. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, s. 305–312.

(6) Adler, I.D. *et al*. (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, s. 19–30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 87–90.

(9) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, s. 293–304.

(10) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, s. 313–319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, s. 147–163.

(13) Lovell, D.P. *et al*. (1989), Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

▼**M7**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aneuploidia: kaikki yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen jälkeen tuma ei etene mitoosiin vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, … kromatidia.

Gap: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidien siirtymä.

Kemikaali: aine tai seos.

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla mitoosissa olevien solujen luku solupopulaation solujen kokonaismäärällä, joka on kyseisen solupopulaation proliferaatioasteen mitta.

Numeerinen poikkeavuus: testissä käytetyille eläimille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä (aneuploidia).

Polyploidia: numeerinen kromosomipoikkeavuus, joka liittyy muutokseen koko kromosomiston määrässä, toisin kuin numeerinen muutos osassa kromosomistoa (ks. aneuploidia).

Rakenteellinen kromosomipoikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

Sentromeeri: kromosomin alue (alueita), joihin sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärkromosomien järjestäytynyt siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Testikemikaali: aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M7

Lisäys 2

YHDISTELYKOE SUKUPUOLTEN EROJEN TUNNISTAMISEKSI *IN VIVO* -KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTISSÄ

Yhdistelykoe ja sen analysointi

Tässä kokeessa vähintään 5 urosta ja 5 naarasta testataan kullakin pitoisuustasolla, mikä johtaa koemalliin, jossa käytetään vähintään 40 eläintä (20 urosta ja 20 naarasta sekä asiaankuuluvat positiiviset kontrollit).

Tämä koe, joka on yksi yksinkertaisimmista yhdistelykokeista, vastaa kaksisuuntaista varianssianalyysia, jossa sukupuoli ja pitoisuustaso ovat tärkeimmät vaikutukset. Tietoja voidaan analysoida käyttäen monia vakiintuneita tilastollisia ohjelmistopaketteja, kuten SPSS, SAS, STATA, Genstat ja R.

Tietoihin liittyvä vaihtelu ositetaan analyysissa sukupuolten ja pitoisuuksien väliseksi sekä sukupuolten ja pitoisuuksien väliseen vuorovaikutukseen liittyväksi vaihteluksi. Kutakin perustetta testataan rinnakkaisten eläinten välisen vaihtelevuuden arvion perusteella samaa sukupuolta edustavissa eläinryhmissä, joille annetaan sama pitoisuus. Täydelliset tiedot menetelmästä annetaan useissa vakiintuneissa tilastollisissa oppikirjoissa (ks. viitteet) ja tilastopakettien tukitoiminnoissa.

Analyysissä tutkitaan sen jälkeen sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutustermi ANOVA-taulukossa ([1]). Merkitsevän yhdysvaikutustermin puuttuessa sukupuolten tai pitoisuustasojen yhdistetyt arvot ovat tasojen välisiä valideja tilastollisia testejä ANOVA-taulukon ryhmän sisäisen yhdistetyn vaihtelutekijän pohjalta.

Analyysi jatkuu siten, että arvio pitoisuuksien välisestä vaihtelusta jaetaan kontrasteihin, joista saadaan testi vasteiden lineaarisille ja kvadraattisille kontrasteille eri pitoisuustasoilla.. Kun sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutus on merkittävä, tämä termi voidaan myös osittaa sukupuoleen x liittyviksi lineaarisiksi ja sukupuoleen x liittyviksi kvadraattisiksi interaktiokontrasteiksi. Näiden tekijöiden perusteella voidaan testata, onko sukupuolten pitoisuusvaste rinnakkainen vai onko sukupuolten välillä vaste-eroa.

Arviota ryhmän sisäisestä yhdistetystä vaihtelusta voidaan käyttää keskiarvojen erotuksen parittaiseen testaukseen. Näitä vertailuja voitaisiin tehdä kummankin sukupuolen keskiarvojen välillä sekä eri pitoisuustasojen keskiarvojen välillä, kuten negatiivisten kontrollitasojen kanssa. Kun yhdysvaikutus on merkitsevä, vertailuja voitaisiin tehdä eri pitoisuuksia saaneen yhden sukupuolen keskiarvojen välillä tai samaa pitoisuutta saaneiden molempien sukupuolten keskiarvojen välillä.

Viitteet

Asiasta on laadittu monia tilastollisia oppikirjoja, joissa käsitellään yhdistelmäkokeiden – jotka vaihtelevat yksinkertaisimmista kaksifaktorianalyyseistä kokeiden suunnittelumetodologiassa käytettyihin monimutkaisimpiin analyyseihin – teoriaa, suunnittelua, metodologiaa, analyysia ja tulkintaa. Seuraava luettelo ei ole tyhjentävä.. Joissain annetaan esimerkkejä vertailukelpoisista malleista ja joissakin tapauksissa annetaan koodit analyysien tekemiseen erilaisia ohjelmistoja hyödyntämällä.

([1]) Tilastotieteilijät, jotka käyttävät mallintamiseen perustuvaa lähestymistapaa, kuten yleistettyjä lineaarisia malleja, voivat tarkastella analyysia erilaisella, mutta vertailukelpoisella tavalla, mutta eivät välttämättä tee päätelmiä perinteisestä ANOVA-taulukosta, jonka juuret juontuvat ennen tietokoneita kehitettyihin tilastotieteen laskennan algoritmisiin lähestymistapoihin.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. NISÄKKÄIDEN ERYTROSYYTTIMIKROTUMATESTI

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 474 (2016). Se on osa geneettisen toksikologian testimenetelmiä. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1).

Nisäkkäillä *in vivo* -mikrotumatesti on erityisen relevantti genotoksisuuden arvioinnissa, koska vaikka lajien välillä voi olla vaihtelua, *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin liittyvät tekijät ovat aktiivisia ja voivat vaikuttaa vasteisiin. *In vivo* -analyysi on hyödyllinen myös *in vitro* -koejärjestelmässä havaitun genotoksisuuden jatkotutkimuksena.

Nisäkkäiden *in vivo* -mikrotumatestiä käytetään tutkittavan aineen aiheuttamien kromosomivaurioiden tai mitoosilaitteen vaurioiden toteamiseen erytroblasteissa. Testissä arvioidaan mikrotumien muodostumista erytroblasteissa analysoimalla eläinten, yleensä jyrsijöiden, luuytimen soluja tai perifeerisiä verisoluja.

Mikrotumatestin tarkoituksena on tunnistaa sellaisia sytogeneettisiä vaurioita aiheuttavat kemikaalit, jotka johtavat hitaasti liikkuvia (lagging) kromosomifragmentteja tai kokonaisia kromosomeja sisältävien mikrotumien muodostumiseen.

Kun luuytimen erytroblasti kehittyy punasolun esiasteeksi (johon viitataan joskus polykromaattisena punasoluna tai retikulosyyttinä), päätuma irtoaa solusta, ja mahdollinen muodostunut mikrotuma saattaa jäädä muutoin tumattomaan solulimaan. Päätuman puuttuminen helpottaa mikrotumien havaitsemista näissä soluissa. Mikrotumaisten punasolujen esiasteiden suurentunut esiintymistaajuus altistetuilla eläimillä osoittaa tutkittavan aineen aiheuttaman rakenteellisen tai numeerisen kromosomipoikkeavuuden.

Vasta muodostuneet punasolut tunnistetaan ja kvantifioidaan värjäämällä, mitä seuraa joko visuaalinen pisteytys mikroskooppia käyttäen, tai automaattinen analyysi. Täysikasvuisten eläinten perifeerisessä veressä tai luuytimessä olevien punasolujen esiasteiden riittävän määrän laskentaa helpottaa automaattinen laskentajärjestelmä. Tällaiset järjestelmät ovat hyväksyttäviä vaihtoehtoja manuaaliselle arvioinnille (2). Vertailevat tutkimukset ovat osoittaneet, että tällaisilla menettelyillä, asianmukaisia kalibrointistandardeja käyttämällä, voidaan tarjota parempi toistettavuus ja herkkyys samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa manuaaliseen mikroskooppipisteytykseen verrattuna (3) (4). Automaattiset järjestelmät, joilla voidaan mitata mikrotumaisten punasolujen taajuudet ovat (mutta eivät pelkästään) virtaussytometrit (5), kuva-analyysijärjestelmät (6) (7), ja laserskannaukseen perustuvat sytometrit (8).

Kromosomifragmentit voidaan erottaa kokonaisista kromosomeista useiden perusteiden perusteella, vaikka tätä ei normaalisti tehdä osana testiä. Näitä ovat kinetokorin tai sentromeerisen DNA:n (jotka ovat tyypillisiä ehjille kromosomeille) esiintymisen tai puuttumisen osoittaminen. Kinetokorin tai sentromeerisen DNA:n puuttuminen osoittaa, että mikrotuma sisältää ainoastaan kromosomifragmentteja, ja sen olemassaolo osoittaa kromosomin häviämisen.

Käytettyjen termien määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

▼M7

ALUSTAVAT HUOMIOT

Nuorten täysikasvuisten jyrsijöiden luuydin on kohdekudos geneettisille vaurioille tässä testissä, koska tässä kudoksessa muodostuvat punasolut. Punasolujen esiasteiden mikrotumien mittaus perifeerisessä veressä on hyväksyttävää muissa nisäkäslajeissa, joiden osalta on osoitettu, että ne ovat riittävän herkkiä havaitsemaan kemikaalit, jotka aiheuttavat rakenteellisia tai numeerisia kromosomipoikkeavuuksia näissä soluissa (indusoimalla mikrotumia punasolujen esiasteissa), ja joiden tapauksessa annetaan tieteelliset perusteet. Mikrotumaisten epäkypsien punasolujen esiintymistaajuus on pääasiallinen päätepiste. Sellaisten kypsien punasolujen taajuus, jotka sisältävät mikrotumia perifeerisessä veressä, voidaan myös käyttää päätepisteenä lajeissa, joilla ei ole vahvaa pernassa tapahtuvaa valintaa mikrotumaisilla soluilla, ja kun eläimet altistetaan yhtäjaksoisesti käytettyjen lajien punasolujen eliniän ylittävän ajan (esim. 4 viikkoa tai enemmän hiirillä).

Jos on saatu viitteitä siitä, etteivät testikemikaalit tai niiden metaboliitit pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, tarjoaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos tarjoaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Eläimet altistetaan testikemikaalille sopivaa antotapaa käyttäen. Jos käytetään luuydintä, eläimet lopetetaan inhimillisesti sopivan ajan kuluttua altistuksesta, luuytimestä otetaan näyte, ja preparaatit valmistetaan ja värjätään (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Käytettäessä perifeeristä verta verinäytteet otetaan sopivina ajankohtina altistuksen jälkeen, tehdään valmistelut ja värjätään (12) (16) (17) (18). Kun annos annetaan akuutisti, on tärkeää valita luuytimen tai veren näytteenotto aikoina, jolloin mikrotumaisten punasolujen esiasteiden käsittelyyn liittyvä induktio voidaan havaita. Kun kyse on perifeerisen veren näytteenotosta, näiden tapahtumien välillä on myös oltava kulunut tarpeeksi aikaa, jotta ne voidaan havaita kiertävässä veressä. Mikrotumien esiintyminen analysoidaan valmisteista joko havainnoimalla mikroskooppia, kuva-analyysijärjestelmää, virtaussytomeriä käyttäen tai laskerskannaukseen perustuvaa sytometria käyttäen.

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

Pätevyyttä koskevat tutkimukset

Jotta laboratoriolla voidaan todeta olevan riittävä kokemus testistä ennen sen käyttöä rutiinitestauksessa, laboratorion on osoitettava, että se voi tuottaa odotettavissa olevat tulokset julkaistuista tiedoista (17) (19) (20) (21) (22) mikrotumien taajuuden mittaamiseen vähintään kahdella positiivisella kontrollikemikaalilla (mukaan lukien heikot vasteet, joita indusoivat pienet määrät positiivista kontrollikemikaalia), kuten ne, jotka luetellaan taulukossa 1 ja yhdessä yhteensopivien kantaja-aine-/liuotinkontrollien kanssa (ks. 26 kappale). Näissä kokeissa pitää käyttää annoksia, joista aiheutuu toistettavissa olevia ja annokseen liittyviä lisääntymisiä, ja niiden on osoitettava testausjärjestelmän herkkyys ja dynaaminen vaihteluväli kohdekudoksessa (luuydin tai perifeerinen veri) ja käyttää laskentamenetelmää, jota voidaan soveltaa laboratoriossa. Tätä vaatimusta ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta, eli joilla on 14–18 kohdassa määritelty laboratoriokohtainen tietokanta.

Aiemmat kontrollitiedot

Pätevyyttä koskevissa tutkimuksissa laboratorion on määriteltävä:

— aiempi positiivisen kontrollin vaihteluväli ja jakauma, ja

▼M7

— aiempi negatiivisen kontrollin vaihteluväli ja jakauma.

Hankittaessa ensin tietoja aiempien negatiivisten kontrollien jakaumaa varten, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien on oltava yhdenmukaisia julkaistujen kontrollitietojen kanssa, jos sellaisia on olemassa. Kun aikaisempien kontrollien jakaumaan lisätään enemmän kokeellisia tietoja, rinnakkaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava kyseisen jakauman 95 %:n kontrollirajojen sisälle. Laboratorion aikaisempia negatiivisia kontrolleja koskevan tietokannan pitäisi olla tilastollisesti vankka, jotta varmistetaan laboratorion kyky arvioida negatiivisten kontrollitietojensa jakaumaa. Lähdekirjallisuuden mukaan voidaan tarvita vähintään 10 koetta, mutta mieluiten olisi tehtävä ainakin 20 koetta vastaavanlaisissa koeolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (23)), kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja osoittaakseen, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän. Lisäsuosituksia aikaisempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aikaisempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksyttävyysperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (24).

Jos laboratorio ei suorita loppuun riittävää määrää kokeita tilastollisesti vankan negatiivisen kontrollin jakauman osoittamiseksi (ks. 15 kohta) pätevyyttä koskevissa tutkimuksissa (kuvataan 13 kohdassa), on hyväksyttävää, että jakauma voidaan luoda ensimmäisten rutiinitutkimuksien aikana. Tässä lähestymistavassa pitäisi noudattaa lähdekirjallisuudessa (24) esitettyjä suosituksia ja negatiivisen kontrollin tuloksia, ja näissä kokeissa saatujen negatiivisten kontrollien tulosten on oltava julkaistujen negatiivisten kontrollien tuloksien mukaisia.

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon, miten ne vaikuttavat tuloksena olevien tietojen yhdenmukaisuuteen laboratorion olemassa olevan aiempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa. Vain merkittävien epäjohdonmukaisuuksien perusteella on luotava uusi aiempien kontrollien tietokanta, jos asiantuntija-arviossa määritetään, että se eroaa edellisestä jakaumasta (ks. 15 kohta). Sen uudelleenluonnin aikana täysimittaista negatiivisten kontrollien tietokantaa ei ehkä tarvita varsinaisen testin suorittamiseen, jos laboratorio voi osoittaa, että sen rinnakkaisen negatiivisen kontrollin arvot ovat yhdenmukaisia aiemman tietokannan tai vastaavien julkistettujen tietojen kanssa.

Negatiivisen kontrollin tietojen tulisi koostua kunkin eläimen mikrotumaisten epäkypsien punasolujen esiintyvyydestä. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 %:n kontrollirajojen sisälle. Jos rinnakkaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 %:n kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisemman kontrollien jakaumaan edellyttäen, etteivät ne ole äärimmäisiä harha-arvoja ja että on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 15 kohta), ja ettei ole kyse teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

MENETELMÄN KUVAUS

Valmisteet

Eläinlajin valinta

Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Hiiriä, rottia tai muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Kun käytetään perifeeristä verta, on osoitettava, että mikrotumaisten solujen poistuminen verenkierrosta pernassa ei vaaranna aiheutettujen mikrotumien havaitsemista valitussa lajissa. Tämä on selkeästi osoitettu hiiren ja rotan perifeerisessä veressä (2). Raportissa on esitettävä tieteelliset perustelut

▼M7

muiden lajien kuin rottien ja hiirten käytöstä. Jos käytetään muita lajeja kuin jyrsijöitä, on suositeltavaa, että indusoitujen mikrotumien mittaus sisällytetään toiseen sopivaan toksisuustestiin.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

Jyrsijöiden tapauksessa koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden olisi mieluiten oltava 50–60 prosenttia, sen olisi oltava ainakin 40 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Tilassa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Jyrsijät on sijoitettava samaa sukupuolta ja käsittelyryhmää edustaviin pienryhmiin (enintään viisi häkkiä kohti), jos mitään aggressiivista käytöstä ei odoteta, mieluiten kiinteisiin lattiahäkkeihin, joissa on asianmukainen virikkeellinen ympäristö. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin ainoastaan, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

Yleensä käytetään nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä (jyrsijät ovat mieluiten 6–10 viikon ikäisiä käsittelyn alussa, joskin hieman vanhemmat eläimet hyväksytään) ja ne jaetaan satunnaistetusti testi- ja kontrolliryhmiin. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti inhimillisellä minimaalisen invasiivisella toimenpiteellä (esim. rengastamalla, merkitsemällä, mikrosirulla tai biometrisellä tunnuksella, mutta ei korvia tai varpaita leikkaamalla) ja sopeuttamalla laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Ristikontaminaatiota positiivisella kontrollilla ja testikemikaalilla tulisi välttää. Tutkimuksen alkaessa eläinten painonvaihtelun on oltava vähäistä, ja se saa vaihdella korkeintaan ± 20 % kunkin sukupuolen tavanomaisesta keskiarvosta.

Annosten valmistelu

Kiinteät testikemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testikemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitystien kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikokemiallisista ominaisuuksista riippuen. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Testiolosuhteet

Liuotin/kantaja-aine

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttö saa aiheuttaa mahdollisia kemiallisia reaktioita testikemikaalien kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä yhteensopivista liuottimista/kantaja-aineista ovat vesi, fysiologinen suolaliuos, metyyliselluloosaliuos, natriumkarboksimetyyliselluloosan suolaliuos, oliiviöljy ja maissiöljy. Jos ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja siitä, ettei valittu epätyypillinen liuotin/kantaja-aine aiheuta mitään mikrotumia tai muita haitallisia vaikutuksia, on tehtävä alustava tutkimus, jolla voidaan määrittää liuotin-/kantajakontrollin hyväksyttävyys.

▼M7

Kontrollit

Positiiviset kontrollit

Kuhunkin testiin pitäisi normaalisti sisällyttää ryhmä eläimiä, joita käsitellään positiivisella kontrollikemikaalilla. Tästä voidaan poiketa, jos testilaboratorio on osoittanut olevansa pätevä tekemään testin ja se on vahvistanut aikaisemman positiivisen kontrollin vaihteluvälin. Kun rinnakkaista positiivisen kontrollin ryhmää ei ole, kuhunkin kokeeseen on sisällytettävä pisteytyskontrollit (kiinteät ja värjätyt objektilasit tai solususpensionäytteet, pisteytysmenetelmän mukaisesti). Nämä voidaan saada sisällyttämällä tutkimuksen pisteytykseen asianmukaiset vertailunäytteet, jotka on saatu ja joita säilytetään erillisestä määräajoin (esim. 6–18 kuukauden välein) tehtävästä positiivisen kontrollin kokeesta; esimerkiksi pätevyyden testaamisen aikana ja säännöllisesti tämän jälkeen, jos tätä tarvitaan.

Positiivisten kontrollikemikaalien pitäisi luotettavasti tuottaa havaittavaa lisääntymistä mikrotumien esiintymistaajuudessa spontaanitasoa enemmän. Kun käytetään manuaalista pisteytystä mikroskoopilla, positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti laskijoille koodattujen näytteiden identiteettiä. On hyväksyttävää, että positiivinen kontrolliaine annetaan eri reittiä kuin testikemikaali käyttäen eri käsittelyaikataulua, ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää tarvittaessa samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita. Taulukkoon 1 sisältyy esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista:

Kemikaalit ja CAS-rekisterinumero
Etyylimetaanisulfonaatti [CAS-numero 62-50-0]
Metyylimetaanisulfonaatti [CAS-numero 66-27-3]
Etyylinitrosourea [CAS-numero 759-73-9]
Mitomysiini C [CAS-numero 50-07-7]
Syklofosfamidi (monohydraatti) [CAS-numero 50-18-0 (CAS-numero 6055-19-2)]
Trietyleenimelamiini [CAS-numero 51-18-3]
Kolkisiini [CAS-numero 64-86-8] tai vinblastiini [CAS-numero 865-21-4] – aneugeeneinä

Negatiiviset kontrollit

Negatiivisen kontrolliryhmän eläimet on sisällytettävä jokaiseen näytteenottokertaan ja niitä tulisi käsitellä aivan samalla tavalla kuin tutkimusryhmiä, paitsi ettei niitä altisteta testikemikaalille. Jos testikemikaalin annostelussa käytetään liuotinta/kantaja-ainetta, kontrolliryhmän pitää saada tätä liuotinta/kantaja-ainetta. Kuitenkin, jos aikaisemmista negatiivisen kontrollin tiedoista kullakin näytteenottokerralla testilaboratoriossa käy ilmi johdonmukaisia eläinten välisiä eroja ja mikrotumia sisältävien solujen esiintymistaajuutta, negatiivista kontrollia varten voidaan tarvita vain yksi näytteenotto. Kun negatiiviseen kontrolliin käytetään yhtä näytteenottoa, kyse pitäisi olla tutkimuksessa käytetystä ensimmäisestä näytteenottokerrasta.

▼M7

Jos käytetään perifeeristä verta, käsittelyä edeltävä näyte on hyväksyttävä rinnakkaisen negatiivisen kontrollin sijaan lyhyen aikavälin tutkimuksissa, mikäli saadut tulokset ovat testauslaboratorion aikaisempien kontrollien tietokannan mukaisia. Rotilla on osoitettu, että pienten määrien käsittelyä edeltävällä näytteenotolla (esim. alle 100 µl/päivä) on minimaalinen vaikutus mikrotuman taustataajuuteen (25).

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

Mikrotuman vaste on yleensä samanlainen uros- ja naaraspuolisilla eläimillä ja tästä syystä useimmat tutkimukset voidaan suorittaa jompaakumpaa sukupuolta käyttäen (26). Tiedot, jotka osoittavat merkittäviä urosten ja naaraiden välisiä eroja (esim. systeemisen toksisuuden, aineenvaihdunnan, biologisen saatavuuden, luuytimeen liittyvän toksisuuden erot, mukaan lukien esimerkiksi raja-annostutkimus) voisivat kannustaa käyttämään molempia sukupuolia. Tällaisessa tapauksessa voi olla tarkoituksenmukaista tehdä tutkimus molemmilla sukupuolilla esim. osana toistuvan annostelun toksisuustutkimusta. Molempia sukupuolia käytettäessä saattaa olla tarkoituksenmukaista tehdä yhdistelykoe.. Tarkempia tietoja siitä, miten tietoja yhdistelykokeessa analysoidaan, annetaan lisäyksessä 2.

Ryhmäkoot varmistetaan tutkimuksen alussa, jotta tarjotaan vähintään viisi tutkimukseen soveltuvaa yhtä sukupuolta edustavaa eläintä, tai kustakin sukupuolesta (jos kumpiakin käytetään) ryhmää kohti. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemikaalille voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä. Ohjeelliseksi maksimimääräksi eläimiä koskevien vaatimusten osalta annetaan, että luuydintutkimus tehdään 37 kohdassa vahvistettujen parametrien mukaan kolmella annosryhmällä ja rinnakkaisella negatiivisella ja positiivisella kontrolliryhmällä (kuhunkin ryhmään kuuluu viisi samaa sukupuolta olevaa eläintä), eli tarvitaan 25–35 eläintä.

Annostasot

Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole vielä käytettävissä annoksen valinnan opastukseen, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (27). Tutkimuksessa on pyrittävä tunnistamaan suurin siedetty annos, joka määritellään korkeimmaksi annokseksi, jota siedetään ilman näyttöä tutkimusta rajoittavasta toksisuudesta suhteessa tutkimuksen kestoon (esim. se aiheuttaa ruumiinpainon laskua tai vertavuotavan kudoksen sytotoksisuutta, mutta joka ei aiheuta kuolemaa eikä kipua, tuskaa tai kärsimystä, jonka vuoksi eläin on lopetettava inhimillisesti (28)).

Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa toksisuutta luuytimessä (esim. punasolujen esiasteiden osuuden pieneneminen punasolujen kokonaismäärästä luuytimessä tai perifeerisessä veressä yli 50 prosenttia, mutta vähintään 20 prosenttia vertailuarvosta). Kuitenkin, kun CD71-positiivisia soluja analysoidaan ääreisverenkierrossa (esim. virtaussytometrillä), tämä erittäin varhainen punasolujen esiasteiden fraktio vastaa toksisuuteen nopeammin kuin punasolujen esiasteiden suurempi RNA-positiivinen kohortti. Tästä syystä suurempi näennäinen toksisuus voi olla ilmeinen akuutin altistumisen malleissa, joissa tutkitaan CD71-positiivista punasolun esiasteen fraktiota verrattuna niihin, joissa punasolujen esiasteisiin liittyvä tunnistus perustuu RNA-sisältöön. Tästä syystä, kun kokeissa käytetään enintään viisi altistuspäivää, toksisuutta aiheuttavien testikemikaalien korkeimmaksi annostasoksi voidaan määritellä annos, joka aiheuttaa CD71-positiivisten punasolujen esiasteiden osuuden tilastollisesti merkittävän vähenemisen punasolujen kokonaismäärässä, mutta ei vähemmän kuin viisi prosenttia kontrollin arvosta (29).

▼M7

Kemikaalit, jotka osoittavat toksikokineettisten ominaisuuksien saturaation tai aiheuttavat detoksikaatioprosesseja, jotka voivat johtaa altistuksen vähenemiseen pitkäaikaisen annostelun jälkeen, voivat muodostaa poikkeuksen annoksenmäärityskriteereihin, ja niitä on arvioitava tapauskohtaisesti.

Jotta saadaan annosvastetiedot, täydelliseen tutkimukseen on sisällyttävä negatiivisen kontrollin ryhmä ja vähintään kolme annostelutasoa, jotka yleensä erotetaan kertoimella 2, mutta enintään kertoimella 4. Jos testikemikaali ei aiheuta toksisuusvaikutusta annoksenmääritystutkimuksessa tai olemassa olevien tietojen perusteella, suurimman annoksen vähintään 14 päivän annostelun aikana pitäisi olla 1 000 mg/painokilo/päivä tai alle 14 päivän annostelun aikana 2 000 mg/painokilo/päivä. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuusvaikutuksen, suurimman siedetyn annoksen pitäisi olla korkein annettava annos, ja käytettävien annostasojen olisi mieluiten katettava vaihteluväli maksimista annokseen, jonka toksisuusvaikutus on vähäinen tai jolla ei ole toksisuusvaikutusta. Kun kohdekudoksen (luuytimen) toksisuusvaikutus havaitaan kaikilla testatuilla annostasoilla, on suositeltavaa tehdä täydentävä tutkimus ei-toksisilla annoksilla. Tutkimukset, joiden tarkoituksena on kuvata täydellisesti määrällisiä annos-vastetietoja, voivat vaatia täydentäviä annosryhmiä. Nämä rajat voivat vaihdella tietyntyyppisten testikemikaalien osalta (esim. ihmisten lääkkeet), jotka kuuluvat erityisvaatimusten piiriin.

Raja-annostesti

Jos pitoisuusalueenmäärittelykokeet tai olemassa olevat tiedot vastaavista eläinkannoista osoittavat, että vähintään raja-annokseen (kuvattu jäljempänä) perustuva altistusohjelma ei tuota havaittavia toksisuusvaikutuksia (ei esim. luuytimeen liittyvän proliferaation vähentymistä tai muita todisteita kohdekudoksen sytotoksisuudesta), ja jos genotoksisuuden ei oleteta perustuvan *in vitro* -genotoksisuustutkimuksiin tai tietoihin rakenteellisesti samankaltaisista kemikaaleista, täydellistä tutkimusta kolmella annostasolla ei ehkä pidetä tarpeellisena, mikäli on osoitettu, että testikemikaalit saavuttavat kohdekudoksen (luuytimen). Tällaisissa tapauksissa yksi annostaso raja-annoksena saattaa riittää. Kun annostelu kestää vähintään 14 päivää, annos on 1 000 mg/painokiloa/päivä. Kun annostelu kestää alle 14 päivää, annos on 2 000 mg/painokiloa/päivä.

Antotapa

Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi perustelluksi altistusreitiksi voidaan valita esim. ravinto tai juomavesi, ihonalainen, suonensisäinen, oraalinen (letkuruokinnalla), altistus hengitysteitse, henkitorven tai implantaation kautta kulkeva reitti. Joka tapauksessa reitti on valittava, jotta varmistetaan kohdekudosten riittävä altistus. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, koska se ei ole tarkoitettu ihmisen altistumisreitiksi, ja sitä tulisi käyttää vain erityisten tieteellisien perusteiden nojalla. Jos testikemikaali sekoitetaan ravintoon tai juomaveteen, varsinkin jos kyse on yhdestä annoksesta, on huolehdittava siitä, että viive ravinnon ja veden kulutuksen ja näytteenoton välillä on riittävä, jotta vaikutukset voidaan havaita (ks. 37 kohta). Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa normaalisti ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä enimmäistilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Tätä suurempien määrien käyttö on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä testikemikaaleja, joiden vaikutukset yleensä pahenevat korkeammilla pitoisuuksilla, testikemikaalimäärän vaihtelu on minimoitava säätämällä pitoisuutta, jotta annostelun vakiotilavuus suhteessa ruumiinpainoon taataan kaikilla annostasoilla.

▼M7

Altistusohjelma

Mieluiten tehdään ainakin kaksi käsittelyä, jolloin annos annetaan 24 tunnin välein erityisesti, kun tämä testi sisällytetään muihin toksisuustutkimuksiin. Vaihtoehtoisesti voidaan antaa yksittäisiä annoksia, jos tämä on tieteellisesti perusteltua (esim. testikemikaalien tiedetään estävän solusyklin). Testikemikaalit voidaan antaa myös eri annoksina, eli kaksi tai useampaa altistuskertaa samana päivänä korkeintaan 2–3 tunnin välein, mikä helpottaa suurten määrien antamista. Näissä olosuhteissa, tai testikemikaalia hengitysteitse annettaessa, näytteenottoaika tulee ajoittaa edellisen annostuksen tai altistuksen päättymisajan perusteella.

Testi voidaan tehdä hiirillä tai rotilla kolmella eri tavalla:

a. Eläimet altistetaan testikemikaalille yhden kerran. Luuydinnäytteitä otetaan vähintään kaksi kertaa (yksittäisestä eläinryhmästä) siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 24 tunnin ja viimeinen viimeistään 48 tunnin kuluttua altistuksesta, ja näytteenottokertojen välillä on sopiva väli, ellei ole tiedossa, että testikemikaalilla on erityisen pitkä puoliintumisaika. Mikäli näytteitä otetaan aikaisemmin kuin 24 tunnin kuluttua, tämä on perusteltava. Perifeerisestä verestä otetaan näytteitä vähintään kaksi kertaa (samasta eläinryhmästä) siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 36 tunnin kuluttua altistuksesta ja seuraavat sopivan ajan kuluttua siitä, kuitenkin viimeistään 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Ensimmäisellä näytteenottokerralla kaikkia annosryhmiä on altistettava ja näytteitä on kerättävä analyysiin; myöhemmillä näytteenottokerroilla tarvitsee ainoastaan antaa korkein annos. Mikäli positiivinen vaste havaitaan yhden näytteenottokerran jälkeen, lisänäytteitä ei tarvita, ellei tarvita määrällistä annos-vastetietoa. Kuvatut näytteenottoajat johtuvat mikrotumien esiintymistä ja häviämistä koskevasta kinetiikasta näissä kahdessa kudososassa.

b. Jos päivittäisiä altistuskertoja on kaksi tai useampia (esim. kaksi altistusta 24 tunnin välein), näytteet on otettava luuytimestä kerran 18–24 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta tai perifeerisestä verestä kerran 36–48 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta. (30). Kuvatut näytteenottoajat johtuvat mikrotumien esiintymistä ja häviämistä koskevasta kinetiikasta näissä kahdessa kudososassa.

c. Jos käytetään kolmea tai useampaa päivittäistä käsittelyä (esim. kolmea tai useampaa käsittelyä noin 24 tunnin välein), luuytimen näytteet on otettava viimeistään 24 tunnin kuluessa viimeisestä käsittelystä ja perifeerinen veri on otettava viimeistään 40 tunnin kuluttua viimeisestä käsittelystä (31). Tähän käsittelymalliin sisältyy comet-testin (esim. näytteenotto 2–6 tunnin kuluttua viimeisestä käsittelystä) yhdistäminen mikrotumatestiin sekä mikrotumatestin sisällyttäminen toistuvan annostelun toksisuustutkimuksiin. Kertyneet tiedot osoittavat, että mikrotuman indusoituminen voidaan havaita laajempina aikaväleinä kolmen tai useamman annostelun jälkeen (15).

Muita annostelu- tai näytteenotto-ohjelmia voidaan käyttää tarvittaessa ja tieteellisten perustelujen nojalla ja kun helpotetaan tietojen sisällyttämistä muihin toksisuustutkimuksiin.

Havainnot

Koe-eläimiä koskevia yleisiä kliinisiä havaintoja tulee tehdä ja kliinisiä oireita kirjata ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa annostelun aikana. Eläimet on punnittava tutkimuksen alussa ja vähintään kerran viikossa toistuvan annoksen tutkimuksissa ja lopetettaessa. Vähintään viikon kestävissä tutkimuksissa ravinnonkulutuksen mittaus on tehtävä vähintään viikoittain. Mikäli testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutusta on mitattava, kun vesi vaihdetaan tai ainakin kerran

▼M7

viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta myrkytysvaikutuksesta, on lopetettava inhimillisesti ennen tutkimusajan päättymistä (28). Tietyissä olosuhteissa eläimen kehon lämpötilaa voidaan tarkkailla, koska käsittelyn aiheuttama hyper- ja hypotermia ovat tuottaneet vääriä tuloksia (32) (33) (34).

Kohdekudoksen altistaminen

Verinäyte on otettava sopivana ajankohtana, jotta voidaan tutkia testikemikaalien plasmatasot luuytimen altistumisen osoittamiseksi, jos tämä on perusteltua ja jos muita altistustietoja ei ole (ks. 48 kohta).

Luuydin-/veripreparaatit

Luuydinsolut otetaan yleensä eläinten reisiluista tai sääriluista heti koe-eläinten inhimillisen lopettamisen jälkeen. Solut poistetaan, niistä tehdään preparaatit ja ne värjätään vakiintuneilla värjäysmenetelmillä. Pieniä määriä perifeerista verta voidaan ottaa asiaankuuluvien eläinten hyvinvointia koskevien vaatimusten perusteella joko käyttämällä menetelmää, joka sallii koe-eläimen selviytymisen, kuten veri häntälaskimosta tai muusta sopivasta verisuonesta, tai sydänpunktio taikka näytteenotto suurikokoisesta suonesta lopettamisen yhteydessä. Kun kyse on luuytimestä tai perifeerisestä verestä peräisin olevista punasoluista, solut voidaan analyysimenetelmästä riippuen värjätä välittömästi supravitaaliväreillä (16) (17) (18) tai niistä tehdään ensin sivelyvalmisteet ja ne värjätään sen jälkeen mikroskooppitutkimukseen tai ne fiksoidaan ja värjätään asianmukaisesti virtaussytometrista tutkimusta varten. DNA-spesifisen väriaineen (esimerkiksi akridiinioranssin (35) tai Hoechst 33258:n plus pyroniini-Y:n (36)) käytöllä voidaan eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Tämä etu ei sulje pois tavanomaisten väriaineiden (esim. Giemsa mikroskooppitutkimuksessa) käyttöä. Myös muita järjestelmiä [esim. selluloosapylväitä tumallisten solujen poistamiseksi (37) (38)] voidaan käyttää, mikäli nämä menetelmät on laboratoriossa osoitettu yhteensopivaksi näytteen valmistuksen kanssa.

Jos nämä menetelmät ovat sovellettavissa, antikinetokorivasta-aineita (39), fluoresenssi- in situ -hybridisaatiota pansentromeerisillä DNA-koettimilla (40), tai suoraa in situ -merkintää, johon liittyy pansentromeerispesifisiä alukkeita yhdessä sopivan DNA:n vastavärjäyksen (41) kanssa, voidaan käyttää tunnistamaan mikrotumien (kromosomin/kromosomifragmentin) luonne, jotta voidaan määrittää, johtuuko mikrotuman indusoitumismekanismi klastogeenisesta ja/tai aneugeenisesta vaikutuksesta. Muita klastogeenien ja aneugeenien erottelumenetelmiä voidaan käyttää, jos menetelmät on osoitettu tehokkaiksi.

Analyysi (manuaalinen ja automaattinen)

Kaikki objektilasit tai näytteet, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen minkäänlaista tutkimusta ja jaettava satunnaisotannalla siten, että laskija ei tiedä altistusolosuhteista; tällainen koodaus ei ole tarpeen käytettäessä automaattisia pisteytysjärjestelmiä, jotka eivät ole riippuvaisia silmämääräisestä tarkastuksesta ja joihin eivät vaikuta toimijan ennakkokäsitykset. Punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä (esiasteet + kypsät punasolut) määritetään jokaisen eläimen osalta erikseen laskemalla yhteensä vähintään 500 punasolua luuytimestä ja 2 000 punasolua perifeerisestä verestä (42). Mikrotumaisten punasolujen esiasteiden esiintymistaajuuden määrittämistä varten on laskettava vähintään 4 000 punasolun esiastetta eläintä kohti (43). Jos aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta osoittaa,

▼M7

että mikrotumaisten punasolujen esiasteiden taustaesiintyvyys on <0,1 % testilaboratoriossa, on harkittava ylimääräisten solujen laskentaa. Näytteitä analysoitaessa punasolujen esiasteiden osuus testikemikaalia saaneiden eläinten punasolujen kokonaismäärästä pitäisi olla vähintään 20 prosenttia kantaja-aine-/liuotinkontrollin osuudesta, kun laskenta tehdään mikroskoopilla, ja vähintään noin 5 prosenttia kantaja-aine-/liuotinkontrollin osuudesta, kun, CD71+ -punasolujen esiasteita lasketaan sytometrisillä menetelmillä (ks. 31 kohta) (29). Esim. mikroskoopilla laskettavassa luuydinkokeessa, jos punasolujen esiasteen kontrolliosuus luuytimessä on 50 prosenttia, toksisuuden yläraja käsittää 10 prosenttia punasolujen esiasteita.

Koska rotan perna eristää ja tuhoaa mikrotumaisia punasoluja, on suositeltavaa rajoittaa mikrotumaisten punasolujen esiasteiden analyysi varhaisimpaan fraktioon. Siten pidetään yllä määritysmenetelmän korkeaa herkkyyttä rotan perifeerista verta analysoitaessa. Kun käytetään automaattisia analyysijärjestelmiä, punasolujen varhaisimmat esiasteet voidaan määrittää niiden korkean RNA-pitoisuuden tai niiden pinnalla olevan transferiinireseptoreiden (CD71+) korkean tason (31) perustella. Kuitenkin suora vertailu eri värjäysmenetelmien välillä on osoittanut, että tyydyttäviä tuloksia voidaan saada erilaisilla menetelmillä, myös perinteisellä akridiinioranssivärjäyksellä (3) (4).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot on esitettävä taulukossa. Punasolujen esiasteiden laskettu määrä, mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä ja punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä on lueteltava kunkin analysoidun eläimen osalta erikseen. Kun hiiriä käsitellään jatkuvasti vähintään neljän viikon ajan, tiedot mikrotumaisten kypsien punasolujen määrästä ja osuudesta on myös annettava, jos tämä kerätään. Eläinten toksisuustiedot ja kliiniset oireet on myös raportoitava.

Hyväksyttävyysperusteet

Testin hyväksyttävyys määritetään seuraavilla kriteereillä:

a. Rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tietoja pidetään hyväksyttävinä lisättäviksi laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan (ks. 15–18 kohta).

b. Rinnakkaisten positiivisten kontrollien tai pisteytysvalvonnan on indusoitava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin (ks. 24-25) kohta.

c. Asianmukainen määrä annoksia ja soluja on analysoitu.

d. Perusteet korkeimman pitoisuuden valitsemiseksi ovat yhdenmukaisia 30–33 kohdassa kuvattujen perusteiden kanssa.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, mikäli:

a. ainakin yhdessä tutkimusryhmässä mikrotumaisten punasolujen esiasteiden taajuus on lisääntynyt tilastollisesti merkittävällä tavalla verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b. lisäys riippuu annoksesta ainakin yhdellä näyttöönottokerralla, kun sitä arvioidaan asiaankuuluvalla trenditestillä

c. jokin tuloksisista on aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat).

▼M7

Jos vain suurinta annosta tutkitaan tietyllä näytteenottokerralla, testikemikaalia pidetään selvästi positiivisena, mikäli esiintyy tilastollisesti merkittävää kasvua rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna ja tulokset ovat aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman ulkopuolella (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat). Lähdekirjallisuudessa on suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (44) (45) (46) (47). Kun tehdään annos–vaste-analyysi, on analysoitava ainakin kolmea altistettua annosryhmää. Tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä olisi käytettävä eläintä. Mikrotumatestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että testikemikaali aiheuttaa mikrotumia, jotka ovat seurausta kromosomivauriosta tai mitoosilaitteen vauriosta testatun lajin erytroblasteissa. Tapauksessa, jossa testi tehtiin sentromeerien havaitsemiseen mikrotumissa, testikemikaali, joka tuottaa sentromeeria sisältäviä mikrotumia (sentromeerinen DNA tai kinetokori, joka indusoi koko kromosomin häviämisen) on osoitus siitä, että testikemikaali on aneugeeni.

Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, jos kaikissa tutkituissa koeolosuhteissa:

a. yhdessäkään tutkimusryhmässä mikrotumaisten punasolujen esiasteiden taajuus ei ole lisääntynyt tilastollisesti merkittävällä tavalla verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

b. annoksesta riippuvaa lisääntymistä ei esiinny millään näytteenottokerralla asianmukaisella trenditestillä arvioituna

c. kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisen kontrollin tietojen jakauman puitteissa (esim. Poissonin jakaumaan perustuvat 95 %:n kontrollirajat)

d. luuydin on altistunut testikemikaaleille.

Lähdekirjallisuudessa on suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (44) (45) (46) (47). Näyttöön luuytimen altistumisesta testikemikaalille voi sisältyä punasolujen esiasteiden ja kypsien punasolujen suhteen alentuminen tai testikemikaalien plasman tai veritasojen mittaaminen. Laskimonsisäisen annostelun tapauksessa näyttöä altistumisesta ei tarvita. Vaihtoehtoisesti luuytimen altistumisen osoittamiseen voidaan käyttää samalla altistustavalla ja samalla eläinlajilla tehdyn riippumattoman tutkimuksen tietoja. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava kemikaali aiheuta koeolosuhteissa mikrotumia testattujen lajien punasolujen esiasteissa.

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Tapauksissa, joissa vaste ei ole selvästi negatiivinen tai positiivinen tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea (esim. heikko tai rajatapaukseksi luokiteltava lisäys), tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvioinnissa ja/tai loppuun saatettuihin kokeisiin liittyvissä lisätutkimuksissa. Joissakin tapauksissa useampien solujen analysointi tai toistokokeen suorittaminen mahdollisesti käyttämällä mukautettuja koeolosuhteita voi olla hyödyllistä.

Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia, ja sen vuoksi tutkimusta pidetään epäselvänä.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Yhteenveto

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

▼M7

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut asiaankuuluvat fysikokemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa ja sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista, epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot ja niin edelleen.

Useista aineosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistaajuuden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testikemikaalin valmistus

— kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulointien analyyttiset määritelmät (kuten stabiilius, homogeenisyys, nimelliset pitoisuudet), kun niitä käytetään.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen käytölle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— menettely eläinten yksilölliseksi tunnistamiseksi

— lyhytkestoisissa tutkimuksissa: kunkin eläimen paino kokeen alkaessa ja päättyessä; yli viikon kestävissä tutkimuksissa: kunkin eläimen paino tutkimuksen aikana ja ravinnonkulutus. Kunkin ryhmän painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta on sisällytettävä kokeeseen.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— altistustavan ja annostelun keston valintaperusteet

— menetelmät, joilla on vahvistettu testikemikaalin pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen

▼M7

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— lopettamistapa

— kivunlievitysmenetelmä (jos sitä on käytetty)

— yksityiskohtaiset tiedot koe- ja näyteaikataulusta ja perustelut valinnoille

— objektilasien valmistusmenetelmät

— menetelmät eristää ja säilöä näytteitä

— toksisuuden mittausmenetelmät

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden laskentaperusteet

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden taajuuden määrittelyyn ja punasolujen esiasteiden ja kypsien punasolujen suhteen määrittelyyn analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti

— tutkimuksen hyväksyvyyttä koskevat perusteet

— menetelmät, kuten antikinetokorivasta-aineiden tai sentromeerispesifisten DNA-koettimien käyttö sen määrittämiseen, sisältyykö mikrotumiin kokonaisia kromosomeja tai niiden fragmentteja, tarvittaessa.

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana, mukaan lukien toksisuusoireet

— punasolujen esiasteiden osuus punasolujen kokonaismäärästä

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä, ilmoitetaan erikseen jokaisesta eläimestä

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden keskiarvo ± keskihajonta ryhmää kohti

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät

— rinnakkaisista negatiivisista ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat

— aikaisemman negatiivisen ja positiivisen kontrollin tiedot, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat, 95 prosentin kontrollirajat jakaumille sekä katettu aika ja datapisteiden määrä

— tiedot, jotka osoittavat luuytimen altistumisen

— niiden tietojen luonnehdinta, jotka osoittavat, sisältävätkö mikrotumat kokonaisia kromosomeja tai niiden fragmentteja, tarvittaessa

— perusteet positiiviselle tai negatiiviselle vasteelle, jotka on täytetty.

▼M7

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

Viitteet.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. et al. (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, s. 10–30.

(3) MacGregor, J.T. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, s. 92–107.

(4) Dertinger, S.D. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, s. 83–91.

(5) Dertinger, S.D. *et al*. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, s. 139–145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, s. 65–73.

(7) Asano, N. *et al*. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, s. 149–154.

(8) Styles, J.A. *et al*. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, s. 153–155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, s. 187–190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, s. 9–15.

(11) Heddle, J.A. *et al*. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, s. 61–118.

(12) Mavournin, K.H. *et al*. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, s. 29–80.

(13) MacGregor, J.T. *et al*. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, s. 555–558.

▼**M7**

(14) MacGregor, J.T. *et al*. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, s. 103–112.

(15) MacGregor, J.T. *et al*. (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, s. 513–522.

(16) Hayashi, M. *et al*. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, s. 245–249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, s. 83–98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, s. 153–159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, s. 239–273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, s. 45–50.

(21) Hayes, J. *et al*. (2009), The rat bone marrow micronucleus test-study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, s. 419–424.

(22) Wakata, A. *et al*. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, s. 84–100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 87–90.

(25) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, s. 108–120.

(26) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, s. 293–304.

(27) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, s. 313–319.

▼M7

(28) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, s. 222–228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, s. 313–319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, s. 234–252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, s. 79–83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, s. 7–14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, s. 120–127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, s. 241–247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, s. 269–275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, s. 91–104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, s. 121–126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, s. 411–415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, s. 297–302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, s. 99–104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, s. 97–99.

(43) OECD (2014), Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), *In vivo* Cytogenetics Assays, in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 115–141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (1989), Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, s. 49–52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, s. 233–241.

▼**M7**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Erytroblasti: varhainen vaihe punasolun kehityksessä, joka edeltää välittömästi punasolun esiastetta, jossa soluun sisältyy yhä tuma.

Kemikaali: aine tai seos.

Kinetokori: proteiinirakenne, joka muodostuu eukaryoottisolujen sentometrin päälle ja joka yhdistää kromosomin tumasukkulan mikrotubuluksen sukkularihmoihin mitoosin ja meioosin aikana ja toimii solunjakautumisen aikana ohjaten sisarkromatidit irti toisistaan.

Mikrotumat: pieniä solun päätumasta erillisiä ja niiden rinnalla esiintyviä tumia, jotka muodostuvat mitoosin (meioosin) telofaasin aikana hitaasti liikkuvista (lagging) kromosomikappaleista tai kokonaisista kromosomeista.

Normokromaattinen tai kypsä punasolu: täysin kypsä punasolu, joka on menettänyt enukleaation jälkeen jäljellä olevan RNA:n ja/tai on menettänyt muut lyhytaikaiset solumarkkerit, jotka tyypillisesti häviävät enukleaation jälkeen viimeisen erytroblastin jakautumisen jälkeen.

Polykromaattinen punasolu tai punasolun esiaste: äskettäin muodostunut punasolu kehityksen välivaiheessa, joka värjää siniset ja punaiset komponentit klassisessa veren värjäyksessä (kuten Wrightin-Giemsan värjäys), koska vasta muodostuneeseen soluun sisältyy RNA:ta. Tällaiset äskettäin muodostuneet solut ovat likimain samanlaisia kuin retikulosyytit, joita visualisoidaan käyttämällä vitaalivärjäystä aiheuttaen jäännöksenä olevan solun RNA:n kasautumisen retikulumiksi. Muita menetelmiä, kuten RNA:n yksiväristä värjäystä fluoresoivilla väreillä tai lyhytikäisten pintamarkkereiden, kuten CD71:n merkitsemistä fluoresoivilla vasta-aineilla käytetään tällä hetkellä usein tunnistamaan vasta muodostuneet punasolut. Polykromaattiset punasolut, retikulosyytit ja CD71-positiiviset punasolut ovat punasolujen esiasteita, vaikka jokaisella on hieman erilainen elinaikajakauma.

Retikulosyytti: vasta muodostunut punasolu, joka on värjätty vitaalivärjäyksellä aiheuttaen jäännöksenä olevan solun RNA:n kasautumisen retikulumiksi. Retikulosyyteillä ja polykromaattisilla punasoluilla on samanlainen solun ikäjakauma.

Sentromeeri: kromosomin alue (alueita), joihin sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärkromosomien järjestäytynyt siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M7

Lisäys 2

YHDISTELYKOE SUKUPUOLTEN EROJEN TUNNISTAMISEKSI *IN VIVO* -MIKROTUMATESTISSÄ

Yhdistelykoe ja sen analysointi

Tässä kokeessa vähintään viisi urosta ja viisi naarasta testataan kullakin pitoisuustasolla. Tämä johtaa koemalliin, jossa on vähintään 40 eläintä (20 urosta ja 20 naarasta sekä asiaankuuluvat positiiviset kontrollit).

Tämä koe, joka on yksi yksinkertaisimmista yhdistelykokeista, vastaa kaksisuuntaista varianssianalyysia, jossa sukupuoli ja pitoisuustaso ovat tärkeimmät vaikutukset. Tietoja voidaan analysoida käyttäen monia vakiintuneita tilastollisia ohjelmistopaketteja, kuten SPSS, SAS, STATA, Genstat ja R.

Tietoihin liittyvä vaihtelu ositetaan analyysissa sukupuolten ja pitoisuuksien väliseksi sekä sukupuolten ja pitoisuuksien väliseen yhdysvaikutukseen liittyväksi vaihteluksi. Kutakin perustetta testataan rinnakkaisten eläinten välisen vaihtelevuuden arvion perusteella samaa sukupuolta edustavissa eläinryhmissä, joille annetaan sama pitoisuus. Täydelliset tiedot menetelmästä annetaan useissa vakiintuneissa tilastollisissa oppikirjoissa (ks. viitteet) ja tilastopakettien tukitoiminnoissa.

Analyysissä tutkitaan sen jälkeen sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutusyhdysvaikutustermi ANOVA-taulukossa ([1]). Merkitsevän yhdysvaikutustermin puuttuessa sukupuolten tai pitoisuustasojen yhdistetyt arvot ovat tasojen välisiä valideja tilastollisia testejä ANOVA-taulukon ryhmän sisäisen yhdistetyn vaihtelutekijän pohjalta.

Analyysi jatkuu siten, että arvio pitoisuuksien välisestä vaihtelusta jaetaan kontrasteihin, joista saadaan testi vasteiden lineaarisille ja kvadraattisille kontrasteille eri pitoisuustasoilla. Kun sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutus on merkittävä, tämä termi voidaan myös osittaa sukupuoleen x liittyviksi lineaarisiksi ja sukupuoleen x liittyviksi kvadraattisiksi interaktiokontrasteiksi. Näiden tekijöiden perusteella voidaan testata, onko sukupuolten pitoisuusvaste rinnakkainen vai onko sukupuolten välillä vaste-eroa.

Arviota ryhmän sisäisestä yhdistetystä vaihtelusta voidaan käyttää keskiarvojen erotuksen parittaiseen testaukseen. Näitä vertailuja voitaisiin tehdä kummankin sukupuolen keskiarvojen välillä sekä eri pitoisuustasojen keskiarvojen välillä, kuten negatiiviisten kontrollitasojen kanssa. Kun yhdysvaikutus on merkitsevä, vertailuja voitaisiin tehdä eri pitoisuuksia saaneen yhden sukupuolen keskiarvojen välillä tai samaa pitoisuutta saaneiden molempien sukupuolten keskiarvojen välillä.

Viitteet

Asiasta on monia tilastollisia oppikirjoja, joissa käsitellään yhdistelmäkokeiden – jotka vaihtelevat yksinkertaisimmista kaksifaktorianalyyseistä kokeiden suunnittelumetodologiassa käytettyihin monimutkaisimpiin analyyseihin – teoriaa, suunnittelua, metodologiaa, analyysia ja tulkintaa. Seuraava luettelo ei ole tyhjentävä. Joissain kirjoissa annetaan esimerkkejä vertailukelpoisista malleista ja joissakin tapauksissa annetaan koodit analyysien tekemiseen erilaisia ohjelmistoja hyödyntämällä.

([1]) Tilastotieteilijät, jotka käyttävät mallintamiseen perustuvaa lähestymistapaa, kuten yleistettyjä lineaarisia malleja, voivat tarkastella analyysia erilaisella, mutta vertailukelpoisella tavalla, mutta eivät välttämättä tee päätelmiä perinteisestä ANOVA-taulukosta, jonka juuret juontuvat ennen tietokoneita kehitettyihin tilastotieteen laskennan algoritmisiin lähestymistapoihin.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14. **MUTAGEENISUUS — TAKAISINMUTAATIOTESTI BAKTEEREILLA**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä käytetään *Salmonella typhimurium*- ja *Escherichia coli* -bakteereiden aminohappoja vaativia kantoja sellaisten pistemutaatioiden havaitsemiseksi, joihin liittyy DNA:n yhden tai useamman emäsparin korvautuminen, ylimäärä tai deleetio (1) (2) (3). Tämän bakteereilla tehtävän takaisinmutaatiotestin periaate on, että se paljastaa mutaatiot, jotka korjaavat testikannassa olevat mutaatiot ja palauttavat bakteerien toiminnallisen kyvyn syntetisoida essentiaalista aminohappoa. Revertantit bakteerit tunnistetaan siitä, että ne pystyvät kasvamaan, vaikka testibakteerikannan ennen takaisinmutaatiota tarvitsema aminohappo puuttuu.

Pistemutaatiot aiheuttavat monia ihmisen geneettisiä sairauksia, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä olevat pistemutaatiot ovat osallisina ihmisten ja koe-eläinten kasvainten muodostumisessa. Bakteereilla tehtävä takaisinmutaatiotesti on nopea, edullinen ja suhteellisen helposti toteutettava testi. Monilla testikannoilla on useita ominaisuuksia, joiden ansiosta ne osoittavat herkästi mutaatiot. Näitä ovat esimerkiksi herkästi reagoivat DNA-jaksot takaisinmutaatiokohdissa, solujen lisääntynyt läpäisevyys suurille molekyyleille ja DNA:n korjausjärjestelmien eliminoituminen tai virheille alttiiden DNA:n korjausprosessien lisääntyminen. Testikantojen spesifisyys voi tuottaa hyödyllistä tietoa genotoksisten aineiden aiheuttamien mutaatioiden tyypistä. Käytettävissä on hyvin laaja tietokanta bakteerien takaisinmutaatiotestien tuloksista erittäin monissa rakenteissa, ja vakiintuneita menetelmiä on kehitetty fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaisten kemiallisten aineiden, myös haihtuvien yhdisteiden, testaamista varten.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Takaisinmutaatiotesti joko *Salmonella typhimurium*- tai *Escherichia coli* -bakteereilla osoittaa aminohappoa vaativassa kannassa (edellisessä histidiini ja jälkimmäisessä tryptofaani) mutaation, jonka seurauksena syntyy ulkopuolisesta aminohapon saannista riippumaton kanta.

Emäsparin korvautumista aiheuttavat mutageenit ovat aineita, jotka aiheuttavat emäksen vaihtumisen DNA:ssa. Takaisinmutaatiotestissä tämä vaihtuminen saattaa tapahtua alkuperäisen mutaation kohdassa tai jossakin muussa bakteerigenomin kohdassa.

Lukukehyksensiirtomutageenit ovat aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA:ssa, mikä muuttaa lukukehystä (reading frame) RNA:ssa.

▼B

1.3 ALUSTAVAT VALMISTELUT

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä käytetään prokaryoottisoluja, jotka poikkeavat nisäkässoluista soluunoton, metabolian, kromosomirakenteen ja DNA:n korjautumisprosessien suhteen. *In vitro* -testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää. *In vitro* -metaboliset aktivaatiojärjestelmät eivät pysty täysin jäljittelemään nisäkässolujen *in vivo* -olosuhteita. Testistä ei sen vuoksi voida suoraan päätellä aineen mutageenisuutta ja karsinogeenisuutta nisäkkäillä.

Bakteereilla tehtävää takaisinmutaatiotestiä käytetään yleisesti genotoksisuuden, ja varsinkin pistemutaatioita aiheuttavan vaikutuksen, alustavana seulontamenetelmänä. Laaja tietokanta on osoittanut, että monilla kemiallisilla aineilla, joilla saadaan positiivinen tulos tässä tutkimuksessa, todetaan mutageenista vaikutusta myös muissa tutkimuksissa. On myös esimerkkejä mutageenisista aineista, joita ei voida todeta tällä testillä. Nämä epäonnistumiset voivat johtua todetun tulostapahtuman spesifisestä luonteesta, metabolisen aktivaation eroista tai aineen erilaisesta biologisesta hyödynnettävyydestä. Toisaalta takaisinmutaatiotestin herkkyyttä lisäävät tekijät voivat johtaa mutageenisen aktiivisuuden liialliseen stimulaatioon.

Bakteereilla tehtävä takaisinmutaatiotesti ei välttämättä sovellu tiettyjen kemiallisten aineryhmien testaamiseen. Tällaisia ovat esimerkiksi voimakkaasti bakterisidiset yhdisteet (esim. tietyt antibiootit) ja aineet, joiden arvellaan (tai tiedetään) vaikuttavan erityisesti nisäkässolun kahdentumisjärjestelmään (esim. jotkut topoisomeraasin estäjät ja jotkut nukleosidianalogit). Nisäkkäillä tehtävät mutaatiotestit saattavat soveltua paremmin näihin tapauksiin.

Vaikka monet tässä testissä positiivisen tuloksen antavat kemialliset aineet ovat karsinogeenisia nisäkkäillä, korrelaatio ei ole ehdoton. Se riippuu aineryhmän kemiallisista ominaisuuksista, eikä kaikkia karsinogeeneja voida todeta tällä testillä, koska ne vaikuttavat muiden, ei-genotoksisten mekanismien tai bakteerisoluista puuttuvien mekanismien välityksellä.

1.4 TESTIN PERIAATE

Bakteerisolususpensiot altistetaan tutkittavalle aineelle eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa tai ilman sitä. Maljainkorporoitumismenetelmässä nämä suspensiot sekoitetaan overlay-agariin ja levitetään heti minimaalisen kasvualustan pinnalle. Preinkubaatiomenetelmässä tutkittavaa ainetta sisältävää seosta inkuboidaan, minkä jälkeen se sekoitetaan overlay-agariin ennen kuin se levitetään minimaalisen kasvualustan pinnalle. Molemmissa menetelmissä revertantit pesäkkeet lasketaan 2–3 päivän inkubaatioajan jälkeen ja niiden määrää verrataan spontaanien revertanttien pesäkkeiden määrään pelkkää liuotinta sisältävissä kontrollimaljoissa.

Takaisinmutaatiotesti bakteereilla voidaan tehdä useilla eri menetelmillä. Yleisesti käytettyjä ovat maljainkorpo-roitumismenetelmä (1) (2) (3) (4), preinkubaatiomenetelmä (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuaatiomenetelmä (9) (10) ja suspensiomenetelmä (11). Kaasujen ja höyryjen testaamiseen käytettäviä muunnelmia on myös kuvattu (12).

▼B

Tässä menetelmässä kuvataan pääasiassa maljainkorporoitumis- ja preinkubaatiomenetelmiä. Niillä molemmilla voidaan tehdä kokeita sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Jotkut aineet voidaan havaita tehokkaammin preinkubaatiomenetelmällä. Nämä kuuluvat sellaisiin kemiallisten aineiden ryhmiin, joihin kuuluu lyhytketjuisia alifaattisia nitrosoamiineja, kaksiarvoisia metalleja, aldehydejä, atsovärejä ja diatsoyhdisteitä, pyrollitsidiinialkaloideja, allyyliyhdisteitä ja nitroyhdisteitä (3). On todettu myös, että tiettyjä mutageeniryhmiä ei pystytä aina toteamaan standardeilla menetelmillä, kuten maljainkorporoitumis- tai preinkubaatiomenetelmällä. Näitä on pidettävä erikoistapauksina, ja niiden toteamiseen tulisi ehdottomasti käyttää vaihtoehtoisia menetelmiä. Seuraavat erikoistapaukset on voitu tunnistaa (sekä esimerkkejä toimenpiteistä, joita voidaan käyttää niiden toteamisessa): atsovärit ja diatsoyhdisteet (3) (5) (6) (13), kaasut ja haihtuvat kemialliset aineet (12) (14) (15) (16) ja glykosidit (17) (18). Poikkeaminen standardista menetelmästä on perusteltava tieteellisesti.

1.5 TESTIN KUVAUS

1.5.1 **Testin valmistelu**

1.5.1.1 *Bakteerit*

Tuoreita bakteeriviljelmiä on kasvatettava myöhäiseen eksponentiaaliseen tai varhaiseen stationääriseen kasvuaiheeseen (noin 10^9 solua/ml). Myöhäisessä stationäärivaiheessa olevia viljelmiä ei pidä käyttää. Oleellista on, että kokeessa käytettävät viljelmät sisältävät elinkykyisiä soluja suurina tittereinä. Titteri voidaan osoittaa joko aikaisemmissa kontrollitutkimuksissa saatujen kasvukäyrien perusteella tai määrittämällä jokaisessa analyysissä elinkykyisten solujen lukumäärät maljakokeella.

Suositeltu inkubaatiolämpötila on 37 °C.

On käytettävä vähintään viittä bakteerikantaa. Näihin tulee sisältyä neljä *S. typhimurium* -kantaa (TA 1535; TA 1537 tai TA97a tai TA97; TA98; ja TA100), joiden on osoitettu olevan luotettavia ja joilla on saatu toistettavissa oleva vaste eri laboratorioissa. Näissä neljässä *S. typhimurium* -kannassa on GC-emäsparit primaarisessa takaisinmutaatiokohdassa, ja tiedetään, että ne eivät ehkä paljasta tiettyjä hapettavia mutageeneja, ristisidoksia muodostavia aineita eivätkä hydratsiineja. Tällaiset aineet voidaan todeta *E. coli* WP2 -kannoilla tai *S. typhimurium* TA 102 -kannalla (19), joissa on AT-emäspari primaarisessa takaisinmutaatiokohdassa. Suositeltava kantojen yhdistelmä on tämän vuoksi:

— *S. typhimurium* TA 1535, ja

— *S. typhimurium* TA 1537 tai TA97 tai TA97a, ja

— *S. typhimurium* TA98, ja

— S. *typhimurium* TA100, ja

— *E. coli* WP2 uvrA tai *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) tai *S. typhimurium* TA102.

Ristisidoksia muodostavien mutageenien toteamiseksi mukaan tulisi ehkä käyttää TA102-kantaa tai käyttää lisäksi DNA:n korjautumiseen kykenevää *E. coli* -kantaa (esim. *E. coli* WP2 tai *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Varastoviljelmien valmistuksessa, markkerien vahvistamisessa ja säilytyksessä on käytettävä vakiintuneita menetelmiä. Kasvuun vaadittavien aminohappojen tarve on osoitettava kunkin jäädytetyn varastoviljelmäpreparaatin osalta erikseen *(S. typhimurium* -kannoilla histidiini ja *E. coli* -kannoilla tryptofaani). Muut fenotyyppiset ominaisuudet on tarkistettava vastaavasti. Niitä ovat: R-tekijäplasmidien esiintyminen tai puuttuminen, mikäli sillä on merkitystä (ampisilliiniresistenssi kannoissa TA98, TA100 ja TA97a tai TA97, WP2 uvrA ja WP2 uvrA (pKM101) ja ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssi kannassa TA102); tyypillisten mutaatioiden esiintyminen (kristalliviolettiherkkyyden aiheuttama rfa-mutaatio *S. typhimurium* -bakteerissa ja ultraviolettivaloherkkyyden aiheuttama uvrA-mutaatio *E. coli* -bakteerissa tai uvrB-mutaatio *S. typhimurium* -bakteerissa) (2) (3). Kantojen tuottamien spontaanien revertanttien pesäkkeiden määrän tulisi myös olla laboratoriokohtaisten vertailuarvojen esiintymistiheysalueella ja mieluiten kirjallisuudessa raportoidulla alueella.

1.5.1.2 *Kasvatusväliaine*

Käytetään sopivaa minimaalista agaria (sisältää esim. Vogel-Bonner minimal medium E:tä ja glukoosia) ja ”overlay”-agaria. joka sisältää histidiiniä ja biotiinia tai tryptofaania, jotta muutama solunjakautuminen voi tapahtua (1) (2) (9).

1.5.1.3 *Metabolinen aktivaatio*

Bakteerit on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:11ä (1) (2) tai fenobarbitonin ja ß-naftoflavonin (18) (20) (21) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Käytetty postmitokondriaalisen jakeen pitoisuus S9-seoksessa on yleensä 5–30 % v/v. Metabolisen aktivaatiojärjestelmän valinta tai sen pois jättäminen saattaa riippua siitä, millaiseen kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampia kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta. Pelkistävä metabolinen aktivaatiojärjestelmä saattaa soveltua paremmin atsovärien ja diatsoyhdisteiden tutkimiseen (6) (13).

1.5.1.4 *Tutkittava aine/valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen bakteerien altistamista. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmään ja/tai laimentaa ennen käsittelyä. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikutta solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen (22). Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden yhteensopivuuden osoittavat tutkimustulokset on esitettävä. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä tulisi harkita ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä.

▼B

1.5.2 **Koeolosuhteet**

1.5.2.1 *Testikannat (ks. 1.5.1.1)*

1.5.2.2 *Altistuspitoisuus*

Tutkittavan aineen suurinta testattavaa pitoisuutta määritettäessä on otettava huomioon aineen sytotoksisuus ja liukoisuus altistuksessa käytettävään lopulliseen seokseen.

Myrkkyvaikutus ja liukenemattomuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavalla kokeella. Sytotoksisuus voidaan havaita revertanttien pesäkkeiden lukumäärän pienenemisestä, taustakasvuston kirkastumisesta tai vähenemisestä tai solujen eloonjäämisasteesta käsitellyissä viljelmissä. Aineen sytotoksisuus saattaa muuttua metabolisten aktivaatiojärjestelmien läsnäollessa. Liukenemattomuus on arvioitava lopullisen seoksen paljaalla silmällä havaittavan sakkautumisen perusteella todellisissa koeolosuhteissa.

Liukoisten, ei-sytotoksisten aineiden suositeltu testattava maksimipitoisuus on 5 mg/malja tai 5 ul/malia. Testattaessa ei-sytotoksisia aineita, jotka eivät ole liukoisia pitoisuuksissa 5 mg/malja tai 5 µl/malja. yhden tai useamman testattavan pitoisuuden on oltava liukenemattomia lopullisessa altistusseoksessa. Jos tutkittava aine on sytotoksinen jo pienempinä pitoisuuksina kuin 5 mg/malja tai 5 µl/malja, se olisi testattava sytotoksiseen pitoisuuteen asti. Sakka ei saisi vaikuttaa laskentaan.

Alustavassa kokeessa on käytettävä ainakin viittä erisuuruista tutkittavan aineen analysoitavissa olevaa pitoisuutta siten, että testauspisteiden välillä on noin puolen log:n (√10) väli. Pitoisuus-vastesuhdetta tutkittaessa voi olla syytä käyttää pienempiä välejä. Arvioitaessa aineita, jotka sisältävät huomattavia määriä mahdollisia mutageenisia epäpuhtauksia, voidaan harkita testaamista myös suuremmilla pitoisuuksilla kuin 5 mg/malja tai 5 µl/malja.

1.5.2.3 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

Jokaisessa testissä on käytettävä myös kannan suhteen spesifisiä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontrolleja sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Positiivisen kontrolliaineen pitoisuudet on valittava siten, että ne tuovat esiin kunkin testin tehokkuuden.

Testeissä, joissa käytetään metabolista aktivaatiojärjestelmää, positiivinen (positiiviset) kontrolliaine(et) on valittava käytettävien bakteerikantojen tyypin perusteella.

Seuraavassa on esimerkkejä sopivista positiivisista kontrolliaineista testeissä, joissa käytetään metabolista aktivaatiota:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
9,10-dimetyyliantraseeni	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetyylibents[a]antraseeni	57-97-6	200-359-5
bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraseeni	613-13-8	210-330-9

▼B

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
syklofosfamidi	50-18-0	
syklofosfamidimonohydraatti	6055-19-2	200-015-4

Seuraava aine sopii positiiviseksi kontrollialueeksi pelkistävää metabolista aktivaatiota käytettäessä:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Congo Red	573-58-0	209-358-4

2-aminoantraseenia ei pidä käyttää ainoana S9-seoksen tehon indikaattorina. Jos 2-aminoantraseenia käytetään, jokainen S9-erä on karakterisoitava myös mutageenilla, joka vaatii mikrosomaalisiin entsyymeihin perustuvaa metabolista aktivaatiota, esim. bentso[a]pyreenilla, dimetyylibentsantraseenilla.

Seuraavat aineet ovat esimerkkejä kannan suhteen spesifisistä positiivisista kontrolleista, joita voidaan käyttää ilman eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää tehtävissä testeissä:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro	Kanta
natriumatsidi	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 ja TA 100
2-nitrofluoreeni	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridiini	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
kumeenihydroperoksidi	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomysiini C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA ja TA 102
N-etyyli-N-nitro-N-nitrosoguanidiini	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA(pKM101)
4-nitrokinoliini-l-oksidi	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA(pKM101)
furyylifuramidi (AF2)	3688-53-7		plasmidin sisältävät kannat

Myös muita soveltuvia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvien positiivisten kontrollien käyttöä on harkittava, mikäli niitä on käytettävissä.

Lisäksi on käytettävä pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta negatiivisina kontrolleina, jotka eivät sisällä tutkittavaa ainetta mutta joita muutoin käsitellään samalla tavoin. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleista saadut aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

▼B

1.5.3 **Testin suorittaminen**

Maljainkorporoitumismenetelmässä (1) (2) (3) (4), jossa ei käytetä metabolista aktivaatiota, 0,05 ml tai 0,1 ml tutkittavia liuoksia, 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää (noin 10^8 elinkykyistä solua) ja 0,5 ml steriiliä puskuria sekoitetaan 2 ml:aan ”overlay”-agaria. Metabolista aktivaatiojärjestelmää käytettäessä 0,5 ml metabolista aktivaatioseosta. jossa on riittävä määrä postmitokondriaalista jaetta (pitoisuus 5–30 % v/v metabolisessa aktivaatioseoksessa), sekoitetaan ”overlay”-agariin (2,0 ml) yhdessä bakteerien ja tutkittavan aineen/tutkittavan liuoksen kanssa. Jokaisen koeputken sisältö sekoitetaan ja kaadetaan minimaalisen agarmaljan pinnalle. ”Overlay”-agarin annetaan jähmettyä ennen inkubaatiota.

Preinkubaatiomenetelmässä (2) (3) (5) (6) tutkittavaa ainetta/tutkittavaa liuosta esi-inkuboidaan testikannan (noin 10^8 elinkykyistä solua) ja steriilin puskurin tai metabolisen aktivaatiojärjestelmän (0,5 ml) kanssa yleensä vähintään 20 minuuttia 30–37 °C:ssa, ennen kuin se sekoitetaan ”overlay”-agariin ja kaadetaan minimaalisen agarmaljan pinnalle. Yleensä 0,05 tai 0,1 ml tutkittavaa ainetta/tutkittavaa liuosta, 0,1 ml bakteereja ja 0,5 ml S9-seosta tai steriiliä puskuria sekoitetaan 2,0 ml:aan ”overlay”-agaria. Koeputket tulisi ilmata preinkubaation aikana sekoittajaa käyttäen.

Riittävän arvion tekemiseksi hajonnasta on käytettävä kolmea rinnakkaista maljaa kullakin annostasolla. Kaksoismaljauksen käyttö on mahdollista, mikäli se voidaan perustella tieteellisesti. Satunnainen maljan menetys ei välttämättä mitätöi analyysiä.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita tulisi testata asianmukaisin menetelmin, esimerkiksi suljetuissa astioissa (12) (14) (15) (16).

1.5.4 **Inkubaatio**

Kaikkia tiettyyn testiin kuuluvia maljoja on inkuboitava 37 °C:ssa 48–72 tunnin ajan. Inkubaatioajan jälkeen lasketaan revertanttien pesäkkeiden lukumäärä maljaa kohti.

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tulokset on ilmoitettava revertanttien pesäkkeiden lukumääränä maljaa kohti. Revertanttien pesäkkeiden määrä sekä negatiivisissa (liuotinainekontrolli ja käsittelemätön kontrolli, jos käytetty) että positiivisissa kontrollimaljoissa on myös ilmoitettava. Maljakohtaiset lukumäärät, revertanttien pesäkkeiden maljakohtaisten määrien keskiarvo ja keskihajonta on ilmoitettava tutkittavan aineen ja positiivisten ja negatiivisten (käsittelemättömät ja/tai liuotinaine) kontrollien osalta.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnelluissa koeolosuhteissa. Negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista jossakin tapauksessa pidetä tarpeellisena, tämä päätös on perusteltava. Tutkimusparametrien muuttamista koeolosuhteiden monipuolistamiseksi on harkittava seurantatutkimuksia tehtäessä. Mahdollisia muutettavia tutkimusparametreja ovat pitoisuusvälit, altistusmenetelmä (maljainkorporoitumiskoe tai nesteen preinkubointi) ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

▼B

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten pitoisuudesta riippuva revertanttien pesäkkeiden maljakohtaisen lukumäärän suureneminen koko testatulla annosalueella ja/tai toistettavissa oleva lisääntyminen yhdellä tai useammalla pitoisuustasolla vähintään yhdessä kannassa joko metabolista aktivaatiojärjestelmää käytettäessä tai ilman sitä (23). Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (24). Tilastollinen merkitsevyys ei saa kuitenkaan olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa pistemutaatioita emässubstituutioiden tai lukukehyksensiirtojen kautta joko *Salmonella typhimurium*- ja/tai *Escherichia coli* -bakteerien genomissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei testattava aine ole koeolosuhteissa mutageeninen testatulla lajilla.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Kannat:

— käytetyt kannat,

— solujen määrä viljelmää kohti,

— kannan ominaisuudet.

Koeolosuhteet:

— tutkittavan aineen määrä maljaa kohti (mg/malja tai µl/malja) sekä annoksen valinnan ja kutakin pitoisuutta kohti valittujen maljojen lukumäärän perustelut,

— käytetty kasvatusväliaine,

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus sekä hyväksymiskriteerit,

— altistusmenettely.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— sakkautumisen merkit,

— maljakohtaiset määrät,

▼B

— revertanttien pesäkkeiden määrä maljaa kohti ja keskihajonta,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisista negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— aikaisemmat negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tutkimustulokset, myös vaihteluväli, keskiarvot ja keskihajonnat,

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, s. 347–364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, s. 173–215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.,* 312, s. 217–233.

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 168, s. 69–240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, s. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Delecting Carcinogens,* ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, s. 273–285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland. I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests*: *UKEMS Part I Revised,* ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, s. 13–61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb. U. and Porchet, E. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety,* 8, s. 167–77.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.,* 38, s. 33–42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141–161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis With Strains of *Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis,* 3, s. 45–465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.,* 307, s. 335–344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidinc-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.,* 136, s. 33–47.

(14) Zeiger, E., Anderson. B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.,* 19, s. 2–141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology,* D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, s. 249–258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis,* 9, s. 421–441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium, Cancer Res.,* 39, s. 3780–3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 77, s. 4961–4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of .*Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis,* 5, s. 285–291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, e*ds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, s. 85–88.

(21) Elliot. B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternativcs to Aroclor 1254-induccd 89 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis, 7,* s. 175–177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.,* 88, s. 343–350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.,* 189, s. 83–91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L, Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, s. 28–65.

▼M7

_____

_____

▼**M8**

B.17. *IN VITRO*-GEENIMUTAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUILLA HPRT- JA XPRT-GEENEJÄ KÄYTTÄEN

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 476 (2016). Testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi. Tämä tarkistettu versio testimenetelmästä B.17 perustuu lähes 30 vuoden kokemukseen tästä testistä sekä sellaisen erillisen uuden menetelmän kehittämistyön tuloksiin, jossa tehdään *in vitro* -geenimutaatiotestejä nisäkässoluilla tymidiinikinaasigeeniä käyttäen. Testimenetelmä B.17 on osa geneettisen toksikologian testimenetelmiä. OECD on laatinut asiakirjan (1), joka sisältää yhteenvedon geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsauksen näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin.

2. Nisäkässoluilla tehtävän *in vitro* -geenimutaatiotestin tarkoituksena on havaita kemikaalien aiheuttamia geenimutaatioita. Näissä testeissä käytettävissä solulinjoissa mitataan forward-mutaatioita reportterigeeneissä, erityisesti endogeenisessa hypoksantiini-guaniini-fosforibosyylitransferaasigeenissä (jyrsijöiden soluissa Hprt, ihmisen soluissa HPRT; tässä testimenetelmässä niistä käytetään nimityksiä Hprt-geeni ja HPRT-testi), ja ksantiini-guaniinifosforibosyylitransferaasin siirtogeenissä (gpt) (jäljempänä ’XPRT-testi’). HPRT- ja XPRT-mutaatiotesteillä voidaan havaita erilaisia geneettisiä tapahtumia. HPRT-testillä havaittujen mutaatiotapahtumien (mm. pistemutaatioiden, lukukehyksen siirtymien, pienten deleetioiden ja insertioiden) lisäksi autosomissa sijaitsevan gpt:n siirtogeenin avulla voidaan havaita myös suurista deleetioista ja mahdollisesti mitoottisesta rekombinaatiosta johtuvia mutaatioita, joita HPRT-testillä ei havaita, koska Hprt-geeni sijaitsee X-kromosomissa (2) (3) (4) (5) (6) (7). Tällä hetkellä XPRT-testiä käytetään sääntelytarkoituksissa vähemmän kuin HPRT-testiä.

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVIA POHDINTOJA JA RAJOITUKSET

4. *In vitro* -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita.

5. On huolehdittava siitä, että vältetään olosuhteet, jotka voisivat johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin (ts. mahdollinen yhteisvaikutus testausjärjestelmän kanssa), jotka eivät johdu testikemikaalien ja solun geneettisen materiaalin suorasta yhteisvaikutuksesta. Tällaisiin olosuhteisiin sisältyvät pH:n tai osmolaliteetin muutokset (8) (9) (10), yhteisvaikutus kasvatusliuoksen komponenttien kanssa (11) (12) tai liian korkeat sytotoksisuustasot (13). HPRT-testissä sytotoksisuutta pidetään liian korkeana, jos se ylittää 19 kohdassa määritetyt sytotoksisuuden enimmäistasot.

▼M8

6. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIN PERIAATE

7. Mutantit solut, joista puuttuu Hprt-entsyymitoiminta HPRT-testissä tai xprt-entsyymitoiminta XPRT-testissä, ovat resistenttejä puriinianalogi 6-tioguaniinin sytostaattisille vaikutuksille. Hprt:n (HPRT-testissä) tai gpt:n (XPRT-testissä) läsnä ollessa solut ovat herkkiä tioguaniinille, joka estää solun aineenvaihduntaa ja pysäyttää solunjakautumisen. Mutantit solut kykenevät siis lisääntymään tioguaniinin läsnä ollessa, kun taas normaalit, Hprt-entsyymiä (HPRT-testissä) tai gpt-entsyymiä (XPRT-testissä) sisältävät solut eivät kykene.

8. Suspensiossa tai yksikerrosviljelmissä olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi (3–6 tunniksi) testikemikaalille sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä (ks. 14 kohta) ja jatkoviljellään sytotoksisuuden toteamiseksi ja fenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi ennen mutanttien selektiota (14) (15) (16) (17). Sytotoksisuus määritetään yleensä mittaamalla viljelmien suhteellinen eloonjääneisyys (kloonaustehokkuus) heti altistuksen jälkeen ja mukauttamalla se mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon negatiiviseen kontrolliin verrattuna (18 kohta ja lisäys 2). Altistettuja viljelmiä pidetään kasvatusliuoksessa riittävän pitkä aika, joka on jokaiselle solutyypille ominainen, jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista (yleensä vähintään 7–9 päivää). Fenotyypin ilmentymisen jälkeen mutaationopeus lasketaan siten, että tunnettu lukumäärä soluja kylvetään toisaalta mutanttipesäkkeiden toteamiseksi selektiivistä ainetta sisältävälle alustalle ja toisaalta kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden) määrittämiseksi alustalle, joka ei sisällä selektiivistä ainetta. Sopivan inkubaatioajan kuluttua lasketaan pesäkkeet. Mutaationopeus lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän perusteella mutanttien selektion aikaisella kloonaustehokkuudella korjattuna.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Solut

9. HPRT- ja XPRT-testeissä on käytettävä solutyyppejä, joiden on osoitettu olevan herkkiä kemiallisille mutageeneille ja joilla on hyvä kloonaustehokkuus, stabiili karyotyyppi ja stabiili spontaanimutaationopeus. HPRT-testissä yleisimmin käytettyjä solulinjoja ovat kiinanhamsterin solulinjat CHO, CHL ja V79, hiiren lymfoomasolulinja L5178Y ja ihmisen lymfoblastoidisolulinja TK6 (18) (19). XPRT-testissä käytetään CHO-linjasta peräisin olevia AS52-soluja, jotka sisältävät gpt-siirtogeenin (ja joista Hprt-geeni on poistettu) (20) (21); HPRT-testiä ei voida tehdä AS52-soluilla, koska hprt-geeni on poistettu. Muiden solulinjojen käyttö on perusteltava ja validoitava.

10. Solulinjoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja varmistettava, ettei mykoplasmakontaminaatiota ole (22) (23). Soluja ei pidä käyttää, jos ne ovat kontaminoituneet tai jos modaalinen kromosomimäärä on muuttunut. Normaali solusyklin kesto testauslaboratoriossa on

▼M8

määritettävä ja sen on oltava solujen julkaistujen ominaisuuksien mukainen. Myös isäntäsolukannan spontaani mutaationopeus on tarkistettava, eikä kantaa tule käyttää, ellei mutaationopeus ole hyväksyttävä.

11. Ennen kuin viljelmiä käytetään tässä testissä, niistä voi olla tarpeen poistaa olemassa olevat mutanttisolut esimerkiksi viljelemällä HAT-liuoksessa (HPRT-testi) ja MPA-liuoksessa (XPRT-testi) (5) (24) (ks. lisäys 1). Puhdistetut solut voidaan kylmäsäilöä ja sulattaa käytettäviksi varastokantoina. Sulatettua varastokantaa voidaan käyttää testaukseen, kun normaalit kaksinkertaistumisajat ovat umpeutuneet. XPRT-testiä tehtäessä AS52-solujen rutiiniviljelyssä on käytettävä sellaisia olosuhteita, joiden avulla varmistetaan gpt-siirtogeenin säilyminen (20).

Kasvatusliuokset ja viljelyolosuhteet

12. Soluviljelmiä on viljeltävä soveltuvassa kasvatusliuoksessa ja asianmukaisissa inkubaatio-olosuhteissa (kasvatusastiat, kosteutettu ilma, jonka CO_2-pitoisuus on 5 prosenttia, ja 37 °C:n inkubointilämpötila). Soluviljelmät on pidettävä aina sellaisissa olosuhteissa, joiden avulla varmistetaan, että ne kasvavat log-vaiheessa. On erityisen tärkeää valita sellaiset kasvatusliuokset ja viljelyolosuhteet, jotka takaavat optimaalisen solukasvun ilmentymisaikana ja optimaalisen kloonaustehokkuuden sekä mutanteille että ei-mutanteille soluille.

Soluviljelmien valmistelu

13. Solulinjat kasvatetaan kantaviljelmistä ja kylvetään kasvatusliuokseen sellaiseen tiheyteen, että suspensioissa tai yksikerrosviljelmissä olevat solut kasvavat eksponentiaalisesti altistus- ja ilmentymisaikana (esimerkiksi konfluenssia on vältettävä yksikerrosviljelmissä kasvavien solujen osalta).

Metabolinen aktivaatio

14. Jos solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä, on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä. Yleisimmin käytetty järjestelmä, jota suositellaan oletusarvoisesti, ellei toisin toimiminen ole perusteltua, on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (25) (26) (27) (28) tai fenobarbitaalin ja β-naftoflavonin (29) (30) (31) (32) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrsijöiden (yleensä rottien) maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmä ei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen kanssa (33), ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254 (29) (31). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue on 1–2 tilavuusprosenttia, mutta sen pitoisuutta voidaan nostaa 10 tilavuusprosenttiin lopullisessa testiliuoksessa. Testattavien aineiden luokka saattaa vaikuttaa siihen, mitä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tai metabolisen indusoijan tyyppiä ja pitoisuutta päätetään käyttää (34) (35) (36).

Testikemikaalin valmistus

15. Kiinteät testikemikaalit on valmistettava sopivissa liuottimissa ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä (ks. 16 kohta). Nestemäiset testikemikaalit voidaan lisätä suoraan testijärjestelmään ja/tai laimentaa ennen testijärjestelmässä käsittelyä. Kaasujen tai haihtuvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä tarvittavia muutoksia; kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (37) (38). Testikemikaali on valmistettava juuri ennen käsittelyä, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

▼M8

KOE-OLOSUHTEET

Liuottimet

16. Liuotin on valittava siten, että testikemikaalien liukoisuus on mahdollisimman hyvä eikä se haittaa testin suorittamista esimerkiksi muuttamalla solukasvua, vaikuttamalla testikemikaalin eheyteen, reagoimalla viljelyastioiden kanssa tai haittaamalla metabolista aktivaatiojärjestelmää. Vesipitoisen liuottimen (tai soluviljelmän kasvatusliuoksen) käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Vakiintuneita liuottimia ovat esimerkiksi vesi tai dimetyylisulfoksidi. Yleensä orgaanisten liuottimien osuus ei saa ylittää yhtä ja vesipitoisten liuottimien (suolaliuos tai vesi) kymmentä tilavuusprosenttia lopullisessa käsittelyaineessa. Jos testissä käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia (esimerkiksi etanolia tai asetonia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne, testikemikaalit ja testijärjestelmä sopivat yhteen ja etteivät ne ole genotoksisia käytettyinä pitoisuuksina. Tällaisten perustelevien tietojen puuttuessa on tärkeää käyttää käsittelemättömiä kontrolleja (ks. lisäys 1), jotka osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta mitään haitallisia tai mutageenisiä vaikutuksia.

Sytotoksisuuden mittaus ja altistuspitoisuuksien valinta

17. Päätettäessä suurimmasta testikemikaalin pitoisuudesta on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta (ks. 20 kohta), saostumista kasvatusliuokseen (ks. 21 kohta) tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (ks. 5 kohta). Jos testikemikaali aiheuttaa sitä lisättäessä kasvatusliuoksen pH-arvon merkittävän muuttumisen, pH-arvoa voidaan mukauttaa puskuroimalla lopullinen käsittelyliuos väärien positiivisten tulosten välttämiseksi ja asianmukaisten viljelyolosuhteiden säilyttämiseksi.

18. Pitoisuuden valinta perustuu sytotoksisuuteen ja muihin näkökohtiin (ks. 22–22 kohta). Vaikka sytotoksisuuden arviointi alustavassa testissä saattaa olla hyödyllinen, jotta voidaan määrittää pääasiallisessa kokeessa käytettävät pitoisuudet, alustava testi ei ole pakollinen. Vaikka alustava sytotoksisuustesti tehtäisiin, sytotoksisuus on kunkin viljelmän osalta silti mitattava myös pääasiallisessa kokeessa. Sytotoksisuus on arvioitava käyttämällä suhteellista eloonjääneisyyttä eli maljattujen solujen kloonaustehokkuutta heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna solumäärän perusteella verrattuna negatiivisten kontrollien kloonaustehokkuuteen (joille määritetty eloonjääneisyys on 100 %) (ks. kaavio lisäyksestä 2).

19. Vähintään neljää hyväksymisperusteet (asianmukainen sytotoksisuus, solumäärä jne.) täyttävää testipitoisuutta (pois lukien liuotinkontrolli ja positiiviset kontrollit) on arvioitava. Vaikka rinnakkaisten viljelmien käyttö on suositeltavaa, kunkin testattavan pitoisuuden yhteydessä voidaan käyttää joko rinnakkaisviljelmiä tai yhtä viljelmää. Riippumattomista rinnakkaisviljelmistä tietyllä pitoisuudella saadut tulokset on raportoitava erikseen, mutta ne voidaan yhdistää tietojen analyysia varten (17). Sellaisten testikemikaalien kohdalla, jotka osoittavat vähän tai eivät lainkaan sytotoksisuutta, sopiva pitoisuusväli on yleensä noin 2–3. Jos sytotoksisuutta esiintyy, valittujen testipitoisuuksien on katettava vaihteluväli sytotoksisuuden esiintymispitoisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan. Monien testikemikaalien pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä,

▼M8

ja jotta saataisiin tietoja sytotoksisuuden koko vaihteluvälistä tai voitaisiin tutkia annosvastesuhdetta tarkasti, voi olla tarpeen käyttää pitoisuuksia, jotka ovat lähempänä toisiaan, ja useampaa kuin neljää pitoisuutta erityisesti tilanteissa, joissa tarvitaan toistettuja kokeita (ks. 43 kohta). Useamman kuin neljän pitoisuuden käyttö voi olla erityisen tärkeää silloin, kun käytetään yksittäisiä viljelmiä.

20. Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, suurimmalla pitoisuudella pitäisi saavuttaa 20 ja 10 prosentin välillä vaihteleva suhteellinen eloonjääneisyys. Vain 10 prosentin tai sitä pienempään suhteelliseen eloonjääneisyyteen viittaavia positiivisia tuloksia on tulkittava varoen (43 kohta).

21. Sellaisten huonosti liukenevien testikemikaalien kohdalla, jotka eivät ole sytotoksisia pienintä liukenematonta pitoisuutta pienempinä pitoisuuksina, suurimmassa analysoitavassa pitoisuudessa on esiinnyttävä testikemikaalille altistumisen päättyessä silmin tai käänteismikroskoopilla nähtävää sameutta tai saostumista. Vaikka sytotoksisuutta esiintyisi pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, on suositeltavaa testata ainoastaan yksi sameutta tai näkyvää saostumista tuottava pitoisuus, koska saostuminen saattaa aiheuttaa vääriä vasteita. Saostumista aiheuttavissa pitoisuuksissa on huolehdittava siitä, ettei saostuminen vaikuta testin suorittamiseen. Ennen koetta saattaa olla hyödyllistä määrittää liukoisuus soluviljelmän kasvatusliuokseen.

22. Jos saostumista tai rajoittavaa sytotoksisuutta ei esiinny, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 10 mM, 2 mg/ml tai 2 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin (39) (40). Jos testikemikaalin koostumusta ei ole määritelty eli se on esimerkiksi koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali (UVCB-aine) (41) taikka ympäristöstä otettu näyte, suurimman pitoisuuden on riittävän sytotoksisuuden puuttuessa ehkä oltava suurempi (esimerkiksi 5 mg/ml) kunkin osan pitoisuuden lisäämiseksi. On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (42).

Kontrollit

23. Kaikkiin testiolosuhteisiin on sisällytettävä samanaikaiset negatiiviset kontrollit (ks. 16 kohta), jotka koostuvat pelkästään käsittelyliuoksessa olevasta liuottimesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä.

24. Samanaikaisia positiivisia kontrolleja tarvitaan osoittamaan laboratorion kyky tunnistaa mutageenejä käytetyn testisuunnitelman olosuhteissa sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus, kun tämä on tarpeen. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista esitetään jäljempänä taulukossa 1. Vaihtoehtoisia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää perustelluissa tapauksissa. Koska nisäkässoluilla tehtävät *in vitro* -geenitoksisuustestit ovat riittävän standardoidut, testit, joissa käytetään käsittelyjä eksogeenisen metabolisen aktivaation kanssa tai ilman sitä, voidaan tehdä käyttäen vain yhtä positiivista kontrollia, joka vaatii metabolista aktivaatiota. Tässä tapauksessa tämä yksittäinen positiivinen kontrollivaste osoittaa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän toiminnan että testausjärjestelmän herkkyyden. Kutakin positiivista kontrollia on käytettävä yhtenä tai useampana pitoisuutena, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa oleva lisääntyminen taustaan verrattuna. Näin voidaan osoittaa testausjärjestelmän herkkyys, ja tässä testimenetelmässä määritetyt raja-arvot ylittävä sytotoksisuustaso ei saa vaarantaa vasteen luotettavuutta (ks. 20 kohta).

▼M8

Taulukko 1

Vertailuaineet, joita suositellaan laboratorion pätevyyden arvioimiseksi ja positiivisten kontrollien valintaan

Metabolinen aktivaatio	Lokus	Aine ja CAS-nro
Ei eksogeenista metabolista aktivaatiota	*Hprt*	Etyylimetaanisulfonaatti [CAS-nro 62-50-0] Etyylinitrosourea [CAS-nro 759-73-9] 4-nitrokinoliini-1-oksidi [CAS-nro 56-57-5]
	xprt	Streptonigriini [CAS-nro 3930-19-6] Mitomysiini C [CAS-nro 50-07-7]
Eksogeeninen metabolinen aktivaatio	*Hprt*	3-metyylikolantreeni [CAS-nro 56-49-5] 7,12-dimetyylibentsantraseeni [CAS-nro 57-97-6] Bentso[a]pyreeni [CAS-nro 50-32-8]
	xprt	Bentso[a]pyreeni (CAS-nro 50-32-8)

MENETTELY

Käsittely testikemikaalilla

25. Lisääntyvät solut altistetaan testikemikaalille metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa ja ilman sitä. Altistusajan on oltava sopiva (asianmukainen aika on yleensä 3–6 tuntia).

26. Jokaisessa testiviljelmässä (kontrolli ja altistus) kussakin testivaiheessa käytettävien solujen vähimmäismäärän tulee perustua spontaaniin mutaationopeuteen. Yleisohje on altistaa ja siirrostaa riittävästi soluja, jotta jokaisessa viljelmässä on testin jokaisessa vaiheessa 10 spontaanimutaatiota (17). Spontaani mutaationopeus on yleensä 5–20 × 10-6. Jotta spontaani mutaationopeus olisi 5 × 10-6 ja jotta spontaanimutaatioita olisi riittävästi (vähintään 10) myös niissä viljelmissä, jotka on altistettu pitoisuuksille, jotka aiheuttavat 90 prosentin sytotoksisuutta käsittelyn aikana (suhteellinen eloonjääneisyys 10 prosenttia), on käsiteltävä vähintään 20 × 106 solua. Lisäksi on viljeltävä riittävä määrä soluja (aina kuitenkin vähintään 2 miljoonaa) ilmentymisaikana, ja solut on maljattava mutanttien selektiota varten (17).

Fenotyypin ilmentymisaika ja mutaationopeuden mittaus

27. Altistusjakson jälkeen solut viljellään mutanttifenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi. Vähintään 7–9 päivää on yleensä riittävä, jotta hiljattain aiheutettujen Hprt- ja xprt-mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista (43) (44). Tänä aikana soluja jatkoviljellään säännöllisesti, jotta niiden eksponentiaalinen kasvu jatkuisi. Fenotyypin ilmentymisen jälkeen solut maljataan uudelleen selektiivistä ainetta (6-tioguaniinia) sisältävään kasvatusliuokseen, jotta voidaan määrittää mutanttien määrä ja kloonaustehokkuus selektion aikana. Yksikerrosviljelyssä voidaan käyttää maljoja tai suspensiossa olevien solujen osalta mikrokuoppalevyjä. Mutanttien selektion yhteydessä solut on maljattava sellaiseen tiheyteen, että mutanttien talteenotto voidaan varmistaa (ts. välttää metabolinen yhteisvaikutus) (17). Levyjä inkuboidaan optimaalisen pesäkekasvun kannalta riittävän pitkä aika (esimerkiksi 7–12 päivää), minkä jälkeen pesäkkeet lasketaan. Mutaationopeus lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän perusteella mutanttien selektion aikaisella kloonaustehokkuudella korjattuna (ks. kaavat lisäyksestä 2).

▼M8

Laboratorion pätevyys

28. Jotta laboratoriolla voidaan todeta olevan riittävä kokemus testistä ennen sen käyttöä rutiinitestauksessa, laboratorion täytyy olla suorittanut useita kokeita positiivisilla vertailuaineilla, jotka vaikuttavat eri mekanismien välityksellä (ainakin yksi metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa ja yksi ilman sitä vaikuttava aine, jotka valitaan taulukossa 1 luetelluista aineista), sekä useita negatiivisia kontrolleja (erilaisia liuottimia/kantaja-aineita käyttäen). Näiden positiivisten ja negatiivisten kontrollien vasteiden olisi oltava yhdenmukaisia lähdekirjallisuuden kanssa. Tätä ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta eli joista on 30–33 kohdassa määritelty laboratoriokohtainen tietokanta.

29. Tiettyjä positiivisia kontrolliaineita (ks. 25 kohdassa oleva taulukko 1) on tutkittava ilman metabolista aktivaatiota ja sen läsnä ollessa, jotta osoitetaan pätevyys havaita mutageenisia kemikaaleja, määrittää metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus ja osoittaa solujen käsittelyn aikaisten kasvuolosuhteiden, fenotyypin ilmentymisen, sekä mutanttien selektion asianmukaisuus ja laskentamenetelmien soveltuvuus. Valittujen aineiden eri pitoisuudet on valittava siten, että ne aiheuttavat toistettavissa olevia ja pitoisuuteen liittyviä lisääntymisiä taustaan verrattuna, koejärjestelmän herkkyyden ja dynaamisen alueen osoittamiseksi.

Aiemmat kontrollitiedot

30. Laboratorion on määritettävä:

— aikaisempien positiivisten kontrollien vaihteluväli ja jakauma

— aiempien negatiivisten kontrollien (käsittelemättömien ja liuotinkontrollien) vaihteluväli ja jakauma.

31. Kun ensimmäisen kerran saadaan tietoja aikaisemman negatiivisen kontrollin jakaumasta, samanaikaisten negatiivisten kontrollien pitäisi olla julkaistujen kontrollitietojen mukaisia (22). Kun kontrollin jakaumaan lisätään enemmän kokeellista tietoa, samanaikaisten negatiivisten kontrollien tulisi mieluiten sijoittua kyseisen jakauman 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (17) (45) (46).

32. Laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta on aluksi luotava vähintään 10 kokeella, mutta sen olisi mieluiten koostuttava vähintään 20 kokeesta, jotka on suoritettu vastaavissa testiolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (47)), positiivisten ja negatiivisten kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja sen osoittamiseksi, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän (46). Lisäsuosituksia aikaisempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aikaisempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksymisperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (45).

33. Negatiivisten kontrollitietojen on koostuttava mutaationopeuksista yhdessä viljelmässä tai mieluiten rinnakkaisviljelmissä 23 kohdan mukaisesti. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (17) (45) (46). Jos samanaikaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 prosentin kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisempien kontrollien jakaumaan edellyttäen, että ne eivät ole äärimmäisiä harha-arvoja ja on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. edellä) ja että kyse ei ole teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

▼M8

34. Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon järjestelyn yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aikaisempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aikaisempien kontrollien tietokanta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten esittäminen

35. Tulokset on esitettävä siten, että ne sisältävät kaikki sytotoksisuuden laskemiseen tarvittavat tiedot (suhteellisella eloonjääneisyydellä ilmaistuna). Sekä altistettuja että kontrolliviljelmiä koskevien tietojen on sisällettävä solujen lukumäärä altistuksen päättyessä, heti altistuksen jälkeen maljattujen solujen lukumäärä sekä pesäkkeiden lukumäärä (tai pesäkkeettömien kuoppien lukumäärä mikrokuoppalevymenetelmässä). Suhteellinen eloonjääneisyys on ilmaistava jokaisen viljelmän osalta prosenttiosuutena samanaikaiseen liuotinkontrolliin nähden (ks. määritelmät lisäyksestä 1).

36. Tulokset on esitettävä siten, että ne sisältävät kaikki mutaationopeuden laskemiseen tarvittavat tiedot. Sekä altistettuja että kontrolliviljelmiä koskevien tietojen on sisällettävä 1) selektiivisen aineen kanssa ja ilman sitä maljattujen solujen lukumäärä (silloin, kun solut maljataan mutanttien selektiota varten) ja 2) laskettujen pesäkkeiden lukumäärä (tai pesäkkeettömien kuoppien lukumäärä mikrokuoppalevymenetelmässä) maljoista, joissa on tai ei ole selektiivistä ainetta. Mutaationopeus lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän perusteella (maljat, joissa on selektiivistä ainetta) kloonaustehokkuudella korjattuna (maljat, joissa ei ole selektiivistä ainetta). Mutaationopeus on ilmaistava mutanttien solujen lukumäärällä miljoonaa elinkykyistä solua kohti (ks. määritelmät lisäyksestä 1).

37. Kustakin viljelmästä on esitettävä tiedot erikseen. Kaikista tiedoista on lisäksi esitettävä yhteenveto taulukkona.

Hyväksymisperusteet

38. Testin hyväksymisperusteet ovat seuraavat:

— Samanaikaisten negatiivisten kontrollien tietoja pidetään hyväksyttävinä lisättäviksi laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan 33 kohdassa kuvatun mukaisesti.

— Samanaikaisten positiivisten kontrollien (ks. 24 kohta) on aiheutettava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin.

— Testissä käytettiin kahdenlaisia testiolosuhteita (ts. metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä, ellei ensimmäinen niistä tuottanut positiivisia tuloksia (ks. 25 kohta).

— Riittävä määrä soluja ja pitoisuuksia on analysoitavissa (25, 26 ja 19 kohta).

— Suurimman pitoisuuden valintaperusteet vastaavat 20, 21 ja 22 kohdassa kuvattuja perusteita.

Tulosten arviointi ja tulkinta

39. Mikäli kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi positiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista testiolosuhteista:

▼M8

— vähintään yksi testipitoisuuksista aiheuttaa tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

— kasvu riippuu pitoisuudesta, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä

— mikä tahansa tuloksista on aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja; ks. 33 kohta).

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan aiheuttaa geenimutaatioita viljellyissä nisäkässoluissa tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia sopivimmista tilastomenetelmistä (46) (48).

40. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, jos kaikissa tutkituissa testiolosuhteissa:

— mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— pitoisuudesta riippuvaa kasvua ei esiinny asianmukaisella trenditestillä arvioituna

— kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman rajoissa (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja; ks. 33 kohta).

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali voi aiheuttaa geenimutaatioita viljellyissä nisäkässoluissa tässä testijärjestelmässä.

41. Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

42. Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen edellä kuvatulla tavalla tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea, tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvion ja /tai lisätutkimusten avulla. Kokeen toistaminen käyttäen mahdollisesti modifioituja testiolosuhteita (esimerkiksi pitoisuusvälit, muut metaboliset aktivaatiojärjestelmät [kuten S9-jakeen pitoisuus tai alkuperä]) saattaa olla hyödyllistä.

43. Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Tällöin testikemikaalin vaste jää epäselväksi (sen tulkitaan olevan yhtä todennäköisesti positiivinen tai negatiivinen).

Testiraportti

44. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon mittaus, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin.

▼**M8**

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin:

— liuottimen valintaperusteet

— liuottimen pitoisuus lopullisessa kasvatusliuoksessa.

Solut:

Laboratorion kantaviljelmät:

— solulinjojen tyyppi ja lähde

— siirrostusten lukumäärä, jos saatavilla, ja taustatiedot laboratoriossa

— karyotyypin ominaisuudet ja/tai kromosomien modaalinen lukumäärä

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät

— mykoplasman puuttuminen

— solujen kaksinkertaistumisajat.

Testiolosuhteet:

— pitoisuuksien ja viljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esimerkiksi sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset

— kasvatusliuosten koostumus, hiilidioksidipitoisuus, kosteustaso

— testikemikaalin pitoisuus ilmaistuna lopullisena pitoisuutena kasvatusliuoksessa (esim. µg tai mg/ml tai mM kasvatusliuoksessa)

— kasvatusliuokseen lisätyn liuottimen ja testikemikaalin pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubointilämpötila

— inkubointiaika

— altistuksen kesto

— solutiheys altistuksen aikana

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus (S9-jakeen alkuperä, S9-seoksen valmistusmenetelmä, S9-seoksen ja S9-jakeen pitoisuus tai tilavuus lopullisessa kasvatusliuoksessa, S9-jakeen laadunvalvonta)

— positiiviset ja negatiiviset kontrolliaineet, kunkin käsittelyolosuhteen lopulliset pitoisuudet

▼**M8**

— ilmentymisajan pituus (myös kylvettyjen solujen lukumäärä sekä jatkoviljelmät ja kasvatusliuoksen vaihtoajat tarvittaessa)

— selektiivisen aineen tunnistetiedot ja sen pitoisuus

— testien hyväksymisperusteet

— elinkykyisten ja mutanttien solujen laskentamenetelmät

— sytotoksisuuden mittauksessa käytetyt menetelmät

— muut sytotoksisuuteen ja käytettyyn menetelmään liittyvät tiedot

— inkubointiaikojen kesto maljauksen jälkeen

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— pH:n, osmolaliteetin ja saostumisen määritysmenetelmät.

Tulokset:

— altistettujen solujen lukumäärä ja jokaisesta viljelmästä jatkoviljeltyjen solujen lukumäärä

— sytotoksisuusmittaukset ja mahdolliset muut havainnot

— saostumisen merkit ja määrittämisajankohta

— selektiiviseen ja ei-selektiiviseen kasvatusliuokseen maljattujen solujen lukumäärä

— ei-selektiivisessä kasvatusliuoksessa olevien pesäkkeiden lukumäärä ja selektiivisessä kasvatusliuoksessa olevien resistenttien pesäkkeiden lukumäärä ja niihin liittyvät mutaationopeudet

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisten negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aiemmat negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot, vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat sekä luottamusväli (esimerkiksi 95 prosenttia) ja tietojen määrä

— tilastoanalyysit (yksittäisistä viljelmistä ja yhdistetyistä rinnakkaisviljelmistä, jos tarpeen) sekä mahdolliset p-arvot.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, New York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306–1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394–403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121–128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17–36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147–204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297–305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789–886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439–452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177–183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135–141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9–17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133–147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Teoksessa: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, s. 66–101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193–214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165–175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411–1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Tekeillä oleva käsikirjoitus.)

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261–287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299–305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83–90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365–373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347–364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175–177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Teoksessa: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (eds.), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55–65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51–59.

(33) UNEP. (2001). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus, Yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelma (UNEP). Saatavana osoitteessa [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147–156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Environ. Mol. Mutation., 4, 7–18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Environ. Mol. Mutation., 4, 7–18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Teoksessa: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, s. 91–103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5, 795–801.

(39) OECD (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (testiohjeet 473, 476 ja 487). Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation., 54, 36–43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Saatavana osoitteessa [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109–118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121–8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87–90.

(46) OECD (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. Teoksessa: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Emäsparien korvautumista aiheuttavat mutageenit: Kemikaaleja, jotka aiheuttavat emäsparien korvautumisen DNA:ssa.

Kemikaali: Aine tai seos.

Kloonaustehokkuus: Niiden harvakseltaan maljattujen solujen prosentuaalinen osuus, jotka pystyvät kasvamaan pesäkkeeksi, joka voidaan laskea.

Pitoisuudet: Testikemikaalin lopulliset pitoisuudet kasvatusliuoksessa

Sytotoksisuus: Tämän testimenetelmän mukaisissa analyyseissä sytotoksisuus määritetään aineelle altistettujen solujen suhteellisen eloonjääneisyyden pienentymisenä verrattuna negatiiviseen kontrolliin (ks. tätä koskeva kohta).

Forward-mutaatio: Geenin mutaatio parentaalisesta tyypistä mutanttimuotoon, minkä seurauksena geenin koodittama valkuaisaine menettää entsymaattisen aktiivisuutensa tai sen entsyymiaktiivisuus muuttuu.

Lukukehyksensiirtomutageenit: Kemikaaleja, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA-molekyylissä.

Genotoksinen: Yleinen nimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa DNA:n katkeamiselle, addukteille, uudelleenjärjestäytymiselle, mutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

HAT-liuos: Hypoksantiinia, aminopteriinia ja tymidiiniä sisältävä liuos, jota käytetään Hprt-mutanttien puhdistukseen.

Mitoottinen rekombinaatio: Mitoosin aikana tapahtuva kahden homologisen kromatidin rekombinaatio, joka voi saada aikaan DNA:n kahden säikeen katkeamisen tai heterotsygoottisuuden häviämisen.

MPA-liuos: Ksantiinia, adeniinia, tymidiiniä, aminopteriinia ja mykofenolihappoa sisältävä liuos, jota käytetään Xprt-mutanttien puhdistukseen.

Mutageeninen: Aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa (-rakenteissa) tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Mutaationopeus: Selektiiviselle alustalle maljatuista soluista todettujen mutanttipesäkkeiden lukumäärä korjattuna selektion aikaisella kloonaustehokkuudella (tai elinkykyisyydellä).

Fenotyypin ilmentymisaika: Altistuksen jälkeinen aika, jona geneettinen muutos kiinnittyy genomiin ja mahdolliset aikaisemmat geenituotteet poistuvat siten, että fenotyyppinen ominaisuus muuttuu.

Suhteellinen eloonjääneisyys: Suhteellista eloonjääneisyyttä käytetään altistukseen liittyvän sytotoksisuuden mittarina. Suhteellinen eloonjääneisyys on maljattujen solujen kloonaustehokkuus heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna ja verrattuna negatiivisten kontrollien kloonaustehokkuuteen (joille määritetty eloonjääneisyys on 100 %).

Maksasta eristetty S9-jae: Maksahomogenaatin supernatantti 9 000 g:n sentrifugoinnin jälkeen, ts. käsittelemätön maksanäyte.

▼**M8**

S9-seos: Maksasta eristetyn S9-jakeen ja metabolisen entsyymitoiminnan kannalta välttämättömien kofaktorien seos.

Liuotinkontrolli: Yleinen nimitys kontrolliviljelmille, joihin lisätään vain testikemikaalin liuottamiseen käytettyä liuotinta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Käsittelemätön kontrolli: Soluviljelmät, joita ei altisteta (eli joihin ei lisätä testikemikaalia eikä liuotinta), mutta jotka käsitellään samanaikaisesti samalla tavoin kuin testikemikaalia saavat soluviljelmät.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali

▼M8

Lisäys 2

KAAVAT SYTOTOKSISUUDEN JA MUTAATIONOPEUDEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN

Sytotoksisuus määritetään suhteellisena eloonjääneisyytenä eli maljattujen solujen kloonaustehokkuudella heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna ja verrattuna negatiivisten kontrollien mukautettuun kloonaustehokkuuteen (joille määritetty eloonjääneisyys on 100 %) (ks. suhteellisen eloonjääneisyyden kaava jäljempänä).

Testikemikaalille altistetun viljelmän mukautettu kloonaustehokkuus lasketaan näin:

$$\text{Mukautettu kloonaustehokkuus (CE)} = \frac{\text{Solujen määrä käsittelyn lopussa}}{\text{Solujen määrä käsittelyn alussa}}$$

Testikemikaalille altistetun viljelmän suhteellinen eloonjääneisyys lasketaan näin:

$$\text{Suhteellinen eloonjääneisyys (RS)} = \frac{\text{Mukautettu kloonastehokkuus käsitellyssä viljelmässä}}{\text{Mukautettu kloonaustehokkuus liuotinkontrollissa}} \times 100$$

Mutaationopeus on selektiivisessä kasvatusliuoksessa todettujen mutanttipesäkkeiden kloonaustehokkuus jaettuna ei-selektiivisellä kasvatusliuoksessa todettujen pesäkkeiden kloonaustehokkuudella samassa viljelmässä selektion aikana.

$$\text{Mutant frequency} = \frac{\text{Mutanttipesäkkeiden kloonaustehokkuus selektiivisessä kasvatusliuoksessa}}{\text{Kloonaustehokkuus ei — selektiivisessä kasvatusliuoksessa}}$$

Kun kloonaustehokkuuden määrittämisessä käytetään maljoja:

Kloonaustehokkuus (CE) = pesäkkeiden lukumäärä / maljattujen solujen lukumäärä.

Kun kloonaustehokkuuden määrittämisessä käytetään mikrokuoppalevyjä:

Pesäkkeiden lukumäärä kuoppaa kohti mikrokuoppalevyissä noudattaa Poissonin jakaumaa.

Kloonaustehokkuus = -LnP(0) / maljattujen solujen lukumäärä kuoppaa kohti

Tässä kaavassa -LnP(0) on tyhjien kuoppien todennäköinen lukumäärä kylvetyistä kuopista, ja sitä kuvataan seuraavalla kaavalla:

LnP(0)= -Ln (tyhjien kuoppien lukumäärä / maljattujen kuoppien lukumäärä)

▼M7

———————

———————

———————

▼B

B.21. **SOLUTRANSFORMAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUVILJELMILLÄ**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄ

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Nisäkässoluviljelmillä voidaan tutkia *in vitro* sellaisten aineitten aikaansaamia fenotyyppisiä muutoksia, jotka *in vivo* aiheuttavat pahanlaatuista transformaatiota. Laajassa käytössä olevia soluja ovat mm. C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE ja Fischer rotan solut. Testit perustuvat solujen morfologian muutoksiin, fokusten muodostukseen tai muutoksiin kasvukyvyn pehmytagarissa. On olemassa myös vähäisemmässä käytössä olevia testejä, joilla voidaan tutkia muita, karsinogeenisille aineille altistumisen aiheuttamia fysiologisia tai morfologisia muutoksia soluissa. Millään *in vitro* -testeissä havainnoidulla tulostapahtumalla ei ole osoitettu olevan suoraa mekaanista yhteyttä syövän syntyyn. Joillakin testeillä voidaan havaita tuumoripromoottoreiden muodostuminen. Sytomyrkyllisyys voidaan todeta havainnoimalla tutkittavan aineen vaikutusta soluviljelmien pesäkkeenmuodostuskykyyn (kloonaustehokkuuteen) tai kasvunopeuteen. Sytotoksisuuden mittauksen tarkoituksena on varmistaa, että altistustaso on toksikologisesti mielekäs, mutta kaikissa testeissä tätä mittausta ei voida käyttää transformaatiofrekvenssin laskemiseen, sillä eräät testit edellyttävät pitkää inkubaatiota ja/tai jatkomaljausta.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

S o l u t

Testeissä voidaan käyttää useita erilaisia solulinjoja tai primaarisoluja transformaatiotestistä riippuen. Tutkijan on varmistettava, että testissä käytettävissä soluissa ilmenee haluttu fenotyyppinen muutos tunnetuille karsinogeeneille altistamisen jälkeen ja että testin kelpoisuus ja luotettavuus on osoitettu ja kirjattu tutkijan omassa laboratoriossa.

K a s v a t u s a l u s t a

Kasvatusalustojen ja koeolosuhteiden on sovelluttava käytettävälle transformaatiotestille.

▼B

Tutkittava aine

Tutkittavat aineet voidaan sekoittaa kasvatusalustaan tai liuottaa tai sekoittaa soveltuvaan kantaja-aineeseen ennen solujen altistamista. Kantaja-aineen loppupitoisuus kasvatusalustassa ei saa vaikuttaa solujen elinkykyyn, kasvunopeuteen tai transformaatiofrekvenssiin.

Metabolinen aktivaatio

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Jos käytetään solutyyppejä, joilla on itsessään kyky metaboloida vierasaineita, tämän metabolisen aktiivisuuden on oltava luonteeltaan tunnetusti soveltuva tutkittavalle aineryhmälle.

Koeolosuhteet

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Kuhunkin kokeeseen on sisällyttävä sekä suoraan vaikuttavia että metabolista aktivaatiota vaativia positiivisia kontrolleja; myös negatiivista kontrollia (kantaja-ainekontrollia) on käytettävä.

Seuraavassa esimerkkejä aineista, joita voidaan käyttää positiivisina kontrolleina:

— suoraan vaikuttavat aineet:

  — etyylimetaanisulfonaatti,

  — μ-propiolaktoni,

— metabolista aktivaatiota vaativat aineet:

  — 2-asetyyliaminofluoreeni,

  — 4-dimetyyliaminoatsobentseeni,

  — 7,12-dimetyylibentsantraseeni.

Tarvittaessa kokeessa voidaan lisäksi käyttää ylimääräistä positiivista kontrollia, joka kuuluu samaan kemiallisten aineitten ryhmään kuin tutkittava yhdiste.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava useana eri pitoisuutena, joiden on saatava aikaan pitoisuudesta riippuva myrkkyvaikutus siten, että korkein pitoisuus aiheuttaa suuren solujen kuolleisuuden ja että alhaisimman pitoisuuden aiheuttama kuolleisuus on likimäärin sama kuin negatiivisen kontrollin aikaansaama. Huonosti veteen liukenevilla aineilla pitoisuus määräytyy liukoisuuden mukaan. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

▼B

Testin suorittaminen

Solujen altistusajan on oltava käytettävään testiin sopiva; jos altistusaika on pitkä, saattaa olla välttämätöntä sen kuluessa vaihtaa soluille tuore kasvatusalusta (ja mahdollisesti tuore metabolinen aktivaatioseos) sekä annostella tutkittava aine uudelleen. Solut, joilla ei itsessään ole riittävää kykyä metaboloida vierasaineita, on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Altistuksen jälkeen solut huuhdellaan puhtaiksi tutkittavasta aineesta ja niitä viljellään olosuhteissa, jotka mahdollistavat tarkasteltavana olevan transformoituneen fenotyypin ilmaantumisen ja transformaatiofrekvenssin määrittämisen. Kaikki tulokset varmistetaan erillisellä kokeella.

2. **TULOKSET**

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Tarkka esitysmuoto riippuu käytetystä testistä, ja se voi sisältää esim. maljakohtaiset tulokset, positiivisten maljojen lukumäärät tai transformoituneiden solujen lukumäärät. Kuolleisuus mahdollisuuksien mukaan on ilmaistava prosenttiosuutena kontrolliviljelmien solujen lukumäärästä ja transformaatiofrekvenssi transformoituneiden solujen osuutena eloonjääneistä soluista. Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetty solutyyppi, soluviljelmien lukumäärä, soluviljelmien edelläpitomenetelmät,

— koeolosuhteet: tutkittavan aineen pitoisuus, käytetty kantaja-aine, inkubaatioaika, altistuksen kesto ja toistokerrat, solutiheys altistuksen aikana, käytetty eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä, positiiviset ja negatiiviset kontrollit, tarkasteltavana olleen fenotyypin kuvaus, mahdollisesti käytetty valikointimenetelmä, annostuksen valinnassa käytetyt perusteet,

— eloonjääneiden ja transformoituneiden solujen laskentamenetelmä,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼M8

B.22. **DOMINOIVA LETAALITESTI JYRSIJÖILLÄ**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 478 (2016). Testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi. Tämä muokattu versio testimenetelmästä perustuu yli 30 vuoden kokemukseen tästä testistä ja mahdollisuuteen liittää tai yhdistää tämä testi muihin toksisuustesteihin, joita ovat esimerkiksi kehitys-, lisääntymis- tai genotoksisuustutkimukset. Koska tällä testillä on rajoituksensa ja koska siinä pitää käyttää paljon koe-eläimiä, sitä ei ole tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisena menetelmänä vaan pikemminkin täydentävänä testimenetelmänä, jota voidaan käyttää vain, jos sille ei ole vaihtoehtoa sääntelyvaatimusten kannalta. Kun toksisuustestejä yhdistetään, suuret määrät koe-eläimiä välttyvät toksisuustesteissä käyttämiseltä. OECD on laatinut asiakirjan (1), joka sisältää yhteenvedon geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsauksen näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin.

2. Dominoivan letaalitestin tarkoituksena on tutkia, tuottavatko kemikaalit mutaatioita, jotka johtuvat itusolujen kromosomipoikkeavuuksista. Lisäksi dominoiva letaalitesti on erityisen relevantti genotoksisuuden arvioinnissa, koska vaikka lajien välillä voi olla vaihtelua, *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin liittyvät tekijät ovat aktiivisia ja voivat vaikuttaa vasteisiin. Kun testikemikaalille altistus aiheuttaa dominoivia letaalimutaatioita, on syytä olettaa, että kemikaalilla on testattavan lajin sukusoluihin kohdistuvia vaikutuksia.

3. Dominoivat letaalimutaatiot aiheuttavat alkio- tai sikiökuolemia. Kun testikemikaalille altistus aiheuttaa dominoivia letaalimutaatioita, on syytä olettaa, että kemikaalilla on testattavan lajin itusoluihin kohdistuvia vaikutuksia.

4. Dominoiva letaalitesti on hyödyllinen, kun täytyy vahvistaa positiiviset tulokset testeistä, joissa on käytetty somaattisia in vivo -päätetapahtumia, ja se on myös merkityksellinen päätetapahtuma ihmisiin kohdistuvien vaarojen ja itulinjan kautta välittyvien geneettisten sairauksien riskin ennustamisessa. Tässä testissä pitää kuitenkin käyttää paljon koe-eläimiä, ja se vaatii myös paljon työvoimaa. Näin ollen testin tekeminen on hyvin kallista ja aikaa vievää. Koska dominoivien letaalimutaatioiden spontaani esiintymistaajuus on melko korkea, testin herkkyys havaita mutaationopeuden pientä lisääntymistä on yleisesti rajallinen.

5. Keskeisten termien määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT HUOMIOT

6. Testi tehdään useimmiten hiirillä (2) (3) (4) mutta myös muut lajit, kuten rotta (5) (6) (7) (8), voivat olla toisinaan asianmukaisia, jos niiden käyttö on tieteellisesti perusteltua. Dominoivat letaalivaikutukset johtuvat yleensä merkittävistä kromosomipoikkeavuuksista (rakenteelliset ja numeeriset poikkeavuudet) (9) (10) (11), mutta geenimutaatioitakaan ei voida sulkea pois. Dominoiva

▼M8

letaalimutaatio on sellainen mutaatio, jota esiintyy pelkästään itusolussa, tai sellainen, joka kehittyy varhaisvaiheen alkiossa hedelmöittymisen jälkeen mutta ei aiheuta sukusolun toimintahäiriöitä vaan on letaali hedelmöittyneelle munasolulle tai kehittyvälle alkiolle.

7. Yksittäiset urokset pariutetaan peräkkäin astuttamattomien naaraiden kanssa määräajoin. Altistuksen jälkeisten parittelujen lukumäärä määräytyy dominoivan letaalitutkimuksen perimmäisen tavoitteen mukaan (23 kohta), ja sillä on määrä varmistaa, että dominoivat letaalivaikutukset arvioidaan uroksen itusolujen kaikissa kypsymisvaiheissa (12).

8. Jos on näyttöä siitä, että testikemikaali tai sen metaboliitti (metaboliitit) ei(vät) pääse kiveksiin, tätä testiä ei pidä käyttää.

TESTIN PERIAATE

9. Tässä testissä altistetaan yleensä urokset testikemikaalille asianmukaista reittiä pitkin ja pariutetaan ne altistamattomien ja astuttamattomien naaraiden kanssa. Erityyppisiä itusoluja voidaan testata jaksottamalla paritteluvälit. Parittelun jälkeen naaraat lopetetaan jonkin ajan kuluttua, ja niiden kohdut tutkitaan, jotta voidaan laskea kiinnittyneiden sekä elävien ja kuolleiden alkioiden lukumäärä. Testikemikaalin dominoiva letaalisuus määritetään vertaamalla, montako elävää kiinnittynyttä alkiota kullakin testiryhmän naaraalla on kantaja-aine-/liuotinkontrolliryhmän kunkin naaraan eläviin kiinnittyneisiin eläviin alkioihin nähden. Kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden lisääntyminen testiryhmän naarasta kohden verrattuna kontrolliryhmän naaraisiin kertoo siitä, että testikemikaali aiheuttaa alkiokuolemia kiinnittymisen jälkeen. Kiinnittymisen jälkeiset alkiokuolemat lasketaan määrittämällä kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden osuus kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärästä testiryhmässä ja vertaamalla sitä vastaavaan osuuteen kontrolliryhmässä. Ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat voidaan arvioida laskemalla munasarjojen keltarauhaset, joista vähennetään kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärä tai kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärä naarasta kohden testiryhmässä ja kontrolliryhmässä.

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

10. Laboratorion on todistettava tätä testiä koskeva pätevyytensä osoittamalla, että se pystyy tuottamaan dominoivien letaalivaikutusten esiintymistaajuuksia julkaistuista tiedoista (esimerkiksi (13) (14) (15) (16) (17) (18)) positiivisilla kontrolliaineilla (heikot vasteet mukaan luettuina), esimerkiksi niillä, jotka on lueteltu taulukossa 1, ja kantaja-ainekontrolleilla, ja negatiivisten kontrollien esiintymistaajuuksia, joita koskevien tietojen vaihteluväli on johdonmukaisesti hyväksyttävä (ks. viitteet edellä) tai laboratorion aiemman kontrollien jakauman mukainen, jos se on saatavilla.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Eläinlajin valinta

11. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia terveitä sukukypsiä eläimiä. Yleensä käytetään hiiriä, mutta myös rotat voivat olla sopivia. Kaikkia muita sopivia nisäkäslajeja voidaan käyttää, jos raportissa esitetään sille tieteellinen perustelu.

▼M8

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

12. Jyrsijöiden kohdalla koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden olisi mieluiten oltava 50–60 prosenttia, sen olisi oltava ainakin 40 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Huoneessa täytyy käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa se, miten siihen voidaan sekoittaa sopiva määrä testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Ennen altistusta tai parittelua jyrsijät on sijoitettava samaa sukupuolta edustaviin pienryhmiin (enintään viisi eläintä), ellei aggressiivista käyttäytymistä ole odotettavissa tai havaittu, mieluiten kiinteisiin häkkeihin, joissa on asianmukainen virikkeellinen ympäristö. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

13. Terveet, sukukypsät ja täysikasvuiset uros- ja naaraseläimet jaetaan satunnaisesti testi- ja kontrolliryhmiin. Eläimet merkitään yksilöllisesti inhimillisellä, mahdollisimman vähän invasiivisella toimenpiteellä (esimerkiksi rengastamalla, korvamerkillä, mikrosirulla tai biometrisellä tunnisteella, mutta ei varpaita tai korvia leikkaamalla), ja niitä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Ristikontaminaatiota positiivisella kontrollilla ja testikemikaalilla tulisi välttää. Tutkimuksen alkaessa eläinten painonvaihtelun on oltava vähäistä, ja se saa vaihdella korkeintaan ± 20 prosenttia kummankin sukupuolen keskimääräisestä painosta.

Annosten valmistelu

14. Kiinteät testikemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testikemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitysteiden kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Testiolosuhteet

Liuotin/kantaja-aine

15. Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan kemikaalin kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä yhteensopivista liuottimista/kantaja-aineista ovat vesi, fysiologinen suolaliuos, metyyliselluloosaliuos, natriumkarboksimetyyliselluloosaliuos, oliiviöljy ja maissiöljy.

Positiiviset kontrollit

16. Samanaikaisia positiivisia kontrollieläimiä on käytettävä aina, ellei laboratorio ole osoittanut pätevyyttään testin tekemisessä ja ellei se ole käyttänyt testiä rutiininomaisesti viime aikoina (esimerkiksi viiden viime vuoden aikana). Positiivisia kontrollieläimiä ei kuitenkaan tarvitse altistaa samaa reittiä kuin testikemikaalia saavia eläimiä, eikä näytteitä tarvitse ottaa kaikilta parittelujaksoilta. Positiivisten

▼M8

kontrolliaineiden on tiedettävä tuottavan dominoivia letaalivaikutuksia testissä käytetyissä olosuhteissa. Altistusta lukuun ottamatta kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin testiryhmien eläimiä.

17. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että ne tuottavat lieviä tai kohtalaisia vaikutuksia, jotta testin tehokkuutta ja herkkyyttä voidaan arvioida kriittisesti, mutta annosten on kuitenkin tuotettava jatkuvasti positiivisia dominoivia letaalivaikutuksia. Taulukossa 1 on esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista ja asianmukaisista annoksista.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista

Aine [CAS-numero] (viitenumero)	Vaikuttavan annoksen vaihteluväli (mg/kg) (jyrsijälajit)	Antoaika (päivää)
Trietyleenimelamiini [51-18-3] (15)	0,25 (hiiret)	1
Syklofosfamidi [50-18-0] (19)	50–150 (hiiret)	5
Syklofosfamidi [50-18-0] (5)	25–100 (rotat)	1
Etyylimetaanisulfonaatti [62-50-0] (13)	100–300 (hiiret)	5
Monomeerinen akryyliamidi [79-06-1] (17)	50 (hiiret)	5
Klorambusiili [305-03-3] (14)	25 (hiiret)	1

Negatiiviset kontrollit

18. Negatiivisia kontrollieläimiä, joille annetaan pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita käsitellään muuten samalla tavalla kuin testiryhmiä, on sisällytettävä kuhunkin näytteenottokertaan (20). Jos käytettävissä ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja, joissa osoitetaan, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta dominoivia letaalivaikutuksia tai muita haitallisia vaikutuksia, kullakin näytteenottokerralla olisi käytettävä myös altistamattomia kontrollieläimiä, jotta kantaja-ainekontrollin hyväksyttävyys voidaan todeta.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä

19. Yksittäiset urokset pariutetaan peräkkäin mieluiten yhden astuttamattoman naaraan kanssa määräajoin (esimerkiksi viikon välein, ks. 21 ja 23 kohta). On huolehdittava etukäteen siitä, että kussakin ryhmässä on riittävästi uroksia (kullakin parittelujaksolla astutettujen naaraiden määrään nähden), jotta saadaan aikaan tarvittava tilastollinen voima vähintään dominoivien letaalivaikutusten esiintymistiheyden kaksinkertaistumisen havaitsemiseksi (44 kohta).

20. Myös naaraiden määrä yhtä parittelujaksoa kohti on määritettävä etukäteen tilastollista voimaa koskevilla laskelmilla, jotta voidaan havaita vähintään dominoivien letaalivaikutusten esiintymistiheyden kaksinkertaistuminen (ts. riittävästi tiineitä naaraita, jotka tuottavat yhteensä vähintään 400 kiinnittynyttä alkiota) (20) (21) (22) (23) ja jotta odotettavissa on vähintään yksi kuollut kiinnittynyt alkio analyysiyksikköä (ts. annoskohtaista pariutumisryhmää) kohti (24).

▼M8

Altistusjakso ja parittelujaksot

21. Altistusohjelma määrää altistamisen jälkeisten parittelujaksojen määrän. Paritteluja olisi oltava niin monta, että kaikista uroksen itusolun kypsymisvaiheista voidaan arvioida dominoivien letaalivaikutusten aiheutuminen (12) (25). Yhdessä altistuksessa, jossa annetaan enintään viisi annosta päivässä, on oltava 8 (hiiret) tai 10 (rotat) parittelua viikon välein viimeisen altistuksen jälkeen. Jos testissä annetaan useampia annoksia, parittelujaksojen määrää voidaan vähentää altistusajan pitenemisen mukaan. Tavoitteena tulee kuitenkin olla kaikkien spermatogeneesin vaiheiden arviointi (esimerkiksi 28 vuorokauden altistuksen jälkeen vain neljä parittelua viikossa riittää, jotta voidaan arvioida hiiren spermatogeneesin kaikki vaiheet). Kaikki altistus- ja parittelusuunnitelmat on perusteltava tieteellisesti.

22. Naaraita on pidettävä urosten luona vähintään yhden kiimakierron ajan (yksi kiimakierto kestää sekä hiirillä että rotilla yhden viikon). Naaraita, jotka eivät paritelleet viikon parittelujaksolla, voidaan käyttää seuraavalla parittelujaksolla tai siihen saakka, kunnes parittelun on todettu tapahtuneen emättimessä esiintyvän sperman tai emätintulpan perusteella.

23. Altistus- ja paritteluohjelma on suunniteltava dominoivia letaalivaikutuksia koskevan tutkimuksen perimmäisen tavoitteen mukaan. Jos tavoitteena on selvittää, aiheuttaako tietty kemikaali dominoivia letaalimutaatioita, hyväksyttävä menetelmä olisi altistaa yksi spermatogeneesikierto kokonaan (ts. hiirellä 7 viikkoa, 5–7 altistusta viikossa) ja antaa eläimen paritella vasta kierron lopussa. Mutta jos tavoitteena on selvittää, minkä tyyppinen itusolu on herkkä dominoivien letaalivaikutusten aikaansaamiselle, ensisijainen menetelmä on yhden tai viiden päivän altistus ja viikoittainen parittelu.

Annostasot

24. Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska sopivia tietoja ei ole vielä käytettävissä opastamaan annoksen valinnassa, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa (26). Tutkimuksessa on pyrittävä määrittämään suurin siedetty annos. Sillä tarkoitetaan suurinta annosta, jota siedetään ilman näyttöä tutkimusta rajoittavasta toksisuudesta tutkimuksen kestoon nähden (esimerkiksi annos, joka aiheuttaa poikkeavaa käyttäytymistä tai poikkeavia reaktioita, vähäistä painonlaskua tai verta muodostavan kudoksen sytotoksisuutta), mutta joka ei aiheuta kuolemaa eikä sellaista kipua, tuskaa tai kärsimystä, jonka vuoksi eläin olisi lopetettava inhimillisesti (27).

25. Suurin siedetty annos ei myöskään saa haitata parittelun onnistumista (21).

26. Testikemikaalit, joilla on tiettyjä biologisia vaikutuksia pieninä myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), ja kemikaalit, joissa esiintyy toksikokineettisten ominaisuuksien saturaatiota, voivat olla annoksen määrittämistä koskevien kriteerien osalta poikkeustapauksia, ja niitä on arvioitava tapauskohtaisesti.

27. Jotta saadaan annosvastetiedot, täydelliseen tutkimukseen on sisällyttävä negatiivinen kontrolliryhmä ja vähintään kolme annostasoa, jotka yleensä erotetaan kertoimella 2 mutta enintään kertoimella 4. Jos testikemikaali ei aiheuta toksisuutta annoksenmääritystutkimuksessa tai olemassa olevien tietojen perusteella, suurin kerta-annos pitäisi olla 2 000 mg/painokilo. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuutta, suurimman siedetyn annoksen pitäisi olla

▼M8

suurin annettava annos, ja käytettävien annostasojen olisi mieluiten katettava vaihteluväli maksimista annokseen, joka aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan toksisuutta. Myrkyttömien kemikaalien yhteydessä vähintään 14 päivän mittaisen altistusjakson raja-annos on 1 000 mg painokiloa kohti päivässä. Jos altistusjakso on vähemmän kuin 14 päivää, raja-annos on 2 000 mg painokiloa kohti päivässä.

Antotapa

28. Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi altistusreitiksi voidaan perustellusti valita esimerkiksi ravinto tai juomavesi, ihonalainen, suonensisäinen tai topikaalinen reitti, altistus hengitysteitse tai oraalisesti (letkuruokinnalla) taikka implantaatio. Joka tapauksessa reitti on valittava siten, että voidaan varmistaa kohdekudosten riittävä altistus. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, koska sitä ei ole tarkoitettu ihmisen altistumisreitiksi, ja sitä tulisi käyttää vain erityisten tieteellisien perusteiden nojalla. Jos testikemikaali sekoitetaan ravintoon tai juomaveteen, varsinkin jos kyse on kerta-annoksesta, on huolehdittava siitä, että viive ravinnon ja veden saannin ja parittelun välillä on riittävä, jotta vaikutukset voidaan havaita (31 kohta). Se, kuinka paljon nestettä voidaan enintään antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona, määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Yleensä määrä saa olla enintään 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksena ovat vesiliuokset, joita käytettäessä enimmäismäärä voi olla 2 ml/100 g. Tätä suurempien määrien käyttö (jos eläinsuojelulainsäädäntö sen sallii) on perusteltava. Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta, jotta varmistetaan, että tilavuus on painoon nähden sama kaikilla annostasoilla.

Havainnot

29. Koe-eläimistä tulee tehdä yleisiä kliinisiä havaintoja ja niiden kliinisiä oireita tulee kirjata vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä, ja tässä on otettava huomioon, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava vähintään kahdesti vuorokaudessa annostelun aikana. Eläimet on punnittava tutkimuksen alussa ja vähintään kerran viikossa toistuvan annoksen tutkimuksissa, ja eläinten lopetuksen yhteydessä. Ravinnon kulutus olisi mitattava ainakin kerran viikossa. Jos testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutus on mitattava veden vaihdon yhteydessä tai vähintään kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta toksisuudesta, olisi lopetettava ennen tutkimusjakson päättymistä (27).

Kudosnäytteet ja niiden käsittely

30. Naaraat lopetetaan tiineyden toisella puoliskolla, hiiret tiineyspäivänä 13 ja rotat tiineyspäivänä 14 tai 15. Niiden kohdut tutkitaan dominoivien letaalivaikutusten osalta kiinnittyneiden alkioiden, elävien ja kuolleiden alkioiden ja keltarauhasten määrän selvittämiseksi.

31. Kohdunsarvet ja munasarjat avataan keltarauhasten laskemiseksi, ja sikiöt poistetaan, lasketaan ja punnitaan. Kohdusta on tutkittava huolellisesti myös mahdolliset elävien sikiöiden peittämät resorptiot, ja on varmistettava, että kaikki resorptiot lasketaan. Sikiökuolleisuus kirjataan. Myös hedelmöittyneiden naaraiden ja kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärä, ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat ja kiinnittymisen jälkeinen kuolleisuus

▼M8

(sekä varhain että myöhemmin tapahtuneet resorptiot) kirjataan. Lisäksi näkyvissä olevat sikiöt voidaan säilöä Bouinin fiksatiiviin vähintään kahden viikon ajaksi, jonka jälkeen ne tutkitaan selvien ulkoisten epämuodostumien varalta (28). Näin saadaan lisätietoa testiaineen vaikutuksista lisääntymiseen ja kehitykseen.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

32. Tulokset esitetään taulukossa, josta ilmenee paritelleiden urosten, tiineiden naaraiden sekä hedelmöittymättömien naaraiden lukumäärä. Kaikkien parittelujen tulokset sekä kunkin uroksen ja naaraan tunnistetiedot on esitettävä erikseen. Lisäksi on laskettava paritteluväli, altistettujen urosten annostaso sekä elävien kiinnittyneiden alkioiden ja kuolleiden alkioiden lukumäärä kunkin naaraan osalta.

33. Kiinnittymisen jälkeiset alkiokuolemat lasketaan määrittämällä kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden osuus kaikista kiinnittyneistä alkioista testiryhmässä ja vertaamalla sitä vastaavaan osuuteen kantaja-ainetta tai liuotinta saaneessa kontrolliryhmässä.

34. Ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat voidaan määrittää keltarauhasten ja kiinnittyneiden alkioiden määrän välisenä erotuksena tai kiinnittymisten keskimäärän vähenemisenä naarasta kohden kontrolliryhmän parittelutuloksiin verrattuna. Jos ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat on arvioitu, tämä on ilmoitettava.

35. Dominoiva letaalikerroin arvioidaan näin: (kiinnittymisen jälkeiset alkiokuolemat / kiinnittymisten kokonaismäärä naarasta kohti) × 100.

36. Tiedot toksisuudesta ja kliinisistä oireista (29 kohdan mukaisesti) on ilmoitettava.

Hyväksymisperusteet

37. Testin hyväksyttävyys määritetään seuraavilla kriteereillä:

— Samanaikainen negatiivinen kontrolli on aikaisempia negatiivisia kontrollitietoja koskevien julkaistujen normien ja laboratorion aiempien kontrollitietojen (jos niitä on saatavilla) mukainen (ks. 10 ja 18 kohta).

— Samanaikaiset positiiviset kontrollit aiheuttavat vasteita, jotka ovat aikaisempia positiivisia kontrollitietoja koskevien julkaistujen normien tai laboratorion aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan (jos saatavilla) mukaisia, ja niiden tuottama kasvu on tilastollisesti merkitsevä negatiiviseen kontrolliin verrattuna (17 ja 18 kohta).

— Asianmukainen määrä kiinnittymisiä ja annoksia on analysoitu (20 kohta).

— Suurimman annoksen valintaperusteet vastaavat 24 ja 27 kohdassa kuvattuja perusteita.

Tulosten arviointi ja tulkinta

38. Vähintään kolmea annosryhmää on analysoitava, jotta saadaan riittävästi tietoa annos-vastesuhdetta koskevaa analyysia varten.

▼M8

39. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, mikäli:

— ainakin yksi testiannoksista ilmentää tilastollisesti merkitsevää kasvua samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna

— kasvu riippuu annoksesta vähintään yksissä testiolosuhteissa (esimerkiksi viikon välein tapahtuva parittelu), kun sitä arvioidaan asianmukaisella testillä sekä

— mikä tahansa tuloksista on negatiivisten kontrollitietojen jakauman tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja), jos näitä tietoja on saatavilla.

Tällöin testikemikaalin katsotaan pystyvän aiheuttamaan dominoivia letaalimutaatioita koe-eläinten itusoluissa. Suosituksia sopivimmista tilastomenetelmistä on 44 kohdassa; muita suositeltuja tilastollisia lähestymistapoja on myös lähdekirjallisuudessa (20) (21) (22) (24) (29). Käytetyissä tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä on pidettävä eläintä.

40. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, mikäli:

— mikään testiannoksista ei aiheuta tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— annoksesta riippuvaista kasvua ei esiinny missään testiolosuhteissa ja

— kaikki tulokset ovat negatiivisten kontrollitietojen tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja) mukaisia, jos näitä tietoja on saatavilla.

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali pysty aiheuttamaan dominoivia letaalimutaatioita koe-eläinten itusoluissa.

41. Selvästi positiivista tai selvästi negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

42. Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea (esimerkiksi heikko tai rajatapaukseksi luokiteltava kasvu), tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvioinnissa ja/tai olemassa olevaan kokeelliseen tietoon perustuvissa lisätutkimuksissa, joissa esimerkiksi arvioidaan, onko positiivinen tulos negatiivisten kontrollitietojen tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen hyväksyttävän jakauman ulkopuolella (30).

43. Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Niitä pidetään tästä syystä epäselvinä tapauksina.

44. Käytetyissä tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä on pidettävä urospuolista eläintä. Vaikka on mahdollista, että lukumääräaineisto (esimerkiksi kiinnittyneiden alkioiden lukumäärä naarasta kohti) voi noudattaa Poissonin jakaumaa ja/tai osuudet (esimerkiksi kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden osuus) voivat noudattaa binomijakaumaa, tällaisissa tiedoissa voi kuitenkin usein olla ylihajontaa (31). Sen vuoksi tilastollisessa analyysissa tulisi ensin tehdä yli- tai alihajontatesti käyttämällä varianssitestejä, kuten Cochranin binomiaalisen vaihtelun testiä (32) tai ylihajontaa koskevaa Taronen C(α)-testiä (31) (33). Jos poikkeamaa binomijakaumasta ei havaita, osuuksien trendejä kaikilla annostasoilla voidaan testata käyttämällä Cochran-Armitagen trenditestiä (34). Parivertailuja kontrolliryhmään voidaan testata Fisherin

▼M8

tarkalla testillä (35). Samalla tavoin jos poikkeamaa Poissonin jakaumasta ei havaita, lukumäärien trendejä voidaan testata käyttämällä Poissonin regressiota (36). Parivertailuja kontrolliryhmään voidaan testata Poissonin mallin yhteydessä käyttämällä parittaisia kontrasteja (36). Jos merkittävää yli- tai alihajontaa havaitaan, suositellaan käytettävän parametrittomia menetelmiä (23) (31). Niitä ovat esimerkiksi järjestykseen perustuvat testit, kuten Jonckheere-Terpstran trenditesti (37) ja Mann-Whitneyn testit (38) parivertailuista kantaja-aine-/liuotinkontrolliryhmän kanssa sekä permutaatio-, uudelleenotanta- tai bootstraptestit trendi- ja parivertailuihin kontrolliryhmän kanssa (31) (39).

45. Positiivisesta dominoivien letaalivaikutusten testistä saadaan näyttöä testikemikaalin genotoksisuudesta testieläinlajin altistetun uroksen itusoluille.

46. Vasteen biologisen merkityksellisyyden arvioinnissa apua voi olla sen tarkastelemisesta, ovatko havaitut arvot aikaisemman kontrollivaihteluvälin sisällä vai sen ulkopuolella (40).

Testiraportti

47. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot.

Yhteenveto

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus soluviljelmän kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testikemikaalin valmistus:

— perustelut kantaja-aineen valinnalle

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiilisuus liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

▼**M8**

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulointien analyyttiset määritelmät (kuten stabiilius, homogeenisuus, nimellispitoisuudet), kun niitä käytetään.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— eläinten yksilöintimenetelmä

— lyhytkestoiset tutkimukset: kunkin urospuolisen eläimen paino testin alkaessa ja päättyessä yli viikon kestävät tutkimukset: yksilölliset painot tutkimuksen aikana ja ravinnon kulutus. Kunkin ryhmän painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta on ilmoitettava.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

— annosalueen määritystutkimuksen tulokset

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— antotavan valintaperusteet

— eläimille aiheutuneiden myrkyllisten vaikutusten mittaamista koskevat menetelmät, tarvittaessa myös histopatologiset tai hematologiset analyysit, ja tiedot siitä, kuinka usein eläimiä koskevat havainnot tehtiin ja eläimet punnittiin

— menettelyt, joilla varmistetaan, että testikemikaali kulkeutui kohdekudokseen tai verenkiertoon, jos saadaan negatiivisia tuloksia

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohdat häkkien virikkeellisestä ympäristöstä

— yksityiskohtaiset tiedot altistus- ja näytteenottoaikataulusta ja perustelut valinnoille

— kivunlievitysmenetelmät

— lopettamistapa

▼**M8**

— kudosten eristämis- ja säilömismenetelmät

— kaikkien mittaussarjojen ja reagenssien lähde ja eränumerot (tarvittaessa)

— dominoivien letaalivaikutusten laskentamenetelmät

— paritteluaikataulu

— parittelun toteamistapa

— eläimen lopetusajankohta

— dominoivien letaalivaikutusten pisteytysperusteet (keltarauhaset, kiinnittyneet alkiot, resorptiot ja ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat sekä elävät ja kuolleet kiinnittyneet alkiot).

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana sekä toksisuusoireet

— uroksen paino altistus- ja parittelujaksojen aikana

— paritelleiden naaraiden lukumäärä

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisen ja aikaisemman negatiivisen kontrollin tiedot, joihin sisältyvät vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonta

— samanaikaisen positiivisen kontrollin tiedot

— taulukoidut tiedo t jokaisesta naaraasta: keltarauhasten lukumäärä naarasta kohti kiinnittyneiden alkioiden lukumäärä naarasta kohti resorptioiden ja ennen kiinnittymistä tapahtuneiden alkiokuolemien lukumäärä naarasta kohti elävien kiinnittyneiden alkioiden lukumäärä naarasta kohti kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden lukumäärä naarasta kohti sikiöiden painot

— yhteenveto edellä kuvatuista tiedoista jokaiselta parittelujaksolta ja jokaisesta annoksesta sekä tiedot dominoivista letaalitaajuuksista

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et al.* (eds.) s. 235–334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group ”Dominant” lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173–185

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159–167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267–270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325–329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80–85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239–249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616–624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112–129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169–172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167–180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371–378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303–314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35–40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143–156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, s. 129–156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313–318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124–141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277–288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353–360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417–429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313–319.

(27) OECD (2000). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.) (1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). ”Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, Mutation. Res., 723:87–90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35–58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. Biometrics, 10: 417–451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585–590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. Teoksessa *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), s. 334–336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133–145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

▼**M8**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Kemikaali: Aine tai seos

Keltarauhanen (-rauhaset): Munasarjaan munasolun irtoamisen jälkeen munarakkulan tilalle muodostuva hormonia erittävä rakenne. Munasarjoissa olevien keltarauhasten määrä vastaa irronneiden munasolujen määrää.

Dominoiva letaalimutaatio: Itusolussa esiintyvä tai siihen hedelmöittymisen jälkeen kiinnittyvä mutaatio, joka aiheuttaa sikiö- ja alkiokuolemia.

Hedelmällisyysluku: Paritelleiden tiineiden naaraiden lukumäärä paritelleiden naaraiden lukumäärään nähden.

Parittelujakso: Altistettujen urosten altistuksen päättymisen ja parittelun välinen aika. Tätä jaksoa seuraamalla voidaan arvioida kemikaalien vaikutuksia erityyppisiin itusoluihin. Hiirten paritellessa viikoilla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ja 8 altistuksen päättymisen jälkeen havaittiin vaikutuksia spermassa, kondensoituneissa spermatideissä, pyöreätumaisissa spermatideissä, pakyteenivaiheen spermatideissä, varhaisvaiheen spermatosyyteissä, erilaistuneissa spermatogonioissa, erilaistuvissa spermatogonioissa ja kantasoluista muodostuvissa spermatogonioissa.

Ennen kiinnittymistä tapahtuneet alkiokuolemat: Kiinnittyneiden alkioiden määrän ja keltarauhasten määrän välinen erotus. Se voidaan arvioida myös vertailemalla kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärää yhtä naarasta kohti testi- ja kontrolliryhmissä.

Kiinnittymisen jälkeen tapahtuneet alkiokuolemat: Kuolleiden kiinnittyneiden alkioiden osuus kiinnittyneiden alkioiden kokonaismäärästä testiryhmässä verrattuna vastaavaan osuuteen kontrolliryhmässä.

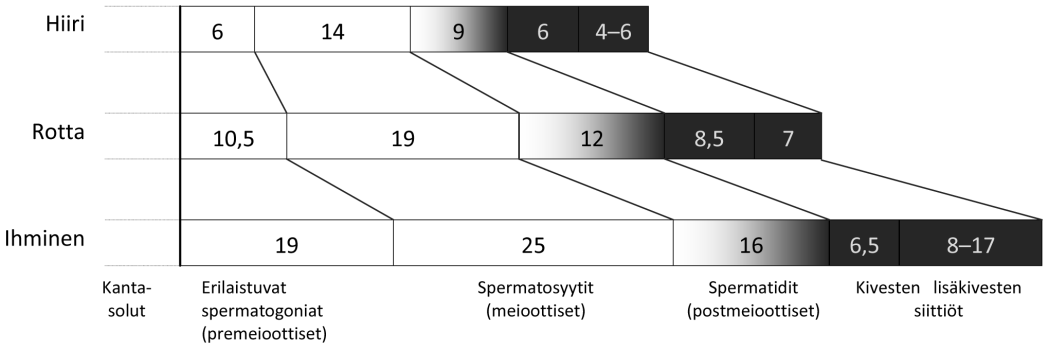
Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali

▼**M8**

Lisäys 2

SPERMATOGENEESIN AJOITUS NISÄKKÄILLÄ



Kuva 1: Vertailu hiirien, rottien ja ihmisten miespuolisten itusolujen kehityksen kestosta (päivinä). DNA:n korjausta ei tapahdu varjostuksella korostetuilla ajanjaksoilla.

Yllä on esitetty kaaviokuva hiiren, rotan ja ihmisen spermatogeneesistä (lähde: Adler, 1996). Erilaistumattomia spermatogonioita ovat yksittäiset A-spermatogoniat, parilliset A-spermatogoniat (Apr) ja ketjuttuneet (Aal) spermatogoniat (Hess ja de Franca, 2008). Varsinaisina kantasoluina pidetään yksittäisiä A-spermatogonioita. Jotta kantasoluihin kohdistuvia vaikutuksia voidaan arvioida, viimeisen testikemikaali-injektion ja parittelun välissä on oltava vähintään 49 päivää (hiirellä).

Viitteet

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169–172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Teoksessa: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1–15.

▼M8

B.23. NISÄKKÄIDEN SPERMATOGONIOIDEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 483 (2016). Testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi. Tämä muokattu versio testimenetelmästä perustuu useiden vuosien kokemukseen tästä testistä ja mahdollisuuteen liittää tai yhdistää tämä testi muihin toksisuus- tai genotoksisuustesteihin. Kun toksisuustestejä yhdistetään, niissä voidaan mahdollisesti käyttää tavallista vähemmän koe-eläimiä. Tämä testimenetelmä kuuluu geneettisen toksikologian testimenetelmiin. OECD on laatinut asiakirjan (1), joka sisältää yhteenvedon geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsauksen näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin.

2. Tämän nisäkkäiden spermatogonioilla tehtävän *in vivo* -kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa kemikaalit, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia nisäkkäiden spermatogoniaalisissa soluissa (2) (3) (4). Lisäksi tämä testi on erityisen relevantti genotoksisuuden arvioinnissa, koska vaikka lajien välillä voi olla vaihtelua, *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin liittyvät tekijät ovat aktiivisia ja voivat vaikuttaa vasteisiin. Tätä testimenetelmää ei ole suunniteltu mittaamaan numeerisia poikkeavuuksia; testiä ei käytetä siihen tavanomaisesti.

3. Tämä testi mittaa (sekä kromosomi- että kromatidityyppisiä) rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia jakautuvissa spermatogoniaalisissa itusoluissa, joten sen odotetaan voivan ennustaa itusolujen periytyvien mutaatioiden kehittymistä.

4. Keskeisten termien määritelmät esitetään liitteessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Tässä testissä käytetään yleensä jyrsijöitä, mutta muut lajit voivat olla joissain tapauksissa sopivia, jos niiden käyttö on tieteellisesti perusteltua. Jyrsijätestien sytogeneettiset vakiovalmisteet aiheuttavat mitoottisia (spermatogoniat) ja meioottisia (spermatosyytit) metafaaseja. Mitoottiset ja meioottiset metafaasit määritetään kromosomien morfologian perusteella (4). Tämä *in vivo* -sytogeneettinen testi paljastaa rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet spermatogonioiden mitooseissa. Tällä menetelmällä ei tutkita muita kohdesoluja.

6. Spermatogoniaalisten solujen kromatidityyppisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi on tutkittava ensimmäistä mitoottista solunjakautumista altistuksen jälkeen, ennen kuin nämä poikkeavuudet häviävät myöhemmissä solunjakautumisissa. Altistetuista spermatosyyteistä voidaan saada lisätietoja tekemällä meioottisia kromosomianalyysejä kromosomityyppisten rakenteellisten poikkeavuuksien toteamiseksi diakineesi-metafaasi I:ssä ja metafaasi II:ssa.

▼M8

7. Kiveksissä on yhtaikaa monia spermatogonioiden sukupolvia (5), ja näiden erilaisten itusolutyyppien herkkyys kemiallisten aineiden vaikutuksille voi vaihdella. Havaitut poikkeavuudet edustavat siis altistettujen spermatogoniaalisten solupopulaatioiden yhdistettyä vastetta. Suurin osa kivespreparaattien mitoottisista soluista ovat B-spermatogonioita, joiden solukierto on noin 26 tuntia (3).

8. Jos on näyttöä siitä, että testikemikaali tai sen metaboliitti ei (metaboliitit eivät) pääse kiveksiin, tätä testiä ei pidä käyttää.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

9. Eläimet altistetaan testikemikaalille soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esimerkiksi kolkisiinia tai Colcemidia®). Tämän jälkeen itusoluista valmistetaan kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevista soluista analysoidaan kromosomipoikkeavuudet.

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

10. Tämän testin pätevyys on varmistettava osoittamalla, että sillä voidaan tuottaa uudestaan odotuksenmukaiset tulokset spermatogonioiden rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien taajuuksista esimerkiksi taulukossa 1 lueteltuja positiivisia kontrolliaineita käyttäen (mukaan luettuina heikot vasteet) ja saada sellaisia negatiivisten kontrollien taajuuksia, jotka ovat julkaistussa kirjallisuudessa esitettyjen kontrollitietojen hyväksyttävyysalueen mukaisia (esimerkiksi (2) (3) (6) (7) (8) (9)(10)) tai laboratorion aikaisemman kontrollijakauman mukaisia, jos se on saatavilla.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Eläinlajin valinta

11. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Yleensä käytetään uroshiiriä, mutta myös muiden soveltuvien nisäkäslajien uroksia voidaan käyttää, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos tämä testi on tarkoitus tehdä yhdessä jonkin toisen testimenetelmän kanssa. Raportissa on esitettävä tieteelliset perustelut muiden lajien kuin jyrsijöiden käytölle.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

12. Jyrsijöiden kohdalla koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden olisi mieluiten oltava 50–60 prosenttia, sen olisi oltava ainakin 40 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Huoneessa täytyy käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa se, miten siihen voidaan sekoittaa sopiva määrä testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Jyrsijät on sijoitettava pienryhmiin (enintään viisi eläintä häkkiä kohti), ellei aggressiivista käyttäytymistä ole odotettavissa, mieluiten kiinteisiin lattiahäkkeihin, joissa on asianmukainen virikkeellinen ympäristö. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

▼M8

Eläinten valmistelu

13. Yleensä käytetään terveitä, nuoria ja täysikasvuisia uroseläimiä (8–12 viikon ikäiset käsittelyn alkaessa), jotka jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmiin. Eläimet merkitään yksilöllisesti inhimillisellä, mahdollisimman vähän invasiivisella toimenpiteellä (esimerkiksi rengastamalla, korvamerkillä, mikrosirulla tai biometrisellä tunnisteella, mutta ei korvia tai varpaita leikkaamalla), ja niitä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Ristikontaminaatiota positiivisella kontrollilla ja testikemikaalilla tulisi välttää. Tutkimuksen alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 %.

Annosten valmistelu

14. Kiinteät testattavat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testattavat kemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitysteiden kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

Testiolosuhteet - liuotin/kantaja-aine

15. Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttö saa aiheuttaa mahdollisia kemiallisia reaktioita testikemikaalien kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä yhteensopivista liuottimista/kantaja-aineista ovat vesi, fysiologinen suolaliuos, metyyliselluloosaliuos, natriumkarboksimetyyliselluloosan suolaliuos, oliiviöljy ja maissiöljy. Jos ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja siitä, ettei valittu epätyypillinen liuotin/kantaja-aine aiheuta rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia tai muita haitallisia vaikutuksia, on tehtävä alustava tutkimus, jolla voidaan määrittää liuotin-/kantaja-ainekontrollin hyväksyttävyys.

Positiiviset kontrollit

16. Samanaikaisia positiivisia kontrollieläimiä on käytettävä aina, ellei laboratorio ole osoittanut pätevyyttään testin tekemisessä ja ellei se ole käyttänyt testiä rutiininomaisesti viime aikoina (esimerkiksi viiden viime vuoden aikana). Jos samanaikaista positiivisen kontrollin ryhmää ei ole, kuhunkin kokeeseen on sisällytettävä pisteytyskontrollit (kiinteät ja värjätyt objektilasit). Nämä voidaan saada sisällyttämällä tutkimuksen pisteytykseen asianmukaiset vertailunäytteet, jotka on saatu erillisestä määräajoin (esimerkiksi 6–18 kuukauden välein) tehtävästä positiivisen kontrollin kokeesta ja joita säilytetään laboratoriossa, jossa koe tehdään, esimerkiksi pätevyyden testaamisen aikana ja säännöllisesti sen jälkeen, jos tarpeen.

17. Positiivisten kontrolliaineiden pitäisi luotettavasti tuottaa havaittavaa lisääntymistä rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuuksissa spontaanitasoihin verrattuna. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti laskijoille koodattujen näytteiden identiteettiä. Taulukossa 1 on esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista.

▼M8

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista

Aineet [CAS-numero] (viitenro)
Syklofosfamidi (monohydraatti) [CAS-nro 50-18-0 (CAS-nro 6055-19-2)] (9)
Sykloheksylamiini [CAS-nro 108-91-8] (7)
Mitomysiini C [CAS-nro 50-07-7] (6)
Monomeerinen akryyliamidi [CAS 79-06-1] (10)
Trietyleenimelamiini [CAS-nro 51-18-3] (8)

Negatiiviset kontrollit

18. Negatiivisia kontrollieläimiä, joille annetaan pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita käsitellään muuten samalla tavalla kuin testiryhmiä, on sisällytettävä kuhunkin näytteenottokertaan. Jos käytettävissä ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja, joissa osoitetaan, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta kromosomipoikkeavuuksia tai muita haitallisia vaikutuksia, kullakin näytteenottokerralla olisi käytettävä myös altistamattomia kontrollieläimiä, jotta kantaja-ainekontrollin hyväksyttävyys voidaan todeta.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä

19. Tutkimuksen alussa ryhmien koot pitäisi valita niin, että yhdessä ryhmässä on vähintään viisi urospuolista eläintä. Tätä ryhmäkohtaista eläinmäärää pidetään asianmukaisen tilastollisen voiman tuottamisen kannalta riittävänä (ts. jotta testissä voidaan yleensä havaita vähintään kromosomipoikkeavuuksien esiintymistaajuuden kaksinkertaistuminen, kun negatiivinen kontrollitaso on 1,0 tai suurempi ja kun todennäköisyys on 80 prosenttia ja merkitsevyystaso 0,05) (3) (11). Eläinten tyypillisen enimmäismäärän osalta voidaan todeta ohjeellisesti, että tutkimuksessa, jossa on kaksi näytteenottokertaa, kolme annosryhmää ja samanaikainen negatiivinen kontrolliryhmä sekä positiivinen kontrolliryhmä (kussakin ryhmässä on viisi eläintä), tarvitaan 45 eläintä.

Altistusohjelma

20. Testikemikaaleja annetaan yleensä kerran (ts. kerta-altistuksena); myös muita annosteluohjelmia voidaan käyttää, jos se on tieteellisesti perusteltua.

21. Suurinta annosta saavassa ryhmässä käytetään kahta näytteenottokertaa altistuksen jälkeen. Koska testikemikaali(e)n soluunottoon ja metaboloitumiseen kuluva aika ja sen vaikutus solukierron kinetiikkaan voi muuttaa kromosomipoikkeavuuksien optimaalista havaitsemisajankohtaa, on otettava yksi varhainen näyte 24 tunnin kuluttua ja toinen myöhempi näyte 48 tunnin kuluttua altistuksesta. Muiden annosten kuin suurimman annoksen osalta on noudatettava aikaisempaa näytteenottoaikaa eli 24:ää tuntia (joka on lyhyempi tai yhtä pitkä kuin B-spermatogonioiden solukiertoaika, jolloin ensimmäisten altistuksen jälkeisten metafaasien arvioimisen todennäköisyys on optimaalinen) altistuksen jälkeen, ellei jonkin toisen näytteenottoajan tiedetä olevan asianmukaisempi ja perustellumpi.

22. Myös muita näytteenottoaikoja voidaan käyttää. Varhaisemmat näytteenottoajat (esimerkiksi alle 24 tuntia) saattavat olla asianmukaisia esimerkiksi sellaisten kemikaalien yhteydessä, joilla voi olla S-vaiheesta riippumattomia vaikutuksia.

▼M8

23. Myös toistuvan annoksen altistusohjelmaa voidaan käyttää esimerkiksi sellaisen toista päätetapahtumaa koskevan testin yhteydessä, jossa käytetään 28 päivän annosteluohjelmaa (esimerkiksi testimenetelmä B.58). Tällöin tarvitaan kuitenkin lisää eläinryhmiä eri näytteenottoaikojen vuoksi. Tällaisen ohjelman asianmukaisuus on kuitenkin perusteltava tieteellisesti ja tapauskohtaisesti.

24. Ennen lopettamista eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos kemikaalia, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esimerkiksi Colcemidia® tai kolkisiinia). Elämistä otetaan näytteet sopivan ajan kuluttua tämän jälkeen. Hiirillä ja rotilla tämä väli on noin 3–5 tuntia.

Annostasot

25. Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska muista tutkimuksista ei ole saatavilla soveltuvia tietoja, jotka auttaisivat annoksen valinnassa, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää, annoksenmääritystutkimusta koskevien suositusten mukaisesti (12). Tässä tutkimuksessa pitäisi pyrkiä määrittämään suurin siedetty annos (MTD-arvo) eli annos, joka aiheuttaa lievästi toksisen vaikutuksen suhteessa tutkimusjakson kestoon (esimerkiksi epänormaalia käytöstä tai reagointia, vähäistä painonlaskua tai hematopoieettisen järjestelmän sytotoksisuutta), mutta ei kuolemaa tai merkkejä kivusta, kärsimyksestä tai stressistä, joka edellyttäisi eläinten lopettamista (13).

26. Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin toksisuuteen viittaavia muutoksia spermatogoniaalisissa soluissa (esimerkiksi spermatogonioiden mitoosien osuus ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin nähden pienenee). Tämä pieneneminen saa olla enintään 50 prosenttia.

27. Kemikaalit, joilla on tiettyjä biologisia vaikutuksia pieninä myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), ja kemikaalit, joissa esiintyy toksikokineettisten ominaisuuksien saturaatiota, voivat olla annoksen määrittämistä koskevien kriteerien osalta poikkeustapauksia, ja niitä on arvioitava tapauskohtaisesti.

28. Jotta saadaan annosvastetiedot, täydelliseen tutkimukseen on sisällyttävä negatiivinen kontrolliryhmä (18 kohta) ja vähintään kolme annostasoa, jotka yleensä erotetaan kertoimella 2 mutta enintään kertoimella 4. Jos testikemikaali ei aiheuta toksisuusvaikutusta annoksenmääritystutkimuksessa tai olemassa olevien tietojen perusteella, suurin annos kerta-annostelulle pitäisi olla 2 000 mg/painokilo. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuutta, suurimman siedetyn annoksen pitäisi olla suurin annettava annos, ja käytettävien annostasojen olisi mieluiten katettava vaihteluväli maksimista annokseen, joka aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan toksisuutta. Kun kohdekudoksessa (ts. kiveksissä) havaitaan toksisuutta kaikilla testatuilla annostasoilla, on suositeltavaa tehdä täydentävä tutkimus myrkyttömillä annoksilla. Tutkimukset, joiden tarkoituksena on kuvata täydellisesti määrällisiä annos-vastetietoja, voivat vaatia täydentäviä annosryhmiä. Nämä rajat voivat vaihdella tietyntyyppisten testikemikaalien osalta (esimerkiksi ihmisten lääkkeet), jotka kuuluvat erityisvaatimusten piiriin. Jos testikemikaali aiheuttaa toksisuutta, on valittava raja-annos ja kaksi pienempää annosta (edellä kuvatun mukaisesti). Vähintään 14 päivän mittaisen altistusjakson raja-annos on 1 000 mg painokiloa kohti päivässä. Jos altistusjakso on vähemmän kuin 14 päivää, raja-annos on 2 000 mg painokiloa kohti päivässä.

▼M8

Antotapa

29. Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi altistusreitiksi voidaan perustellusti valita esimerkiksi ravinto tai juomavesi, topikaalinen ihonalainen, suonensisäinen tai oraalinen (letkuruokinta) reitti, hengitystiet taikka implantaatio. Joka tapauksessa reitti on valittava siten, että voidaan varmistaa kohdekudosten asianmukainen altistuminen. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, ellei se ole tieteellisesti perusteltua, sillä se ei ole ihmisen altistumisen kannalta fysiologisesti merkittävä altistumisreitti. Jos testikemikaali sekoitetaan ravintoon tai juomaveteen, varsinkin jos kyse on yhdestä annoksesta, vaikutuksien havaitsemiseksi on huolehdittava siitä, että viive ravinnon ja veden kulutuksen ja näytteenoton välillä on riittävä (ks. 33 kohta). Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Yleensä määrä saa olla enintään 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksena ovat vesiliuokset, joita käytettäessä enimmäismäärä voi olla 2 ml/100 g. Tätä suurempien määrien käyttö (jos eläinsuojelulainsäädäntö sen sallii) on perusteltava. Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta, jotta varmistetaan, että tilavuus on painoon nähden sama kaikilla annostasoilla.

Havainnot

30. Koe-eläimistä tulee tehdä yleisiä kliinisiä havaintoja ja niiden kliinisiä oireita tulee kirjata vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä, ja tässä on otettava huomioon, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa. Eläimet on punnittava tutkimuksen alussa ja vähintään kerran viikossa toistuvan annoksen tutkimuksissa ja lopetettaessa. Vähintään viikon kestävissä tutkimuksissa ravinnonkulutuksen mittaus on tehtävä vähintään viikoittain. Jos testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutus on mitattava veden vaihdon yhteydessä tai vähintään kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta toksisuudesta, olisi lopetettava ennen tutkimusjakson päättymistä (13).

Kromosomipreparaattien valmistus

31. Heti eläinten lopettamisen jälkeen toisesta kiveksestä tai molemmista kiveksistä otetaan itusolususpensioita, jotka pannaan hypotoniseen liuokseen ja fiksoidaan vahvistettujen menettelyjen mukaisesti (esimerkiksi (2) (14) (15)). Tämän jälkeen solut levitetään objektilaseille ja värjätään (16) (17). Kaikki lasit on koodattava siten, ettei laskija tiedä niiden identiteettiä.

Analyysi

32. Jokaisesta eläimestä on laskettava vähintään 200 hyvin levinnyttä metafaasia (3) (11). Jos aikaisempien negatiivisten kontrollien taajuus on < 1 %, on laskettava yli 200 solua eläintä kohti tilastollisen voiman kasvattamiseksi (3). On käytettävä sellaisia värjäysmenetelmiä, joiden yhteydessä sentromeeri voidaan tunnistaa.

33. Kromosomi- ja kromatidityyppiset poikkeavuudet on kirjattava erikseen ja luokiteltava alatyypin mukaan (katkeamiset, vaihdokset). Määritettäessä, aiheuttaako kemikaali sellaisten solujen lisääntymistä, joissa on kromosomipoikkeavuuksia, on kirjattava aukot, mutta niitä ei tarvitse ottaa huomioon. Laboratoriossa käytettävillä menettelyillä on varmistettava, että kromosomipoikkeavuuksien analyysin tekevät hyvin koulutetut laskijat. Koska objektilasien valmistelu

▼M8

johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja siten kromosomien häviämiseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua $2n \pm 2$, jossa n on kyseisen lajin haploidinen kromosomiluku.

34. Vaikka testillä pyritään ensisijaisesti toteamaan rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet, on tärkeää rekisteröidä myös polyploidisten ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen esiintymistaajuudet, mikäli näitä esiintyy (ks. 44 kohta).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

35. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot on esitettävä taulukossa. Jokaisesta eläimestä on arvioitava rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien lukumäärä solua kohti. Alatyyppeihin luokitellut kromatidi- ja kromosomityyppiset poikkeavuudet (katkeamiset, vaihdokset) on lueteltava erikseen, ja niiden lukumäärät ja esiintymistaajuudet testi- ja kontrolliryhmissä on mainittava. Aukot kirjataan erikseen. Aukkojen esiintymistaajuus ilmoitetaan, mutta sitä ei yleensä sisällytetä rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuden analyysiin. Polyploidian ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen prosenttiosuus ilmoitetaan, jos näitä havaitaan.

36. Tiedot toksisuudesta ja kliinisistä oireista (30 kohdan mukaisesti) on ilmoitettava.

Hyväksymisperusteet

37. Testin hyväksyttävyys määritetään seuraavilla kriteereillä:

— Samanaikainen negatiivinen kontrolli on aikaisempia negatiivisia kontrollitietoja koskevien julkaistujen normien (joiden mukaan yleensä odotetaan, että > 0 ja $\leq 1{,}5$ prosentissa soluista on kromosomipoikkeavuuksia) ja laboratorion aiempien kontrollitietojen (jos niitä on saatavilla) mukainen (ks. 10 ja 18 kohta).

— Samanaikaiset positiiviset kontrollit aiheuttavat vasteita, jotka ovat aikaisempia positiivisia kontrollitietoja koskevien julkaistujen normien tai laboratorion aiempien positiivisten kontrollien tietokannan (jos saatavilla) mukaisia, ja niiden tuottama kasvu on tilastollisesti merkitsevä negatiiviseen kontrolliin verrattuna (ks. 17 ja 18 kohta).

— Soluja ja annoksia on analysoitu riittävät määrät (ks. 28 ja 32 kohta).

— Suurimman annoksen valintaperusteet vastaavat 25 ja 26 kohdassa kuvattuja perusteita.

38. Jos havaitaan sekä mitoosia että meioosia, spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin on määritettävä sytotoksisuuden mittana kaikista altistetuista eläimistä ja negatiivisista kontrolieläimistä yhteensä 100 jakautuvan solun näytteestä eläintä kohti. Jos tarkastellaan ainoastaan mitoosia, mitoosi-indeksi on määritettävä vähintään 1 000 solusta jokaista eläintä kohti.

Tulosten arviointi ja tulkinta

39. Vähintään kolmea annosryhmää on analysoitava, jotta saadaan riittävästi tietoa annos-vastesuhdetta koskevaa analyysia varten.

▼**M8**

40. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, mikäli:

— ainakin yksi testiannoksista ilmentää tilastollisesti merkitsevää kasvua samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna

— kasvu riippuu annoksesta ainakin yhdellä näytteenottokerralla sekä

— mikä tahansa tuloksista on aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja), jos näitä tietoja on saatavilla.

Tällöin testikemikaalin katsotaan pystyvän aiheuttamaan kromosomipoikkeavuuksia koe-eläinten spermatogoniaalisissa soluissa. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia myös sopivimmista tilastomenetelmistä (11) (18). Käytetyissä tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä on pidettävä eläintä.

41. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, mikäli:

— mikään testiannoksista ei aiheuta tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— annoksesta riippuvaista kasvua ei esiinny missään testiolosuhteissa sekä

— kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja) mukaisia, jos näitä tietoja on saatavilla.

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali pysty aiheuttamaan kromosomipoikkeavuuksia koe-eläinten spermatogoniaalisissa soluissa. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia myös sopivimmista tilastomenetelmistä (11) (18). Negatiivinen tulos ei sulje pois mahdollisuutta, että kemikaali saattaa aiheuttaa kromosomipoikkeavuuksia myöhemmissä kehitysvaiheissa, joita ei ole tutkittu, tai geenimutaatioita.

42. Selvästi positiivista tai selvästi negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

43. Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea (esimerkiksi heikko tai rajatapaukseksi luokiteltava kasvu), tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvioinnissa ja/tai olemassa olevaan kokeelliseen tietoon perustuvissa lisätutkimuksissa, joissa esimerkiksi arvioidaan, onko positiivinen tulos negatiivisten kontrollitietojen tai laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen hyväksyttävän jakauman ulkopuolella (19).

44. Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Niitä pidetään tästä syystä epäselvinä tapauksina.

45. Polyploidisten solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaalilla pystytään estämään mitoottisia prosesseja ja aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia (20). Endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että testikemikaali kykenee estämään solukierron etenemisen (21) (22), joka on erilainen numeerisia kromosomimuutoksia aiheuttava mekanismi kuin mitoottisten prosessien estäminen (ks. 2 kohta). Siksi polyploidiset solut ja endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävät solut on kirjattava erikseen.

▼**M8**

Testiraportti

46. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Yhteenveto.

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus soluviljelmän kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testikemikaalin valmistus:

— perustelut kantaja-aineen valinnalle

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulaatioiden analyyttiset määritykset (esimerkiksi stabiilius, homogeenisuus, nimellispitoisuudet), jos ne on tehty.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen käytölle

— eläinten määrä ja ikä

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— eläinten yksilöintimenetelmä

— lyhytkestoiset tutkimukset: kunkin eläimen paino testin alkaessa ja päättyessä yli viikon kestävät tutkimukset: yksilölliset painot tutkimuksen aikana ja ravinnon kulutus. Kunkin ryhmän painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta on ilmoitettava.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

▼**M8**

— mahdollisen raja-annostutkimuksen tulokset

— annostason valintaperusteet

— antoreitin valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— eläinten lopettamisajankohtien perustelut

— eläimille aiheutuneiden myrkyllisten vaikutusten mittaamista koskevat menetelmät, tarvittaessa myös histopatologiset tai hematologiset analyysit, ja tiedot siitä, kuinka usein eläimiä koskevat havainnot tehtiin ja eläimet punnittiin

— menettelyt, joilla varmistetaan, että testikemikaali kulkeutui kohdekudokseen tai verenkiertoon, jos saadaan negatiivisia tuloksia

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtaiset tiedot koe- ja näytteenottoaikataulusta ja perustelut valinnoille

— lopettamistapa

— kivunlievitysmenetelmä (jos sitä on käytetty)

— kudosten eristämismenetelmät

— metafaasin pysäyttämisessä käytetty kemikaali, sen pitoisuus ja käsittelyn kesto

— objektilasien valmistusmenetelmät

— kromosomipoikkeavuuksien laskentaperusteet

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti

— kriteerit, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana sekä toksisuusoireet

— ruumiin ja elinten painot lopetuksen yhteydessä (jos kyse on useammasta altistuksesta, ruumiinpaino punnitaan altistusohjelman aikana)

— toksisuuden merkit

— mitoosi-indeksi

— spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäisiin ja toisiin meioottisiin metafaaseihin tai muut todisteet kohdekudoksen altistumisesta

— kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen

— kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat

▼M8

— kromosomipoikkeavuuksia sisältäneiden solujen lukumäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät

— samanaikaisten negatiivisten kontrollien tiedot

— aikaisemmat negatiivisten kontrollien tiedot, vaihteluvälit, keskiarvot, keskihajonnat ja 95 prosentin luottamusväli (jos saatavilla) tai testitulosten hyväksyttävyyden arvioinnissa käytetyt julkaistut tiedot aikaisemmista negatiivisista kontrolleista

— samanaikaisen positiivisen kontrollin tiedot

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy, myös polyploidian ja/tai endoreduplikoituneiden solujen esiintymistaajuudet.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014–2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. Teoksessa: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington D.C., s. 275–306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313–318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167–189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Teoksessa: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, s. 1–15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368–379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. Teoksessa: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, s. 477–484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472–474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371–375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135–140.

▼**M8**

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313–319.

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207–209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291–294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289–294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, teoksessa: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommitte on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, teoksessa: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87–90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29–46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362–1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403–413.

▼M8

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Aneuploidia: Yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Sentromeeri: Kromosomin alue (alueet), johon (joihin) sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärkromosomien järjestäytynyt siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Kemikaali: Aine tai seos

Kromosomien diversiteetti: Kromosomien muotojen (esimerkiksi metasentrinen, akrosentrinen jne.) ja kokojen diversiteetti.

Kromatidipoikkeavuus: Rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: Rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Klastogeeni: Mikä tahansa kemikaali, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solupopulaatioissa tai organismeissa.

Aukko: Akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys ja johon liittyy minimaalinen kromatidien siirtymä.

Genotoksinen: Yleisnimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa katkeamisille, deleetioille, addukteille, nukleotidien muutoksille ja sidoksille, uudelleenjärjestäytymisille, mutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Mitoosi-indeksi (MI): Suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Mitoosi: Solutuman jakautuminen, joka jaetaan yleensä profaasiin, prometafaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin.

Mutageeninen: Aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa (-rakenteissa) tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Numeerinen poikkeavuus: Testissä käytetyille eläimille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: Haploidisen kromosomimäärän (*n*) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä (3*n*, 4*n* jne.).

Rakenteellinen poikkeavuus: Kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina, fragmentteina ja vaihdoksina.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali

▼M7

▼B

B.25. **HIIREN PERIYTYVÄ TRANSLOKAATIO**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄ

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Hiiren periytyvä translokaatiotesti tutkii nisäkkäiden sukusolujen rakenteellisia ja lukumääräisiä kromosomimuutoksia ensimmäisen polven jälkeläisistä. Havaittuja kromosomimuutoksia ovat vastavuoroiset translokaatiot sekä X-kromosomin häviämät naaraspuolisissa jälkeläisissä. Translokaatiokantajat ja XO-naaraat osoittavat hedelmällisyyden alenemista, jonka perusteella F_1-jälkeläiset valitaan sytogeneenisuustutkimuksiin. Eräät translokaatiotyypit aiheuttavat täydellisen steriliteetin (X-autosomi ja c-t-tyyppi). Translokaatioita tutkitaan sytogeneettisesti joko F_1-urosten tai F_1-naaraiden urospuolisten poikasten meioottisista diakineesi-metafaasi I -vaiheessa olevista soluista. XO-naaraat tunnistetaan sytogeneettisesti siitä, että niillä on ainoastaan 39 kromosomia luuydinmitoosissa.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Testattavat kemikaalit liuotetaan isotoniseen suolaliuokseen. Veteen liukenemattomat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin. Jos käytetään liuotinta annostelun helpottamiseksi, sillä ei saa olla testattavaan yhdisteeseen kohdistuvia vaikutuksia eikä myrkkyvaikutuksia.

Antotapa

Altistus suoritetaan tavallisesti suun kautta ruokintaletkulla tai vatsaontelonsisäisenä ruiskeena. Muitakin antotapoja voidaan käyttää.

Koe-eläimet

Testit suoritetaan hiirillä, koska niiden kasvatus ja solututkimukset eivät aiheuta ongelmia. Kantaa ei ole määrätty. Kannan keskimääräisen poikuekoon on kuitenkin oltava yli kahdeksan ja pysyä suhteellisen vakiona.

Koe-eläiminä käytetään terveitä sukukypsiä hiiriä.

▼B

Eläinten lukumäärä

Tarvittavien eläinten määrä riippuu spontaanin translokaation esiintymistiheydestä ja minimiannoksesta, joka tarvitaan positiivisen tuloksen aikaansaamiseksi.

Testi suoritetaan yleensä analysoimalla F_1-urospuolisia jälkeläisiä. Vähintään 500 F_1-sukupolven urospuolista jälkeläistä on tutkittava kutakin annosryhmää kohden. Mikäli myös F_1-sukupolven naaraspuoliset jälkeläiset kuuluvat tutkimuksen piiriin, tarvitaan 300 naarasta ja 300 urosta.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Käytettävissä on oltava riittävästi sekä meneillään olevista että aikaisemmista tutkimuksista saatuja kontrollituloksia. Mikäli testin suorittavassa laboratoriossa on käytettävissä äskettäin tehtyjen kokeiden positiivisia kontrollituloksia, näitä voidaan käyttää meneillään olevan kokeen positiivisen kontrollin asemesta.

Annostasot

Tutkimuksessa käytetään yhtä annostasoa. Se on yleensä korkein annos, joka aiheuttaa pienimmät havaittavissa olevat myrkkyvaikutukset, mutta ei vaikuta lisääntymiskäyttäytymiseen eikä eloonjäämiseen. Annos/vastesuhteen määrittämiseksi tarvitaan lisäksi kaksi alempaa annostasoa. Myrkyttömiä kemikaaleja testattaessa on käytettävä mahdollisimman suurta annosta.

Testin suorittaminen

Annostelu ja pariuttaminen

Käytettävissä on kaksi annostustapaa. Testattava aine annetaan yleensä kerta-annoksena. Testattavaa ainetta voidaan myös antaa viikon jokaisena päivänä 35 päivän aikana. Annostelutapa määrää altistusta seuraavien pariuttamisten määrän. On tärkeää, että kaikista sukusoluasteista saadaan näyte. Pariuttamisajan lopussa naaraat siirretään yksittäishäkkeihin. Kun naaraat synnyttävät, synnytyspäivä, poikueen koko ja jälkeläisten sukupuoli kirjataan. Kaikki urospuoliset jälkeläiset vieroitetaan ja naaraspuoliset lopetetaan, elleivät ne kuulu tutkimuksen piiriin.

Translokaation heterotsygoottisuustesti

Jompaakumpaa jäljempänä esitetyistä menetelmistä voidaan käyttää:

— F_1-jälkeläisten hedelmällisyystutkimus ja sen jälkeen translokaatiokantajien varmistus sytogeneettisen analyysin avulla.

— Kaikkien F_1-urospuolisten jälkeläisten sytogeneettinen analyysi ilman edeltävää hedelmällisyystutkimusta.

a) Hedelmällisyystutkimus:

F_1-eläimen alentunut hedelmällisyys voidaan määrittää tutkimalla poikueiden kokoa ja/tai analysoimalla naaraiden kohdun sisältö.

Käytetyn hiirikannan normaalin ja alentuneen hedelmällisyyden arviointikriteerit on määritettävä.

▼B

Poikueen koon tutkiminen: testattavat F_1-urokset pannaan yksittäishäkkeihin samasta testistä tai samasta yhdyskunnasta peräisin olevien naaraiden kanssa. Häkit tutkitaan päivittäin 18 päivän kuluttua pariutumisesta alkaen. Synnytyksen tapahduttua poikueen koko ja F_2-jälkeläisten sukupuoli kirjataan ja poikueet hävitetään. Kun tutkitaan naaraspuolisia F_1-jälkeläisiä, pienten poikueiden F_2-jälkeläiset säilytetään jatkotutkimuksia varten. Naaraspuoliset translokaatiokantajat varmistetaan tekemällä sytogeneettinen translokaatioanalyysi jostakin niiden urospuolisesta jälkeläisestä. XO-naaraat tunnistetaan siitä, että niiden jälkeläisten sukupuolijakautuma 1:1 muuttuu suhteeksi 1:2 uroksia/naaraita. Sarjatutkimuksissa normaalien F_1-eläimien lisätutkimuksia ei suoriteta, jos ensimmäinen F_2-poikue on ennalta määritetyn normaalipoikueen kokoinen tai sitä suurempi. Muussa tapauksessa tutkitaan toinen tai kolmas F_2-poikue.

Niille F_1-eläimille, joita ei voida pitää normaaleina kolmen F_2-poikueen tutkimisen perusteella, suoritetaan lisätutkimuksia joko analysoimalla emojen kohdun sisältö tai tekemällä niistä suoraan sytogeneettinen analyysi.

Kohdun sisällön tutkiminen: translokaatiokantajien poikueiden pieneminen johtuu sikiökuolemista, joten kohdun seinämään kiinnittyneiden kuolleiden munasolujen suuri määrä viittaa tutkittavana olevassa eläimessä tapahtuneeseen translokaatioon. Kukin testattava F_1-uros pariutetaan kahden tai kolmen naaraan kanssa. Hedelmöitys varmistetaan joka aamu tutkimalla, onko naaraille kehittynyt emätintulppa. Naaraat lopetetaan 14–16 päivän kuluttua ja kohdussa olevien elävien ja kuolleiden alkioiden määrä kirjataan.

b) Sytogeneettinen analyysi:

Kivekset preparoidaan ilmakuivatusmenetelmää käyttäen. Translokaatiokantajat tunnistetaan primaarispermatogyyttien ensimmäisen diakineesimetafaasin multivalenttien rakennemuotojen perusteella. Vähintään kahdessa solussa esiintyvä multivalentti yhdistyminen on riittävä osoitus siitä, että tutkittava eläin on translokaatiokantaja.

Ellei siitosvalintaa ole tehty, kaikki F_1-urokset tutkitaan sytogeneettisesti. Vähintään 25 ensimmäisen diakineesimetafaasin solua on mikroskopoitava urosta kohden. Mitoosin metafaasit spermatogonioista tai luuytimestä on tutkittava F_1-uroksilta, joilla on pienet kivekset ja diakineesia edeltävä meioosin jakautumisvaihe F_1-naarailta, joiden epäillään olevan XO-naaraita. Epätavallisen pitkän ja/tai lyhyen kromosomin esiintyminen 10 solussa osoittaa steriiliä translokaatiota yksittäisessä uroksessa (c-tyyppi). Eräät urosten steriliteettiä aiheuttavat X-autosomi-translokaatiot voidaan todeta ainoastaan mitoottisten kromosomien raita-analyysin perusteella. Kun kaikissa 10 mitoosissa esiintyy 39 kromosomia, tämä osoittaa, että kysymyksessä on XO-naaras.

2. **TULOKSET**

Tulokset esitetään taulukkomuodossa.

Parentaalisukupolven poikueiden keskikoko ja sukupuolijakautuma syntymis- ja vieroitusajankohtana ilmoitetaan jokaista pariutumisjaksoa kohden.

▼B

F_1-eläinten hedelmällisyystutkimusten osalta ilmoitetaan kaikkien normaalien pariutumisten tuottamien poikueiden keskikoko ja F_1-translokaatiokantajien kunkin poikueen koko. Kohdun sisällön analyyseistä ilmoitetaan normaalien pariutumisten tuottamat elävät ja kuolleet kohdun seinämään kiinnittyneet munasolut ja F_1-translokaatiokantajien jokaisen pariutumisen tuottamat elävät ja kuolleet kohdun seinämään kiinnittyneet munasolut.

Ensimmäisen diakineesimetafaasin sytogeneettisistä analyyseistä ilmoitetaan multivalenttien raken-nemuutostyyppien määrät ja kokonaissolumäärä kutakin translokaatiokantajaa kohden.

Steriilien F_1-yksilöiden osalta ilmoitetaan pariutumisien kokonaismäärä ja pariuttamisajan kesto. Ilmoitetaan kivesten paino ja sytogeneettisen analyysin tulokset.

XO-naaraiden osalta ilmoitetaan poikueiden keskikoko, F_2-jälkeläisten sukupuolijakautuma sekä sytogeneettisen analyysin tulokset.

Jos mahdolliset F_1-translokaatiokantajat valittiin ennakolta hedelmällisyystutkimusten perusteella, taulukosta on ilmettävä, kuinka moni näistä varmistui translokaatioheterotsygootiksi.

Negatiiviset kontrollitulokset ja positiivisten kontrollitestien tulokset ilmoitetaan.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— hiirikanta, eläinten ikä, altistettujen eläinten paino,

— parentaalieläinten lukumäärä sukupuolta kohden koe- ja kontrolliryhmissä,

— koeolosuhteet, tarkka kuvaus altistuksesta, annostasot, liuottimet, pariutumisaikataulu,

— poikasten lukumäärä ja sukupuoli naarasta kohden, translokaatioanalyysiä varten kasvatettujen poikasten lukumäärä ja sukupuoli,

— translokaatioanalyysin ajankohta ja perusteet,

— translokaatiokantajien lukumäärä ja tarkka selostus translokaatiokantajista, risteyttämisestä ja kohdun sisällöstä soveltuvin osin,

— sytogeneettiset menettelytavat sekä selostus mikroskooppisesta analyysistä mieluimmin kuvien kera,

— tilastollinen arviointi,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

▼B

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.26. SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ

1. MENETELMÄ

Tämä subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 408 (1998).

1.1 JOHDANTO

Määritettäessä ja arvioitaessa kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia voidaan subkrooninen toistetuilla annoksilla aiheutettu suun kautta vaikuttava myrkyllisyys määrittää sen jälkeen, kun alustavia myrkyllisyyttä koskevia tietoja on saatu välittömän myrkyllisyyden testistä tai toistetuilla annoksilla suoritetusta 28 vuorokauden myrkvllisyystestistä. 90 vuorokauden tutkimuksesta saadaan tietoja terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta pitkähkön ajanjakson aikana, myös vieroittamisen jälkeen eläimen kehittyessä ja kasvaessa täysikasvuiseksi. Tutkimuksessa saadaan tietoa tärkeimmistä myrkyllisyysvaikutuksista, siinä käyvät ilmi kohde-elimet ja aineen mahdollinen kertyminen ja siinä voidaan saada arvio haitattomista altistustasoista (NO-AEL), joita voidaan käyttää valittaessa annoksia pitkäaikaisten vaikutusten tutkimiseen sekä turvallisuuskriteerien asettamiseen ihmisten altistukselle.

Menetelmässä korostetaan neurologisia loppupisteitä, ja siinä saadaan tietoa immunologisista ja lisääntymisfysiologisista vaikutuksista. Menetelmässä korostetaan myös sitä, että eläimistä on tehtävä huolellisesti kliinisiä havaintoja, jotta saadaan mahdollisimman paljon tietoa. Tämän tutkimuksen avulla pitäisi olla mahdollista tunnistaa kemikaaleja, joilla voi olla perusteellisempia tutkimuksia vaativia myrkyllisiä vaikutuksia hermostoon, immuunijärjestelmään ja lisääntymiselimiin.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Annos: annetun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painoyksikköinä (g, mg) tai testiaineen painona koe-eläi-men painoyksikköä kohti (esim. mg/kg) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina (ppm).

Annostelu: yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

NOAEL: lyhennys määritelmälle ”no observed adverse effect level” eli korkein annostaso, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan suun kautta päivittäin asteittain suurenevina annoksina useille koe-eläinryhmil!e niin, että yhtä annostasoa annetaan ryhmää kohti 90 vuorokauden ajan. Tänä aikana eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkkyvaikutusten havaitsemiseksi. Testin kuluessa kuolleille tai tapetuille eläimille tehdään ruumiinavaus, ja testin päättyessä myös vielä elossa olevat eläimet tapetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

▼B

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Eläinten valmistelu**

Testissä olisi käytettävä terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Eläimet jaetaan satunnaistetusti kontrolli- ja käsittelyryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero.

1.4.2 **Annosten valmistelu**

Testiainetta annetaan letkuruokinnalla tai ravinnon tai juomaveden mukana. Menetelmä riippuu tutkimuksen tarkoituksesta ja testiaineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista.

Tarvittaessa testiaine liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esim. maissiöljyyn) tehtävää liuosta tai emulsiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos liuotin on muu kuin vesi, sen myrkkyominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiilisuus annosteluolosuhteissa olisi määritettävä.

1.4.3 **Testiolosuhteet**

1.4.3.1 *Koe-eläimet*

Rotta on suositeltava koe-eläin, vaikka muita jyrsijöitä, kuten hiirtä, voidaan myös käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa ja nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Annostelu on aloitettava mahdollisimman pian vieroittamisen jälkeen ja joka tapauksessa ennen kuin eläimet ovat yhdeksän viikon ikäisiä. Tutkimuksen alkaessa eläinten painot saavat erota toisistaan mahdollisimman vähän, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta. Jos tutkimuksen on tarkoitus olla alustava tutkimus pitkäaikaiselle myrkyilisyystutkimukselle, molemmissa tutkimuksissa olisi käytettävä samaa kantaa ja samalta toimittajalta hankittuja eläimiä.

1.4.3.2 *Määrä ja sukupuoli*

Kullakin annostasolla olisi käytettävä vähintään 20:tä eläintä (10 naarasta ja 10 koirasta). Jos eläimiä tapetaan kokeen aikana, määrän on oltava saman verran suurempi kuin ennen tutkimuksen päättymistä tapettavien eläinten määrä. Kemikaalista tai sitä läheisesti muistuttavasta aineesta saatavilla olevien aiempien tietojen perusteella olisi harkittava kymmenen eläimen (viisi kumpaakin sukupuolta) lisäryhmän sisällyttämistä kontrolliryhmään ja suurimman annoksen ryhmään sitä varten, että niitä havainnoitaisiin käsittelyjakson jälkeen mahdollisten myrkkyvaikutusten palautumisen tai jatkumisen havaitsemiseksi. Tämä käsittelyn jälkeinen aika olisi asetettava havaittujen vaikutusten mukaan.

▼B

1.4.3.3 *Annostasot*

Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja testin kanssa samaan aikaan on tehtävä kontrolli paitsi jos tehdään raja-arvotesti (ks. 1.4.3.4). Annostasot voidaan asettaa toistetuilla annoksilla tehdyn testin tai raja-arvotestin tulosten perusteella, ja kaikki mahdolliset testiaineesta tai samanlaisista aineista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon. Mikäli testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso olisi valittava siten, että se on myrkyllinen, mutta ei johda kuolemaan eikä aiheuta suurta kärsimystä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla. Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin n. 6–10-ker-taisia).

Kontrolliryhmän on oltava käsittelemätön ryhmä tai kantaja-ainetta saava ryhmä, jos testiaineen antamiseen käytetään kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta testiainetta. Jos käytetään kantaja-ainetta, kontrolliryhmälle on annettava testiainetta suurimmassa käytetyssä kantaja-aineen tilavuudessa. Jos testiaine annetaan ravinnon mukana ja siitä aiheutuu ravinnonoton vähenemistä, voi normaaliravintoa saava kontrolliryhmä olla hyödyllinen, jotta erotettaisiin maittavuudesta aiheutunut ravinnonoton väheneminen sellaisesta, joka aiheutuu testimallin toksikologisista muutoksista.

Seuraavat mahdollisen kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, aineenvaihduntaan tai testiaineen pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkkyominaisuuksia; vaikutukset ravinnon tai veden nauttimiseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen.

1.4.3.4 *Raja-annostesti*

Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) / vrk ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Antotapa**

Eläimille annetaan testiainetta päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 90 vuorokauden ajan. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä, esim. testiainetta annetaan viitenä päivänä viikossa, se on perusteltava. Jos testiaine annetaan letkuruokinnalla, se on annettava yhtenä annoksena mahaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus riippuu koe-eläimen koosta. Tilavuus ei saisi olla suurempi kuin 1 ml/100 g painoa. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

▼B

Kun aine annetaan ravinnon tai juomaveden kanssa, on tärkeää varmistaa, ettei testiainemäärä häiritse normaalia ravitsemusta tai vesitasetta. Kun testiaine annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa. Valittu vaihtoehto on mainittava. Kun aine annetaan letkulla, annos olisi annettava joka päivä suunnilleen samaan aikaan, ja sitä olisi säädettävä tarvittaessa, jotta annostaso voitaisiin pitää vakiona suhteutettuna eläimen painoon. Kun 90 vuorokauden testin on tarkoitus olla alustava testi ennen pitkäaikaisen myrkyllisyystestin suorittamista, olisi molemmissa testeissä käytettävä samanlaista ruokavaliota.

1.5.2 **Havainnot**

Havainnointiajan olisi oltava vähintään 90 vuorokautta. Pitkäaikaiseen havainnointiin tarkoitetun ryhmän eläimiä olisi pidettävä sopiva aika ilman käsittelyä, jotta voitaisiin osoittaa myrkkyvaikutusten pysyvyys tai eläinten toipuminen niistä.

Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan kellonaikaan (samoihin kellonaikoihin). Tässä olisi otettava huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten kliininen tila on kirjattava. Kaikki eläimet tarkastetaan sairastavuuden ja kuolleisuuden havaitsemiseksi vähintään kahdesti päivässä, tavallisesti aamulla ja illalla.

Kaikista eläimistä olisi tehtävä yksityiskohtaiset kliiniset havainnot vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilaan) ja kerran viikossa sen jälkeen. Havainnointi olisi tehtävä niin, että eläin on häkin ulkopuolella, mieluiten vakioalueella ja suunnilleen samaan vuorokaudenaikaan. Havainnot olisi kirjattava huolellisesti, ja mieluiten olisi käytettävä testilaboratorion nimenomaisesti määrittelemää pisteytysmenctelmää. Olisi pyrittävä siihen, että havainnointiolosuhteissa olisi mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja olisivat mm. muutokset nahassa, turkissa, silmissä ja limakalvoissa, eritykset ja eritteet, autonominen aktiviteetti (esim. kyynelet, karvojen jäykistyminen, silmäterän koko, epätavallinen hengitys). Muutokset käynnissä, asennossa ja reagoimisessa käsittelyyn sekä kouristusliikkeet ja jäykkyys, kaavamaiset liikkeet (esim. liioiteltu siistiminen, toistuva ympyrää kulkeminen) tai omituinen käyttäytyminen (esim. itseään vahingoittaminen, takaperin kävely) olisi myös kirjattava (1).

Silmät olisi tutkittava oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testiaineen antamista ja testin lopussa mieluiten kaikilta koe-eläimiltä ja ainakin suuren annoksen ryhmään ja kontrolliryhmään kuuluvilta. Jos silmissä havaitaan muutoksia, olisi tutkittava kaikki eläimet.

Altistusajanjakson loppua kohti, mutta ei aikaisemmin kuin viikolla 11 olisi tutkittava aistien reagointi erilaisiin ärsykkeisiin (1) (esim. kuulo-, näkö- ja proprioseptiiviset ärsykkeet) (2), (3), (4), tarttumisotteen voimakkuus (5) ja motorinen aktiivisuus (6). Lisätietoja käytettävistä menetelmistä annetaan vastaavissa viitteissä. Myös muita menetelmiä saa käyttää.

Tutkimuksen loppupuolella tehtäviä toiminnallisia havaintoja ei tarvitse suorittaa, jos muista tutkimuksista on saatavilla toiminnallisia havaintoja koskevia tietoja ja päivittäisissä kliinisissä havainnoissa ei ole tullut ilmi toiminnallisia vajavaisuuksia.

▼B

Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei tarvitse myöskään tehdä ryhmille, joissa havaitaan muita myrkkyvaikutuksia siinä määrin, että ne haittaisivat merkittävästi toiminnallista testiä.

1.5.2.1 *Eläimen paino ja ravinnon ja/tai veden nauttiminen*

Kaikki eläimet olisi punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnonotto olisi mitattava vähintään viikoittain. Jos testiaine annetaan juomaveden mukana, veden nauttiminen olisi myös mitattava vähintään viikoittain. Veden nauttimisen mittaamista voidaan harkita myös sellaisissa ruoka- tai letkuruokintatutkimuksissa, joiden aikana juomisessa voi esiintyä muutoksia.

1.5.2.2 *Hematologia ja kliininen biokemia*

Verinäytteet olisi otettava nimetystä paikasta ja säilytettävä tarvittaessa asianmukaisissa olosuhteissa. Testiajanjakson lopussa näytteet otetaan juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä.

Verestä olisi tehtävä testiajanjakson lopussa ja aina, kun on otettu verinäytteitä, seuraavat määritykset: hematokriitti, hemoglobiinikonsentraatio, punasolujen määrä, valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, verihiutaleiden määrä ja veren hyytymisaika tai hyytymiskyky.

Kliinisen biokemian määritykset, joilla tutkitaan tärkeimpiä myrkkyvaikutuksia kudoksissa ja erityisesti munuaisissa ja maksassa, olisi tehtävä verinäytteistä, jotka on otettu kustakin eläimestä juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja). Samoin kuin hematologisia tutkimuksia varten myös kliinisen biokemian testejä varten voidaan näytteitä ottaa kokeen kestäessäkin. Suositellaan, että eläimet paastoaisivat yli yön ennen verinäytteiden ottoa ([1]). Plasmasta tai seerumista olisi määritettävä natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, veren ureatyppi, kreatiniini, kokonaisvalkuainen ja albumiini sekä enemmän kuin kaksi entsyymiä, jotka osoittavat maksasoluvaikutuksia {kuten alaniini-aminotransferaasi, asparagiinihappoaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gamma-glutamiinihappotranspeptidaasi ja sorbitolidehydrogenaasi). Muitakin (maksan tai muiden elimien) entsyymejä ja sappihapot, jotka voivat antaa hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa, voidaan määrittää.

Seuraavat virtsamääritykset voidaan tehdä valinnaisesti tutkimuksen viimeisen viikon aikana (tällöin on mitattava virtsan keruuaika): ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH, valkuainen, glukoosi ja veri ja/ tai verisolut.

Lisäksi olisi harkittava yleistä kudosvauriota osoittavien seerumissa esiintyvien merkkiaineiden määritystä. Muita määrityksiä, jotka olisi tehtävä, jos testiaineen tunnetut ominaisuudet saattavat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan kyseisiin määrityksiin liittyvään aineenvaihduntaan, ovat kalsium, fosfori, paasto-triglyseridit, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliinicsteraasi. Tarvittavat määritykset olisi yksilöitävä tiettyihin luokkiin kuuluville kemikaaleille tai tapauskohtaisesti.

([1]) Monia seerumista ja plasmasta tehtäviä määrityksiä, esimerkiksi glukoosia varten olisi paasto yön yli suositeltava. Tärkeimmät syyt tähän ovat se, että ilman paastoa näytteissä olisi luonnollisesti paljon enemmän vaihtelua, mikä saattaisi peittää vähäisempiä vaikutuksia ja vaikeuttaa tulkintaa. Toisaalta paastoaminen yli yön saattaa häiritä eläinten yleistä aineenvaihduntaa ja myös päivittäistä altistamista testiaineelle erityisesti ruokintatutkimuksissa. Jos eläimet paastoavat yli yön, kliinisen biokemian määritykset olisi tehtävä sen jälkeen, kun on tehty toiminnalliset havainnot.

▼B

Kaiken kaikkiaan lähestymistavan on oltava joustava. Se riippuu eläinlajista ja aineen havaituista ja/tai odotetuista vaikutuksista.

Jos aiemmat tiedot ovat puutteelliset, olisi harkittava, täytyykö hematologisia ja kliinisen biokemian määrityksiä tehdä ennen annosten antamisen aloittamista. Yleensä ei suositella, että tällaisia tietoja tuotettaisiin ennen käsittelyä (7).

1.5.2.3 *Ruumiinavaustutkimukset*

Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja) maksa, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, kohtu, munasarjat, kateenkorva, perna, aivot ja sydän olisi puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne olisi punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi.

Seuraavat kudokset olisi säilöttävä sellaiseen kiinnitysväliaineeseen, joka sopii parhaiten kyseiselle kudostyypille ja aiottuun histopatologiseen tutkimukseen: kaikki suuret leesiot, aivot (edustavat alueet, mukaan luettuina iso-aivot, pikkuaivot ja ydin/aivosilta), selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka), aivolisäke, kilpirauhanen, lisäkilpirauhanen, kateenkorva, ruokatorvi, sylkirauhaset, maha, ohut- ja paksusuoli (mukaan lukien Peyerin imukerässikermät), maksa, haima, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, rintakehä ja keuhkot (säilötään puhaltamalla täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla sitten siihen), aortta, sukurauhaset, kohtu, lisäsukupuolirauhaset, naaraan rintarauhanen, eturauhanen, virtsarakko, sappirakko (hiiri), imusolmukkeet (mieluiten yksi imusolmuke, joka kattaa antotien ja toinen, joka on kaukana antotiestä ja kattaa systeemiset vaikutukset), ääreishermo (lonkkahermo tai säärihermo), mieluiten lähellä kyseessä olevaa lihasta, näyte luuytimestä (ja/tai tuore luuydinnestenäyte}, nahkaa, silmät (jos oftalmologisessa tutkimuksessa havaittiin muutoksia). Kliiniset ja muut löydökset voivat antaa aihetta muiden kudosten tutkimiseen. Myös muut elimet, joihin testiaineen oletetaan vaikuttavan ennestään tunnettujen ominaisuuksien perusteella, olisi säilöttävä.

1.5.2.4 *Histopatologia*

Täydellinen histopatologinen tutkimus olisi tehtävä kontrolliryhmän ja suuren annoksen ryhmän kaikkien eläinten säilötyistä elimistä ja kudoksista. Nämä tutkimukset on tehtävä myös muiden annosryhmien eläimille, jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia.

Kaikki suuret leesiot olisi tutkittava.

Jos tutkimuksessa on mukana testiryhmä, jolle testiä on jatkettu pitempään sen jälkeen, kun testiaineen antaminen lopetettiin, histopatologiset tutkimukset on tehtävä niille kudoksille ja elimille, joissa on näkynyt muutoksia käsitellyissä ryhmissä.

▼B

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Tutkimuksessa on ilmoitettava yksilökohtaiset tulokset. Tulokset on lisäksi esitettävä taulukoituina, ja niistä on käytävä ilmi seuraavat tiedot: kuhunkin ryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa: testin aikana kuolleena löydettyjen tai inhimillisistä syistä tapettujen eläinten lukumäärä ja kuoleman tai tappamisen ajankohta: niiden eläinten lukumäärä, joissa näkyy myrkkyvaikutuksia; havaittujen myrkkyvaikutusten kuvaus, mukaan luettuna myrkytysoireiden alku, kesto ja vakavuus; niiden eläinten lukumäärä, joissa havaitaan leesioita: leesioiden tyyppi ja kunkin tyypin leesioista kärsivien eläinten prosenttiosuus.

Kun on numeerisia tuloksia, ne on arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastomenetelmällä. Tilastomenetelmät ja analysoitavat määritystulokset on valittava tutkimusta suunniteltaessa.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine:**

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikokemialliset ominaisuudet,

— tunnistetiedot,

— kantaja-aine (tarvittaessa): jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

2.2.2 **Koe-eläinlajit:**

— käytetty eläinlaji ja kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— toimittaja, häkit, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

2.2.3 **Koeolosuhteet:**

— annostasojen valintaperusteet,

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, pitoisuus, stabiilisuus ja tasalaatuisuus valmisteessa.

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta,

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

2.2.4 **Tulokset:**

— eläimen paino ja painon muutokset,

— ravinnon nauttiminen ja veden nauttiminen tarvittaessa,

— myrkyllisyysvaste sukupuolittain ja annostasoittain, mukaan lukien myrkyllisyysvaikutuksen merkit,

▼B

— kliinisten havaintojen laatu, vakavuus ja kesto (sekä palautuvat vaikutukset että muut),

— silmätutkimuksen tulokset,

— aistitoiminta, tarttumisvoimakkuus ja motorisen aktiivisuuden arviointi (jos saatavilla),

— hematologiset testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot,

— kliinisen biokemian testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot,

— eläimen paino testin lopussa, elinten painot sekä elinten ja eläinten painosuhteet,

— ruumiinavauslöydökset,

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— imeytymistiedot, jos saatavilla,

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper. D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologie Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999–1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691–704.

(4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267–283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol, 1, pp. 233–236.

(6) Crofton K. M., Howard J. L, Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599–609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). ”Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies”, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198–201.

▼B

B.27. **SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MUILLA KUIN JYRSIJÖILLÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta N:o 409 (1998).

1.1 JOHDANTO

Määritettäessä ja arvioitaessa kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia voidaan subkrooninen toistetuilla annoksilla aiheutettu suun kautta vaikuttava myrkyllisyys määrittää sen jälkeen, kun alustavia myrkyllisyyttä koskevia tietoja on saatu välittömän myrkyllisyyden testistä tai toistetuilla annoksilla suoritetusta vuorokauden myrkyllisyystestistä. 90 vuorokauden tutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta aikana, jolloin eläin kasvaa nopeasti nuoreksi aikuiseksi. Tutkimuksessa saadaan tietoa tärkeimmistä myrkyllisyysvaikutuksista, siinä käyvät ilmi kohde-elimet ja aineen mahdollinen kertyminen ja siinä voidaan saada arvio haitattomista altistustasoista (NOAEL), joita voidaan käyttää valittaessa annoksia pitkäaikaisten vaikutusten tutkimiseen sekä turvallisuuskriteerien asettamiseen ihmisten altistukselle.

Tällä testimenetelmällä voidaan tunnistaa kemikaalialtistuksen haittavaikutukset muissa kuin jyrsijöissä, ja sitä olisi käytettävä ainoastaan silloin, kun

— muissa tutkimuksissa havaitut vaikutukset edellyttävät selvennystä tai tarkempaa ominaisuuksien määrittämistä jossain muussa lajissa, joka ei ole jyrsijä,

— oksikokineettisten tutkimusten perusteella muu kuin jyrsijä on paras koe-eläinlaji, tai

— muun kuin jyrsijän käyttö on perusteltua muista erityisistä syistä.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Annos: annetun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painoyksikköinä (g, mg) tai testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg) tai vakiopitoisuuksina ravinnossa (ppm).

Annostelu: yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

NOAEL: lyhennys määritelmälle ”no observed adverse effect level” eli korkein annostaso, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan suun kautta päivittäin asteittain vaihtelevina annoksina useille koe-eläinryhmille niin, että yhtä annostasoa annetaan ryhmää kohti 90 vuorokauden ajan. Tänä aikana eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyysvaikutusten havaitsemiseksi. Testin kuluessa kuolleille tai tapetuille eläimille tehdään ruumiinavaus, ja testin päättyessä myös vielä elossa olevat eläimet tapetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

▼B

1.4 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Jos käytetään muuta eläinlajia kuin jyrsijää, yleisesti käytetty koe-eläinlaji on koira. Koirarodun pitäisi olla tarkasti määritelty; usein käytetään beaglea. Muitakin lajeja, esim. sikaa tai minisikaa, voi käyttää. Kädellisiä ei suositella, ja niiden käytön olisi oltava perusteltua. Eläinten olisi oltava nuoria ja terveitä. Jos on kyseessä koira, annostelu olisi aloitettava mieluiten 4–6 kuukauden iässä ja viimeistään 9 kuukauden iässä. Jos tutkimuksen on tarkoitus olla alustava tutkimus pitkäaikaiselle myrkyllisyystutkimukselle, molemmissa tutkimuksissa olisi käytettävä samaa lajia/rotua.

1.4.2 **Eläinten valmistelu**

Testissä olisi käytettävä terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Totuttamisajan pituus riippuu valitusta koe-eläinlajista ja sen alkuperästä. Suositellaan vähintään viittä päivää koirille tai kyseistä tarkoitusta varten omassa siittolassa kasvatetuille sioille ja vähintään kahta viikkoa, jos eläimet ovat peräisin ulkopuoliselta toimittajalta. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Eläimet jaetaan satunnaistetusti kontrolli- ja käsittelyryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero.

1.4.3 **Annosten valmistelu**

Testiaine voidaan antaa ruokavaliossa tai juomavedessä, letkuruokinnalla tai kapseleina. Menetelmä riippuu tutkimuksen tarkoituksesta ja testiaineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista.

Tarvittaessa testiaine liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esim. maissiöljyyn) tehtävää liuosta tai emulsiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos liuotin on muu kuin vesi, sen myr-kyllisyysominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiilisuus annosteluolosuhteissa olisi määritettävä.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Kullakin annostasolla olisi käytettävä vähintään kahdeksaa eläintä (neljä naarasta ja neljä koirasta). Jos eläimiä tapetaan kokeen aikana, testiin on otettava alussa sen verran enemmän eläimiä kuin niitä tapetaan ennen tutkimuksen päättymistä. Eläinten lukumäärän testin päättyessä on oltava riittävä myrkyllisyysvaikutusten järkevään arviointiin. Kemikaalista tai sitä läheisesti muistuttavasta aineesta saatavilla olevien aiempien tietojen perusteella olisi harkittava kahdeksan eläimen (neljä kumpaakin sukupuolta) lisäryhmän sisällyttämistä kontrolliryhmään ja suurimman annoksen ryhmään sitä varten, että niitä havainnoitaisiin käsittelyjakson jälkeen mahdollisten myrkyllisyysvaikutusten palautumisen tai jatkumisen havaitsemiseksi. Tämä käsittelyn jälkeinen aika olisi asetettava havaittujen vaikutusten mukaan.

▼B

1.5.2 **Annokset**

Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa, ja testin kanssa samaan aikaan on tehtävä kontrolli, paitsi jos tehdään raja-arvotesti (ks. 1.5.3). Annostasot voidaan asettaa toistetuilla annoksilla tehdyn testin tai raja-arvotestin tulosten perusteella, ja kaikki mahdolliset testiaineesta tai samanlaisista aineista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon. Mikäli testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso olisi valittava siten, että se on myrkyllinen, mutta ei johda kuolemaan eikä aiheuta suurta kärsimystä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla. Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin n. 6–10-kertaisia).

Kontrolliryhmän on oltava käsittelemätön ryhmä tai kantaja-ainetta saava ryhmä, jos testiaineen antamiseen käytetään kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta testiainetta. Jos käytetään kantaja-ainetta, kontrolliryhmän on saatava kantaja-aine suurimmassa käytetyssä tilavuudessa. Jos testiaine annetaan ravinnon mukana ja siitä aiheutuu ravinnonoton vähenemistä, voi normaaliravintoa saava kontrolliryhmä olla hyödyllinen, jotta erotettaisiin maittavuudesta aiheutunut ravinnonoton väheneminen sellaisesta, joka aiheutuu testimallin toksikologisista muutoksista.

Seuraavat mahdollisen kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, aineenvaihduntaan tai testiaineen retentioon elimistössä; sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisyysominaisuuksia; sekä vaikutukset ravinnon tai veden nauttimiseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen.

1.5.3 **Raja-annostesti**

Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) / vrk ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

1.5.4 **Antotapa**

Eläimille annetaan testiainetta päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 90 vuorokauden ajan. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä, esim. testiainetta annetaan viitenä päivänä viikossa, se on perusteltava. Jos testiaine annetaan letkuruokinnalla, se on annettava yhtenä annoksena mahaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus riippuu koe-eläimen koosta. Tilavuuden pitäisi yleensä olla mahdollisimman pieni. Testitilavuuksien tilavuuden vaihtelun pitäisi olla mahdollisimman pientä (testiannos-ten pitoisuutta olisi säädeltävä niin, että tilavuus olisi sama kaikilla annostasoilla), paitsi jos käytetään ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutus suuremmissa pitoisuuksissa on yleensä voimakkaampi.

▼B

Kun testiaine annetaan ravinnon tai juomaveden kanssa, on tärkeää varmistaa, ettei testiainemäärä häiritse normaalia ravitsemusta tai vesitasetta. Kun testiaine annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa. Mahdolliset muut antotavat on mainittava. Kun aine annetaan letkulla tai kapseleina, annos olisi annettava joka päivä suunnilleen samaan aikaan, ja sitä olisi mukautettava tarvittaessa, jotta annostaso voitaisiin pitää vakiona suhteutettuna eläimen painoon. Kun 90 vuorokauden testin on tarkoitus olla alustava testi ennen pitkäaikaisen myrkyllisyystestin suorittamista, olisi molemmissa testeissä käytettävä samanlaista ruokavaliota.

1.5.5 **Havainnot**

Havainnointiajan olisi oltava vähintään 90 vuorokautta. Pitkäaikaiseen havainnointiin tarkoitetun ryhmän eläimiä olisi pidettävä sopiva aika ilman käsittelyä, jotta voitaisiin osoittaa myrkyllisyysvaikutusten pysyvyys tai eläinten toipuminen niistä.

Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan kellonaikaan (samoihin kellonaikoihin). Tässä olisi otettava huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten kliininen tila on kirjattava. Kaikki eläimet tarkastetaan sairastavuuden ja kuolleisuuden havaitsemiseksi vähintään kahdesti päivässä, tavallisesti aamulla ja illalla.

Kaikista eläimistä olisi tehtävä yksityiskohtaiset kliiniset havainnot vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata lähtötilaan) ja kerran viikossa sen jälkeen. Havainnointi olisi tehtävä niin, että eläin on häkin ulkopuolella, mieluiten vakioalueella ja suunnilleen samaan vuorokaudenaikaan. Olisi pyrittävä siihen, että havainnointiolosuhteissa olisi mahdollisimman vähän vaihtelua. Myrkyllisyyden merkit olisi kirjattava huolellisesti, mukaan luettuna niiden alkamisajankohta, aste ja kesto. Kirjattavia havaintoja olisivat mm. muutokset nahassa, turkissa, silmissä ja limakalvoissa, eritykset ja eritteet, autonominen aktiviteetti (esim. kyynelet, karvojen jäykistyminen, silmäterän koko, epätavallinen hengitys). Muutokset käynnissä, asennossa ja reagoimisessa käsittelyyn sekä kouristusliikkeet ja jäykkyys, kaavamaiset liikkeet (esim. liioiteltu siistiminen, toistuva ympyrää kulkeminen) tai omituinen käyttäytyminen olisi myös kirjattava (1).

Silmät olisi tutkittava oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testiaineen antamista ja testin lopussa mieluiten kaikilta koe-eläimiltä ja ainakin suuren annoksen ryhmään ja kontrolliryhmään kuuluvilta. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, olisi tutkittava kaikki eläimet.

1.5.5.1 *Eläimen paino ja ravinnon ja/lai veden nauttiminen*

Kaikki eläimet olisi punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnonotto olisi mitattava vähintään viikoittain. Jos testiaine annetaan juomaveden mukana, veden nauttiminen olisi myös mitattava vähintään viikoittain. Veden nauttimisen mittaamista voidaan harkita myös sellaisissa ruoka- tai letkuruokintatutkimuksissa, joiden aikana juomisessa voi esiintyä muutoksia.

▼B

1.5.5.2 *Hematologia ja kliininen biokemia*

Verinäytteet olisi otettava nimetystä paikasta ja säilytettävä tarvittaessa asianmukaisissa olosuhteissa. Testiajanjakson lopussa näytteet otetaan juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä.

Verestä olisi tehtävä tutkimuksen alussa ja sitten joko kuukauden välein tai testiajanjakson puolivälissä ja lopuksi testiajanjakson päättyessä seuraavat määritykset: hematokriitti, hemoglobiinikonsentraatio, punasolujen määrä, valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, verihiutaleiden määrä ja veren hyytymiskykyä kuvaavia määrityksiä, kuten hyytymisaika, protrombiiniaika tai tromboplastiiniaika.

Kliinisen biokemian määritykset, joilla tutkitaan tärkeimpiä myrkyllisyysvaikutuksia kudoksissa ja erityisesti munuaisissa ja maksassa, olisi tehtävä verinäytteistä, jotka on otettu kaikista eläimistä tutkimuksen alussa ja sitten joko kuukauden välein tai testiajanjakson puolivälissä ja lopuksi testiajanjakson päättyessä. Testattavaksi harkittavia kohteita ovat elektrolyyttitasapaino, hiilihydraattiaineenvaihdunta sekä maksan ja munuaisten toiminta. Erityistestien valinta riippuu testiaineen vaikutustavasta tehdyistä havainnoista. Eläimiä olisi pidettävä paastossa sopiva aika ennen verinäytteiden ottamista. Suositeltavia määrityksiä ovat mm. kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, paastoglukoosi, alaniiniaminotransferaasi, asparagiinihappoaminotransferaasi, omitiinidekarboksylaasi, gamma-glutamiinihappotranspeptidaasi, urcatyppi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiinipitoisuus.

Virtsamäärityksiä olisi tehtävä ainakin tutkimuksen alussa, sitten tutkimuksen puolivälissä ja lopuksi sen päättyessä (virtsan keruuaika on mitattava). Virtsasta on määritettävä ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH, valkuainen, glukoosi ja veri ja/tai verisolut. Muita muuttujia voidaan mitata tarvittaessa.

Lisäksi olisi harkittava yleistä kudosvauriota osoittavien merkkiaineiden määritystä. Muita myrkyllisyyden arviointiin mahdollisesti tarvittavia määrityksiä ovat esim. lipidi-, hormoni-, happo/emäs-, methemoglobiini- ja koliiniesteraasi-inhibiittorimääritykset. Muita kliinisen biokemian määrityksiä voidaan tehdä tarvittaessa havaittujen vaikutusten tutkimisen laajentamiseksi. Tarvittavat määritykset olisi yksilöitävä tiettyihin luokkiin kuuluville kemikaaleille tai tapauskohtaisesti.

Kaiken kaikkiaan lähestymistavan on oltava joustava. Se riippuu eläinlajista ja aineen havaitusta ja/tai odotetusta vaikutuksesta.

1.5.5.3 *Ruumiinavaustutkimukset*

Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja) maksa ja sappirakko, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, munasarjat, kohtu, kilpirauhanen (ja lisäkilpirauhaset), kateenkorva. perna, aivot ja sydän olisi puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne olisi punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi.

▼B

Seuraavat kudokset olisi säilöttävä sellaiseen kiinnitysväliaineeseen, joka sopii parhaiten kyseiselle kudostyypille ja aiottuun histopatologiseen tutkimukseen: kaikki suuret leesiot, aivot (edustavat alueet, mukaan luettuina isoaivot, pikkuaivot ja ydin/aivosilta), selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka), aivolisäke, kilpirauhanen, lisäkilpirauhanen, kateenkorva, ruokatorvi, sylkirauhaset, maha, ohut- ja paksusuoli (mukaan luettuna Peyerin imukerässikermät), maksa, sappirakko, haima, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, rintakehä ja keuhkot, aortta, sukurauhaset, kohtu, lisäsukupuolirauhaset, naaraan rintarauhanen, eturauhanen, virtsarakko, imusolmukkeet (mieluiten yksi imusolmuke, joka kattaa antotien ja toinen, joka on kaukana autotiestä ja kattaa systeemiset vaikutukset), ääreishermo (lonkkahermo tai säärihermo), mieluiten lähellä kyseessä olevaa lihasta, näyte luuytimestä (ja/tai tuore luuydinnestenäyte) ja nahkaa. Kliiniset ja muut löydökset voivat antaa aihetta muiden kudosten tutkimiseen. Myös muut elimet, joihin testiaineen oletetaan vaikuttavan ennestään tunnettujen ominaisuuksien perusteella, olisi säilöttävä.

1.5.5.4 *Histopatologia*

Täydellinen histopatologinen tutkimus olisi tehtävä kontrolliryhmän ja suuren annoksen ryhmän kaikkien eläinten säilötyistä elimistä ja kudoksista. Nämä tutkimukset on tehtävä myös muiden annosryhmien eläimille, jos suuren annoksen tyhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia.

Kaikki suuret leesiot olisi tutkittava.

Jos tutkimuksessa on mukana testiryhmä, jolle testiä on jatkettu pitempään sen jälkeen, kun testiaineen antaminen lopetettiin, histopatologiset tutkimukset on tehtävä niille kudoksille ja elimille, joissa on näkynyt muutoksia käsitellyissä ryhmissä.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Tutkimuksessa on ilmoitettava yksilökohtaiset tulokset. Tulokset on lisäksi esitettävä taulukoituina, ja niistä on käytävä ilmi seuraavat tiedot: kuhunkin ryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa; testin aikana kuolleena löydettyjen tai inhimillisistä syistä tapettujen eläinten lukumäärä ja kuoleman tai tappamisen ajankohta; niiden eläinten lukumäärä, joissa näkyy myrkkyvaikutuksia; havaittujen myrkkyvaikutusten kuvaus, mukaan luettuina myrkytysoireiden alku, kesto ja vakavuus; niiden eläinten lukumäärä, joissa havaitaan leesioita; leesioiden tyyppi ja kunkin tyypin leesioista kärsivien eläinten prosenttiosuus.

Kun on numeerisia tuloksia, ne on arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastomenetelmällä. Tilastomenetelmät ja analysoitavat määritystulokset on valittava tutkimusta suunniteltaessa.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

▼B

2.2.1 **Testiaine:**

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikokemialliset ominaisuudet,

— tunnistetiedot,

— kantaja-aine (tarvittaessa): jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

2.2.2 **Koe-eläinlajit:**

— käytetty eläinlaji ja kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— toimittaja, häkit, ravinto jne.,

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

2.2.3 **Koeolosuhteet:**

— annostasojen valintaperusteet,

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, pitoisuus, stabiilisuus ja tasalaatuisuus valmisteessa,

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta,

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

2.2.4 **Tulokset:**

— eläimen paino ja painon muutokset,

— ravinnon nauttiminen ja veden nauttiminen tarvittaessa,

— myrkkyvaste sukupuolittain ja annostasoittain, mukaan luettuina myrkkyvaikutuksen merkit,

— kliinisten havaintojen laatu, vakavuus ja kesto (sekä palautuvat vaikutukset että muut),

— silmätutkimukset,

— hematologiset testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot,

— kliinisen biokemian testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot,

— eläimen paino testin lopussa, elinten painot sekä elinten ja eläinten painosuhteet,

— ruumiinavauslöydökset,

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— imeytymistiedot, jos saatavilla,

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

▼B

B.28. **SUBKROONINEN MYRKYLLISYYSTESTI (IHON KAUTTA) TOISTUVA ANNOSTELU IHON KAUTTA, 90 VUOROKAUTTA, JYRSIJÄT**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Testattavaa ainetta annostellaan päivittäin 90 vuorokauden ajan useisiin ryhmiin jaettujen koe-eläinten iholle eri pitoisuuksina, yksi pitoisuus kullekin ryhmälle. Tutkimuksen kuluessa eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkkyoireiden toteamiseksi. Kokeen aikana kuolleille eläimille ja sen loputtua elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Eläimet siirretään koetiloihin ja testin aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen testin alkua. Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin. Juuri ennen kokeen alkua eläinten selästä poistetaan karvapeite leikkaamalla. Karvapeite voidaan myös ajella, mutta se tulee tehdä noin vuorokautta ennen testin alkua. Karvanpoisto on yleensä toistettava noin viikon välein. Karvapeitettä poistettaessa on varottava vahingoittamasta ihoa. Vähintään 10 % ruumiin pinnasta on oltava ajeltuna, jotta siihen voidaan annostellaan testattavaa ainetta. Koealueen suuruus ja peitesiteen mitat riippuvat eläimen painosta. Kun testataan kiinteitä aineita, jotka voidaan tarvittaessa jauhaa, aine kostutetaan vedellä tai sopivalla liuottimella, jotta ihoon saadaan hyvä kosketus. Testattavia nesteitä ei yleensä laimenneta. Päivittäinen altistus tehdään 5–7 kertaa viikossa.

Koeolosuhteet

K o e - e l ä i m e t

Voidaan käyttää täysikasvuisia rottia, kaneja tai marsuja. Muitakin lajeja voidaan käyttää, mutta niiden käyttö on perusteltava. Tutkimuksen alkaessa koe-eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskiarvosta. Mikäli pitkäaikaistutkimuksen esitestinä on tehty subkrooninen ihon kautta tapahtuva altistustesti, kummassakin kokeessa on käytettävä samaa lajia ja kantaa.

▼B

Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 20 terveihoista eläintä (10 naarasta ja 10 urosta). Naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. Mikäli tutkimussuunnitelma edellyttää eläinten lopettamista tutkimuksen kuluessa, eläinmäärään on lisättävä lopettaviksi aiottujen eläinten määrä. Lisäksi voidaan muodostaa 20 eläimen satelliittiryhmä (10 eläintä kumpaakin sukupuolta), jolle annetaan suurin annos 90 vuorokauden aikana ja jota tarkkaillaan 28 päivän ajan kokeen loputtua myrkytysoireiden ohimenevyyden, pysyvyyden tai viivästyneen esiintymisen toteamiseksi.

Annostasot

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää tai liuotinkontrolliryhmää, jos liuotinta käytetään. Päivittäinen altistusaika on vähintään kuusi tuntia. Eläimet altistetaan testattavalle aineelle samaan aikaan joka päivä ja annosta säädetään määräajoin (viikoittain tai joka toinen viikko), jotta annostaso pysyy muuttumattomana suhteessa eläimen painoon. Kontrolliryhmän eläimille ei anneta testattavaa ainetta, mutta muuten niitä käsitellään aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä. Mikäli liuotinta käytetään annostelun helpottamiseksi, kontrolleille annostellaan liuotinta samalla tavoin kuin testiryhmille ja liuottimen määrä on yhtä suuri kuin suurimman annostason saavan testiryhmän liuotinmäärä. Suurimman annoksen tulisi aiheuttaa myrkytysoireita, mutta ei lainkaan tai hyvin vähän kuolemantapauksia. Pienimmällä annoksella ei saisi olla myrkkyvaikutusta. Mikäli ihmisten altistustasosta on tietoja, pienimmän testiannoksen on oltava tätä suurempi. Keskimmäisen annostason olisi aiheutettava pienimmät havaittavissa olevat myrkytysoireet. Käytettäessä useampia väliannostasoja ne on porrastettava niin, että myrkytysoireet lisääntyvät asteittain. Pienimmän ja keskisuuren annoksen saavissa ryhmissä sekä kontrolliryhmässä kuolemantapausten luvun on oltava pieni, jotta tuloksista voidaan tehdä luotettava arviointi.

Mikäli testattava aine aiheuttaa voimakasta ihon ärsytystä, aineen pitoisuutta pienennetään ja tämä voi aiheuttaa muiden myrkytysoireiden poisjäämisen tai vähenemisen korkeimmalla annostasolla. Jos iho on pahoin vaurioitunut, voi olla tarpeen lopettaa tutkimus ja aloittaa uusi pienemmillä pitoisuuksilla.

Raja-annostesti

Jos esitutkimuksessa ei esiinny testattavaan aineeseen liittyviä myrkkyvaikututuksia 1 000 mg/kg:n tai sitä suuremmalla, ihmisten altistumisen perusteella määritetyllä annostasolla, jatkotestejä ei yleensä tarvitse tehdä.

Tarkkailuaika

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkytysoireiden toteamiseksi. Kuolinaika sekä myrkytysoireiden alkamis- ja loppumisaika kirjataan.

▼B

Testin suorittaminen

Eläimet säilytetään yksittäishäkeissä. Niitä käsitellään testattavalla aineella mieluimmin viikon jokaisena päivänä 90 vuorokauden ajan.

Mikäli tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä, sitä tarkkaillaan vielä 28 päivän ajan altistamisen loputtua myrkkyvaikutusten ohimenevyyden tai pysyvyyden toteamiseksi. Altistamisajan on oltava kuusi tuntia päivässä.

Testattavaa ainetta annostellaan tasaisesti alueelle, joka on n. 10 % ruumiin koko pinta-alasta. Testattaessa erittäin myrkyllisiä aineita altistusalue voi olla pienempi, mutta aine tulisi levittää alueelle mahdollisimman ohuena ja tasaisena kalvona.

Testattava aine pidetään kosketuksessa ihoon huokoisen sideharson ja ärsyttämättömän teipin avulla. Testialueelle on asetettava jokin sopiva peite pitämään harsosidos ja testattava aine paikoillaan ja estämään eläintä syömästä sitä. Eläimen liikkumista voidaan rajoittaa, mutta täydellisesti liikkumattomaksi saattaminen ei ole suositeltava menettelytapa.

Altistusajan päätyttyä jäljellä oleva aine poistetaan vedellä tai puhdistamalla iho jollakin muulla sopivalla tavalla.

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja myrkytysoireet, niiden alkamis- ja kestoaika sekä voimakkuus kirjataan. Eläimiä tarkkailtaessa kiinnitetään huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Ruoan kulutus mitataan ja eläimet punnitaan viikoittain. Tarkkailua on suoritettava säännöllisesti, jotta koe-eläimiä ei menetettäisi kannibalismin, kudosten autolyysin tai virheellisen sijoituksen vuoksi. Tutkimuksen päätyttyä eloonjääneille eläimille satelliittiryhmää lukuun ottamatta suoritetaan ruumiinavaus. Kuolemaisillaan olevat eläimet poistetaan viipymättä ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Seuraavat tutkimukset tehdään testin päätyttyä kaikille eläimille, mukaan lukien kontrolliryhmän eläimet:

a) Silmätutkimus on suoritettava oftalmoskoopilla tai vastaavalla laitteella ennen aineen antamista ja testin päätyttyä mieluimmin kaikille eläimille, mutta vähintään suurimman annoksen saaneille sekä kontrolliryhmälle. Mikäli silmissä havaitaan muutoksia, kaikki eläimet tutkitaan.

b) Veritutkimus, jossa määritetään hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, leukosyyttien määrä ja erittely sekä joitakin hyytymisominaisuuksia kuten hyytymisaika, protrombiiniaika, tromboplastiiniaika tai trombosyyttien määrä, tehdään tutkimusajanjakson päätyttyä.

▼B

c) Veren kliininen biokemiallinen tutkimus on suoritettava tutkimusajanjakson päätyttyä. Kaikkiin tutkimuksiin soveltuvia määrityskohteita ovat elektrolyyttitasapaino, hiilihydraattien metabolia sekä, maksan ja munuaisten toiminta. Testien valintaperusteena on aineen todettu vaikutustapa. Suositeltavia määrityskohteita ovat: kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, glukoosin paastoarvo (lajille soveltuva paaston pituus), seerumin glutamiinipyruviinitransaminaasi ([1]), seerumin glutamiinioksaloasetaattitransaminaasi ([2]), ornitiinidekarboksylaasi, gammaglutamyylitranspeptidaasi, virtsan typpi, albumiini, veren kreatiniinin kokonaisbilirubiini ja seerumin proteiinit. Myrkyllisyyden arvioinnissa auttavat tarvittaessa lisävalaistusta esimerkiksi lipidi-, hormoni-, happo/emästasapaino-, methemoglobiini- ja kolinesteraasiaktiivisuuden analyysit. Muitakin kliinisiä biokemiallisia testejä voidaan tehdä, jos todettujen vaikutusten laajempi tutkimus on tarpeen.

d) Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta.

Mikäli käytettävissä olevat taustatiedot ovat riittämättömät, hematologisten ja biokemiallisten parametrien määritystä tulisi harkita ennen altistuksen aloittamista.

Ruumiinavaus

Kaikille koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus, jossa tutkitaan ruumis ulkopuolelta, kaikki aukot, kallo-, rinta- ja vatsaontelo sekä niiden sisältö. Maksa, munuaiset, lisämunuaiset ja kivekset punnitaan märkinä mahdollisimman pian irrottamisen jälkeen, jotta ne eivät pääse kuivumaan. Seuraavat elimet ja kudokset säilytetään sopivassa aineessa mahdollista myöhempää histopatologista tutkimusta varten: kaikki näkyvät vammat, aivot — ytimen/aivosillan osat mukaan lukien, pikkuaivokuori ja aivokuori, aivolisäke, kilpirauhanen/lisäkilpirauhanen, kateenkorvakudosta, (henkitorvi), keuhkot, sydän, aortta, sylkirauhaset, maksa, perna, munuaiset, lisämunuaiset, haima, sukupuolirauhaset, kohtu, muut sukupuolielimet, sappirakko (jos on), ruokatorvi, mahalaukku, pohjukaissuoli, ohutsuoli, umpisuoli, paksusuoli, peräsuoli, virtsarakko, tyypillinen imusolmuke (naarailta rintarauhanen), (reisilihaksistoa), ääreishermo, (silmät), (rintalasta luuytimineen), (reisiluu ja nivelen pintaa) (selkärankaa kolmesta kohdasta — kaulasta, henkitorven keskiosasta ja lantiosta) sekä (kyynelrauhaset). Suluissa olevat kudokset tutkitaan vain, jos ne tai kohde-elimet osoittavat merkkejä myrkyllisyydestä.

Histopatologinen tutkimus

a) Suurimman annoksen saaneen ryhmän sekä kontrolliryhmän eläinten normaalista ja altistetusta ihosta otetuille näytteille sekä elin- ja kudosnäytteille tehdään täydellinen histopatologinen tutkimus.

b) Kaikki näkyvät vammat tutkitaan.

([1]) Nykyisin seerumin alaniiniaminotransferaasi.
([2]) Nykyisin seerumin aspartaattiaminotransferaasi.

▼B

c) Muiden annosryhmien eläinten tärkeät elimet tutkitaan.

d) Rotan ollessa koe-eläimenä tutkitaan alhaisen ja keskitason annosryhmien eläinten keuhkot infektioiden löytämiseksi, koska niiden perusteella pystytään vaivattomasti arvioimaan eläinten terveydentila. Yleensä ei näiden ryhmien eläimille tarvitse suorittaa muita histopatologisia tutkimuksia, mutta elimet, jotka suurimman annoksen saaneessa ryhmässä olivat vaurioituneet, on aina tutkittava myös näiden ryhmien osalta.

e) Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä, histopatologinen tutkimus suoritetaan niille elimille ja kudoksille, joissa muiden ryhmien eläimillä oli vaurioita.

2. **TULOKSET**

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä kokeen alussa, vammautuneiden eläinten määrä ja eläinten prosentuaalinen osuus kutakin erityyppistä vammaa kohden. Tulosten merkitsevyys arvioidaan jotakin tilastollista menetelmää käyttäen. Kaikkia tunnettuja tilastointimenetelmiä voidaan käyttää.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio,

— koeolosuhteet,

— annostasot (käytetty liuotin) ja pitoisuudet,

— myrkyllisyysoireet sukupuolen ja annostason perusteella,

— oireeton taso, mikäli mahdollista,

— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet sen päätyttyä,

— selostus myrkyllisyysoireista ja muista vaikutuksista,

— kunkin oireen toteamisaika ja kehittyminen,

— ruokintaa ja painoa koskevat tiedot,

— silmälöydökset,

— veritestit ja kaikki tulokset,

— kliiniset biokemialliset testit ja kaikki tulokset (myös virtsa-analyysitulokset),

— ruumiinavauslöydökset,

▼B

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— tulosten tilastointitapa, mikäli mahdollista,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼M4

B.29 SUBKROONINEN MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 90 PÄIVÄN TUTKIMUS

TIIVISTELMÄ

Tämän tarkistetun testimenetelmän B.29 tarkoituksena on luonnehtia kokonaisvaltaisesti testikemikaalin myrkyllisyyttä hengitettynä toistuvan altistuksen jälkeen tietyllä ajanjaksolla (90 päivää) ja tuottaa yksityiskohtaista tietoa määrällistä riskinarviointia varten. Jyrsijäryhmät, joissa on vähintään kymmenen urosta ja kymmenen naarasta, altistetaan kuuden tunnin ajan päivittäin 90 päivän (13 viikon) ajan a) testikemikaalille kolmella tai useammalla pitoisuudella, b) suodatetulle ilmalle (negatiivinen kontrolli) ja/tai kantaja-aineelle (kantaja-ainekontrolli). Eläimiä altistetaan yleensä viitenä päivänä viikossa, mutta myös seitsemän päivän altistus viikossa on mahdollista. Sekä uroksia että naaraita testataan aina, mutta ne voidaan altistaa eri pitoisuuksille, jos jommankumman tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille. Tässä menetelmässä tutkimuksen johtajalla on mahdollisuus sisällyttää tutkimukseen satelliittiryhmiä (vaikutusten korjaantuvuus), eläinten lopettamista tutkimuksen aikana, bronkoalveolaarinen huuhtelu (BAL), neurologisia testejä sekä muita kliinis-kemiallisia ja histopatologisia arviointeja, jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia paremmin.

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta TG 413 (2009). Alkuperäinen subkroonista inhalaatiotestiä koskeva testiohje nro 413 (TG 413) hyväksyttiin vuonna 1981. Tätä testimenetelmää B.29 (joka vastaa tarkistettua ohjetta TG 413 (2009)) on ajantasaistettu, jotta tieteellinen kehitys voidaan ottaa huomioon ja jotta nykyiset ja tulevat sääntelyvaatimukset voidaan täyttää.

2. Subkroonisia tutkimuksia, joissa tarkastellaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä, käytetään pääasiassa lakisääteisten pitoisuuksien johtamiseen, jotta on mahdollista arvioida työntekijälle työssä aiheutuva riski. Tutkimuksia käytetään myös ihmisten asumiseen, kuljetukseen ja ympäristöön liittyvän riskin arvioinnissa. Tämän menetelmän avulla voidaan luonnehtia haittavaikutuksia, joita seuraa toistuvasta altistumisesta testikemikaalille päivittäin hengityksen kautta 90 päivän ajan (noin 10 prosenttia rotan elinajasta). Subkroonisia hengitysmyrkyllisyyttä tarkastelevia tutkimuksia voidaan käyttää myös määrällisissä riskinarvioinneissa ja kroonisten tutkimusten pitoisuuksien valinnassa. Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALUSTAVAT HUOMIOT

3. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tietoihin, joista voi olla apua asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Jos oletetaan tai havaitaan, että tutkimuksen aikana ilmenee neurotoksisuutta, tutkimuksen johtaja voi sisällyttää tutkimukseen asianmukaisia arviointeja, kuten toiminnallisen havaintosarjan (FOB:n) ja motorisen aktiivisuuden mittauksen. Vaikka altistuksen ajoitus voi olla kriittinen tietyissä tutkimuksissa, näiden ylimääräisten toimien toteuttaminen ei saa häiritä perustutkimuksen rakennetta.

▼M4

4. Syövyttävien tai ärsyttävien testikemikaalien laimennoksia voidaan testata sellaisina pitoisuuksina, joilla saadaan aikaan haluttu myrkyllisyyden aste. Katso lisätietoja ohjeasiakirjasta GD 39 (2). Kun eläimiä altistetaan näille materiaaleille, tavoitepitoisuuksien on oltava riittävän pienet, jotta eläimille ei aiheudu suurta kipua ja stressiä, mutta kuitenkin tarpeeksi suuret, jotta pitoisuus-vastekäyrä on riittävä sääntelyyn liittyvien ja tieteellisten testaustavoitteiden saavuttamiseksi. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja niiden tulee ensisijaisesti perustua asianmukaisesti suunniteltuun annosalueen määritystestiin, josta saadaan tietoa kriittisestä tutkittavasta ominaisuudesta, ärsytysrajasta ja oireiden alkamisajankohdasta (katso 11–13 kohta). Pitoisuuden valinnalle on esitettävä perusteet.

5. Kuolemaisillaan olevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti. Kuolemaisillaan olevia eläimiä käsitellään samalla tavalla kuin eläimiä, jotka kuolevat testissä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

6. Kokeessa tulee käyttää terveitä nuoria täysikasvuisia jyrsijöitä, jotka kuuluvat yleisesti käytettyihin koe-eläinkantoihin. Suositeltavin laji on rotta. Jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

7. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Satunnaistamispäivänä eläinten on oltava nuoria ja täysikasvuisia, ja niiden iän on oltava 7–9 viikkoa. Ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Eläinten hoito

8. Eläimet on voitava erottaa toisistaan esimerkiksi ihon alle asennettavien lähettimien avulla havainnoinnin helpottamiseksi ja sekaannuksien välttämiseksi. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

▼M4

Inhalaatiokammiot

9. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistustapa on vain nasaalisesti (nose-only; tähän termiin kuuluvat altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti -altistuksen ja koko kehoon kohdistuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET

Rajapitoisuudet

10. Toisin kuin akuuteissa tutkimuksissa, subkroonisissa tutkimuksissa, joissa tarkastellaan myrkyllisyyttä hengitettynä, ei ole määritettyjä rajapitoisuuksia. Testatun enimmäispitoisuuden osalta on otettava huomioon seuraavat seikat: 1) suurin mahdollinen pitoisuus, 2) ihmisen altistustaso pahimmassa tapauksessa, 3) tarve ylläpitää riittävä hapensyöttö ja/tai 4) eläinten hyvinvointiin liittyvät seikat. Koska tietoon perustuvia rajoja ei siis ole, voidaan käyttää asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (13) mukaisia akuutteja rajoja (ts. enimmäispitoisuus aerosolien osalta on 5 mg/l, höyryjen osalta 20 mg/l ja kaasujen osalta 20 000 ppm), ks. GD 39 (2). Jos nämä rajat täytyy ylittää esimerkiksi testattaessa kaasuja tai erittäin haihtuvia testikemikaaleja (esimerkiksi jäähdytysaineita), sille on esitettävä perustelut. Rajapitoisuudella on saatava aikaan selvä myrkyllisyys, joka ei saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

Annosalueen määritystutkimus

11. Ennen päätutkimuksen aloittamista on yleensä tarpeen tehdä annosalueen määritystutkimus. Annosalueen määritystutkimus on esikoetta kattavampi, koska sitä ei ole rajattu pitoisuuden valintaan. Annosalueen määritystutkimuksesta karttunut tieto voi edistää päätutkimuksen onnistumista. Annosalueen määritystutkimuksesta voidaan saada esimerkiksi teknistä tietoa analyysimenetelmistä, hiukkasten koosta, toksisten mekanismien löytämisestä, kliinisestä patologiasta ja histopatologiasta, ja sen avulla voidaan arvioida, mitkä ovat päätutkimuksen NOAEL- ja MTC-pitoisuudet. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa annosalueen määritystutkimuksen, jotta tiedetään, mikä on hengityselimistöä ärsyttävä pitoisuus (esimerkiksi hengityselimistön histopatologia, keuhkojen toiminnan testaus tai bronkoalveolaarinen huuhtelu), mikä on siedettävän pitoisuuden yläraja, joka ei aiheuta eläimille tarpeetonta stressiä, ja millä parametreilla testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia parhaiten.

12. Annosalueen määritystutkimuksessa voi olla yksi tai useampi pitoisuustaso. Valittujen tutkittavien ominaisuuksien mukaan kullekin pitoisuustasolle on altistettava 3–6 urosta ja 3–6 naarasta. Annosalueen määritystutkimuksen on kestettävä vähintään viisi päivää, yleensä ei enempää kuin 28 päivää. Tutkimusraportissa on esitettävä perustelut päätutkimuksen pitoisuuksien valinnalle. Päätutkimuksen tavoite on osoittaa sellainen pitoisuus-vastesuhde, joka perustuu herkimmäksi oletettuun tutkittavaan ominaisuuteen. Pienen pitoisuuden on mielellään oltava sellainen, joka ei aiheuta havaittavia haittavaikutuksia, kun taas suuren pitoisuuden on aiheutettava selvä myrkyllisyys, joka ei kuitenkaan saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

▼M4

13. Kun valitaan annosalueen määritystutkimuksen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös rakenne-aktiivisuussuhdetta koskevia tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja (katso 3 kohta). Annosalueen määritystutkimuksessa voidaan vahvistaa tai kumota se, mitä pidetään herkimpänä mekanistisesti perusteltuna päätepisteenä, esimerkiksi koliiniesteraasin esto organofosfaateilla, methemoglobiinin muodostus erytrosytotoksisilla aineilla, kilpirauhashormonit (T_3, T_4) kilpirauhaselle myrkyllisillä aineilla sekä proteiini, LDH tai neutrofiilit bronkoalveolaarisessa huuhtelussa vaarattomilla huonosti liukenevilla hiukkasilla tai keuhkoja ärsyttävillä aerosoleilla.

Päätutkimus

14. Subkroonista myrkyllisyyttä koskeva päätutkimus sisältää yleensä kolme pitoisuustasoa ja tarvittaessa myös samanaikaiset negatiivisen (ilma)verrokin ja/tai kantaja-aineverrokin (katso 18 kohta). Asianmukaisten altistustasojen valinnassa on käytettävä apuna kaikkia saatavilla olevia tietoja, mukaan luettuina tulokset systeemisistä myrkyllisyystutkimuksista sekä metabolia ja kinetiikka (erityisesti on pyrittävä välttämään suuria pitoisuuksia, joiden vuoksi kineettiset prosessit saturoituvat). Jokainen testiryhmä sisältää 10 urosjyrsijää ja 10 naarasjyrsijää, jotka altistetaan testikemikaalille kuuden tunnin ajaksi päivittäin viitenä päivänä viikossa 13 viikon ajanjaksolla (tutkimuksen kokonaiskesto on vähintään 90 päivää). Eläimet voidaan altistaa myös seitsemänä päivänä viikossa (esimerkiksi testattaessa inhaloitavia lääkkeitä). Jos jommankumman sukupuolen tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille, sukupuolet voidaan altistaa eri pitoisuuksille pitoisuus-vasteen optimoimiseksi 15 kohdassa kuvatun mukaisesti. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoja voidaan mukauttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Perustelut on esitettävä, jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä tai jos on toteutettava pitkäkestoinen (esimerkiksi 22 tuntia/päivä) koko kehoon kohdistuvan altistuksen tutkimus (katso GD 39) (2). Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana, paitsi jos altistus kestää yli kuusi tuntia. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

15. Valituilla tavoitepitoisuuksilla tulee voida tunnistaa kohde-elin (-elimet) ja osoittaa selvä pitoisuus-vaste:

— Suurimman pitoisuuden tulee aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia, mutta ne eivät saa lievittyä tai aiheuttaa kuolleisuutta, koska se estää mielekkään arvioinnin.

— Keskisuuri pitoisuus (keskisuuret pitoisuudet) on valittava siten, että myrkylliset vaikutukset porrastuvat pienimmän ja suurimman pitoisuuden välille.

— Pienimmän pitoisuuden tulee aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan oireita myrkyllisyydestä.

Eläinten lopettaminen tutkimuksen aikana

16. Jos eläimiä suunnitellaan lopetettavaksi tutkimuksen aikana, eläinten lukumäärää kullakin altistustasolla on lisättävä lopetettujen eläinten lukumäärää vastaavasti ennen tutkimuksen päättämistä. Tutkimuksen aikana tapahtuville lopetuksille on esitettävä perustelut, ja niistä on laadittava myös asianmukaiset tilastolliset analyysit.

▼M4

Satelliittitutkimus (vaikutusten korjaantuvuus)

17. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) avulla voidaan tarkkailla myrkytysoireiden korjaantuvuutta, pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö viivästyneitä myrkytysoireita käsittelyn jälkeisellä jaksolla, jonka on oltava riittävän pitkä, vähintään kuitenkin 14 päivää. Satelliittiryhmissä (korjaantuvuusryhmissä) on 10 urosta ja 10 naarasta, jotka altistetaan samaan aikaan kuin päätutkimuksen koe-eläimet. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) ryhmät on altistettava testikemikaalille suurimmalla pitoisuudella, ja tarvittaessa tutkimuksissa on oltava rinnakkaiset ilma- ja/tai kantaja-aineverrokit (katso 18 kohta).

Verrokkieläimet

18. Rinnakkaisryhmien negatiivisia (ilma)verrokkieläimiä on käsiteltävä samalla tavalla kuin testiryhmän eläimiä muutoin paitsi että ne altistetaan suodatetulle ilmalle testikemikaalin sijasta. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna vettä tai muuta ainetta, tutkimukseen on sisällytettävä kantaja-aineverrokkiryhmä negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän sijasta. Kantaja-aineena on käytettävä vettä, mikäli mahdollista. Jos kantaja-aineena käytetään vettä, verrokkieläimet on altistettava ilmalle, jonka suhteellinen kosteus on sama kuin altistusryhmissä. Sopiva kantaja-aine on valittava asianmukaisesti toteutetun esitutkimuksen tai aiempien tietojen pohjalta. Jos kantaja-aineen myrkyllisyyttä ei tiedetä, tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää sekä negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ja kantaja-aineverrokkiryhmää, joskaan se ei ole suositeltavaa. Jos aiemmat tiedot osoittavat, että kantaja-aine on myrkytön, negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ei tarvita, ja tällöin tulee käyttää vain kantaja-aineverrokkia. Jos esitutkimus osoittaa, ettei kantaja-aineessa oleva testikemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa sitä, että kantaja-aine on myrkytön testatulla pitoisuudella, ja tällöin on käytettävä tätä kantaja-aineverrokkia.

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

19. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti, jotta hiukkaskokoa voidaan pienentää. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Hiukkaskokojakauma

20. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–3 μm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (4). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset ja kuidut voivat olla vaatimusta suurempia.

▼M4

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

21. Testikemikaali on testattava mielellään ilman kantaja-ainetta. Jos kantaja-aineen käyttö on tarpeellista asianmukaisen testikemikaalipitoisuuden ja hiukkaskoon tuottamiseksi, on käytettävä ensisijaisesti vettä. Aina kun testikemikaali liuotetaan kantaja-aineeseen, sen stabiilius on osoitettava.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

22. Ilman virtausta altistuskammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai ajallisen stabiiliuden) reaaliaikainen seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia inhalaatioparametreja. Jos pitoisuutta seurataan reaaliajassa, ilmavirtausten mittaustaajuutta voidaan vähentää yhteen mittaukseen altistusta kohti päivässä. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisesti -altistuksen kammioissa. Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava. Jos ensimmäisenä altistuspäivänä tehdyt mittaukset osoittavat, että näiden kaasujen pitoisuus on asianmukainen, myöhemmät mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

23. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava kerran tunnissa kunkin altistuksen aikana, mikäli mahdollista. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

24. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

25. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen

▼M4

analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit.

26. Jos mahdollista, koko tutkimuksen keston ajan on käytettävä yhdestä erästä peräisin olevaa testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

27. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana. Altistusolosuhteiden stabiiliuden osoittamiseen voidaan käyttää reaaliaikaista seurantalaitetta, kuten aerosolifotometria aerosoleille tai hiilivetyanalysaattoria höyryille. Kammion todellinen pitoisuus on mitattava vähintään kolme kertaa jokaisena altistuspäivänä ja jokaiselta altistustasolta. Jos se ei ole mahdollista pienen ilmavirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, yksi näyte altistuskertaa kohti hyväksytään. Tällöin tämä näyte on mielellään kerättävä koko altistuskerran ajalta. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan. Tässä otetaan huomioon hajoamiseen ja kammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95}). Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

28. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin. Sen vuoksi jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava koko seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai indikaattoriaineen (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

29. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kerran viikossa jokaisesta pitoisuudesta käyttämällä kaskadierotinta tai jotain vaihtoehtoista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, vaihtoehtoista laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan.

▼M4

30. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa kaikkien pitoisuuksien osalta tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa.

31. Höyryjen osalta hiukkaskoko on määritettävä, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyryatmosfäärissä, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia.

HAVAINNOT

32. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti ennen altistusjaksoa, sen aikana ja sen jälkeen. Tiiviimpi tarkkailu voi olla aiheenmukaista sen perusteella, millainen vaste eläimille muodostuu altistuksen aikana. Kun eläinten tarkkailu ei ole mahdollista immobilisointiputkien, huonosti valaistujen koko kehon altistuskammioiden tai läpinäkymättömien ilmakehien vuoksi, eläimiä on tarkkailtava huolellisesti altistuksen jälkeen. Myrkyllisten vaikutusten korjaantuvuutta tai pahenemista voidaan arvioida ennen seuraavan päivän altistusta tehtävillä havainnoilla.

33. Kaikki havainnot kirjataan jokaisesta eläimestä erikseen. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

34. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, hermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljenerityksen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta. Tutkimussuunnitelmaan voidaan sisällyttää muita arviointeja, kuten kinetiikka, biomonitorointi, keuhkojen toiminta, huonosti liukenevien, keuhkokudokseen kertyvien materiaalien retentio sekä käyttäytymisen muutokset.

RUUMIINPAINOT

35. Eläinyksilöiden painot on kirjattava vähän ennen ensimmäistä altistusta (päivä 0) ja sen jälkeen kahdesti viikossa (esimerkiksi perjantaisin ja maanantaisin, jotta voidaan osoittaa toipuminen altistuksettoman viikonlopun tai tietyn ajan jälkeen systeemisen toksisuuden arvioimiseksi) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä. Jos eläimessä ei ilmene vaikutuksia neljän ensimmäisen viikon aikana, ruumiinpainot voidaan punnita kerran viikossa tutkimuksen loppuun saakka. Satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläinten (jos käytössä) punnitsemista viikoittain on jatkettava koko toipumisjakson ajan. Tutkimuksen päättyessä kaikki eläimet on punnittava vähän ennen niiden lopettamista, jotta elinten ja ruumiinpainon väliset suhteet voidaan laskea ilman vääristymiä.

RAVINNON JA VEDEN KULUTUS

36. Ravinnon kulutus on mitattava viikoittain. Myös veden kulutus voidaan mitata.

▼M4

KLIININEN KEMIA

37. Kaikista eläimistä, myös verrokki- ja satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläimistä, on tehtävä kliinis-kemialliset arvioinnit, kun ne lopetetaan. Altistuksen päättymisen ja verinäytteen ottamisen välinen aika on merkittävä muistiin varsinkin, jos kyseinen tutkittava ominaisuus rekonstituoituu nopeasti. Niistä parametreista, joiden puoliintumisaika plasmassa on lyhyt (esimerkiksi COHb, CHE ja MetHb), on syytä ottaa näyte heti altistuksen päätyttyä.

38. Taulukossa 1 luetellaan ne kliinis-kemialliset parametrit, jotka yleensä vaaditaan kaikissa toksikologisissa tutkimuksissa. Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta. Jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voitaisiin luonnehtia tarkemmin, tutkimuksen johtaja voi päättää arvioida myös muita parametreja (esimerkiksi koliiniesteraasi, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini tai Heinzin kappaleet, kreatiinikinaasi, myelosyyttien ja punasolujen suhde, troponiinit, valtimoverikaasut, laktaattidehydrogenaasi, sorbitolidehydrogenaasi, glumaattidehydrogenaasi ja gammaglutamyylitranspeptidaasi).

Taulukko 1

Kliinis-kemialliset vakioparametrit

Hematologia	
Punasolujen määrä	Valkosolujen kokonaismäärä
Hematokriitti	Valkosolujen erittely
Hemoglobiinipitoisuus	Verihiutaleiden määrä
Keskihemoglobiini (MCH)	Hyytymisominaisuudet (valittava yksi):
Punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV)	— Protrombiiniaika
Keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC)	— Hyytymisaika
Retikulosyytit	— Partiaalinen tromboplastiiniaika
Kliininen kemia	
Glukoosi (*)	Alaniiniaminotransferaasi
Kokonaiskolesteroli	Aspartaattiaminotransferaa–si
Triglyseridit	Alkaalifosfataasi
Veren ureatyppi	Kalium
Kokonaisbilirubiini	Natrium
Kreatiniini	Kalsium
Kokonaisproteiini	Fosfori
Albumiini	Kloridi
Globuliini	
Virtsa-analyysi (valinnainen)	
Ulkonäkö (väri ja sameus)	Kokonaisproteiini
Määrä	Glukoosi
Ominaistiheys tai osmolaliteetti	Veri/verisolut
pH	

(*) Koska pitkähkö paastojakso voi vääristää glukoosinmittauksen tuloksia (käsitellyt eläimet vs. verrokkieläimet), tutkimuksen johtajan on päätettävä, onko eläinten pitäminen ravinnotta tarpeen. Jos paastojaksoa käytetään, sen on oltava käytetyille lajeille sopiva, esimerkiksi rotalle paastoajan pituus voi olla 16 h (ravinnotta yli yön). Paastoverensokeri voidaan määrittää yli yön toteutetun paaston jälkeen viimeisellä altistusviikolla tai yli yön paastoamisen jälkeen ennen ruumiinavausta (jälkimmäisessä tapauksessa on määritettävä myös kaikki muut kliinis-kemialliset parametrit).

▼M4

39. Jos on todisteita siitä, että alemmat hengitystiet (esimerkiksi keuhkorakkulat) ovat ensisijainen kertymä- ja retentiopaikka, bronkoalveolaarinen huuhtelu voi olla sopiva tekniikka analysoida määrällisesti hypoteesiperusteiset annos-vaikutus-parametrit, jotka kohdistuvat keuhkorakkulatulehdukseen, keuhkotulehdukseen ja fosfolipidoosiin. Tämän avulla voidaan testata annosvaste ja keuhkorakkuloiden vaurioiden ajalliset muutokset. Huuhtelunesteestä voidaan analysoida valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erottelu, kokonaisproteiini ja laktaattidehydrogenaasi. Lisäksi voidaan analysoida parametreja, jotka viittaavat lysosomien vaurioihin, fosfolipidoosiin, fibroosiin sekä ärsytyksen aiheuttamaan tai allergiseen tulehdukseen, johon voi sisältyä esitulehduksellisten sytokiinien/kemokiinien määritys. Bronkoalveolaariseen huuhteluun perustuvat mittaukset yleensä täydentävät histopatologisten tutkimusten tuloksia mutta eivät korvaa niitä. Ohjeita keuhkohuuhtelun tekemisestä on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

OFTALMOLOGINEN TUTKIMUS

40. Kaikilta eläimiltä on tutkittava silmänpohjat, taittavat väliaineet, värikalvot ja sidekalvot oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin antamista ja testin lopussa kaikilta suuren annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään kuuluvilta eläimiltä. Jos silmissä havaitaan muutoksia, kaikki muiden ryhmien eläimet on tutkittava, myös satelliittiryhmä (korjaantuvuusryhmä).

MAKROSKOOPPISET MUUTOKSET JA ELINTEN PAINOT

41. Kaikille koe-eläimille, myös kokeen aikana kuolleille tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetuille ja tutkimuksesta poistetuille, on tehtävä täydellinen verenlasku ja ruumiinavaus. Jokaisen eläimen viimeisen altistuksen ja lopetuksen välinen aika on merkittävä muistiin. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

42. Taulukossa 2 on lueteltu kaikki elimet ja kudokset, jotka on säilytettävä sopivassa aineessa histopatologista tutkimusta varten. [Hakasulkeisiin] merkittyjen elinten ja kudosten säilyttämisestä päättää tutkimuksen johtaja. **Lihavoidut** elimet ja kudokset on puhdistettava ja punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen välttämiseksi. Kilpirauhanen ja lisäkivekset on punnittava vain tarvittaessa, koska puhdistuksen aiheuttamat vahingot voivat estää histopatologisen arvioinnin. Kudokset ja elimet on kiinnitettävä 10-prosenttisella puskuroidulla formaliinilla tai muulla sopivalla kiinnitysaineella heti ruumiinavauksen jälkeen, vähintään 24–48 tuntia ennen puhdistusta sen mukaan, mitä kiinnitysainetta käytetään.

▼M4

Taulukko 2

Ruumiinavauksen aikana säilöttävät elimet ja kudokset

Lisämunuaiset	Ruokatorvi
Aortta	[Hajurauhanen]
Luuydin (ja/tai tuore aspiraatti)	**Munasarjat**
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Haima
Umpisuoli	Lisäkilpirauhanen
Paksusuoli	Ääreishermo (lonkka- tai säärihermo, mieluiten lihaksen läheltä)
Pohjukaissuoli	Aivolisäke
[**Lisäkivekset**]	Eturauhanen
[Silmät (verkkokalvo, silmähermo) ja silmäluomet]	Peräsuoli
Reisiluu ja polvinivel	Sylkirauhaset
Sappirakko (jos olemassa)	Rakkularauhaset
[Harderin rauhaset]	Iho
Sydän	Selkäydin (kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)
Sykkyräsuoli	**Perna**
Tyhjäsuoli	Rintalasta
Munuaiset	Maha
[Kyynelrauhaset (ekstraorbitaalisesti)]	Hampaat
Kurkunpää (kolmesta kohdasta, joista yhden oltava kurkunkansi)	**Kivekset**
Maksa	**Kateenkorva**
Keuhkot (kaikki lohkot yhdestä kohdasta, mukaan luettuina pääkeuhkoputket)	**Kilpirauhanen**
Imusolmukkeet keuhkoportin alueelta etenkin huonosti liukenevien hiukkasmaisten testikemikaalien yhteydessä. Tarkempia kokeita ja/tai tutkimuksia, joissa keskitytään immunologiaan, voidaan käyttää myös muita imusolmukkeita esimerkiksi välikarsinan, servikaaliselta/submandibulaariselta ja/tai aurikulaariselta alueelta.	[Kieli]
Imusolmukkeet (distaalisesti aineen antokohdasta)	Henkitorvi (vähintään kahdesta kohdasta siten, että mukana on yksi pitkittäinen leike harjun läpi ja yksi poikittainen leike)
Rintarauhanen (naaras)	[Virtsanjohdin]
Lihas (reisi)	[Virtsaputki]
Nenänielun kudokset (vähintään neljästä kohdasta, yhden kohdan on oltava nenänielukanava ja NALT-imukudos (Nasal Associated Lymphoid Tissue)	Virtsarakko
	Kohtu
	Kohde-elimet
	Kaikki silmin havaittavat vauriot ja mitat

▼M4

43. Keuhkot on poistettava kokonaisina, punnittava ja täytettävä sopivalla kiinnitysaineella 20–30 cm:n syvyisen veden paineessa, jotta niiden rakenne säilyy (5). Leikkeet on kerättävä kaikista lohkoista yhdestä kohdasta pääkeuhkoputket mukaan luettuina, mutta jos tehdään keuhkohuuhtelu, huuhtelemattomasta lohkosta on otettava leikkeet kolmesta kohdasta (ei sarjaleikkeitä).

44. Nenänielun kudoksista on tutkittava vähintään neljästä kohdasta otetut näytteet, joista yhden on oltava nenänielukanava (5) (6) (7) (8) (9), jotta levyepiteeli, välimuotoinen epiteeli (värekarvaton hengitysepiteeli), hengitysepiteeli (värekarvallinen), hajuepiteeli sekä imukudos (NALT) (10) (11) voidaan tutkia. Kurkunpäästä on tutkittava kolmesta kohdasta otetut leikkeet, ja yhden niistä on oltava kurkunpään kansi (12). Henkitorvesta on tutkittava vähintään kahdesta kohdasta otetut leikkeet, joista toisen on oltava pitkittäinen leike ekstrapulmonaalisten keuhkoputkien ja henkitorven harjun haarautuman läpi ja toisen poikittaisleike.

HISTOPATOLOGIA

45. Histopatologinen arviointi on tehtävä kaikkien taulukossa 2 lueteltujen elinten ja kudosten osalta niin verrokkiryhmästä kuin suuren pitoisuuden ryhmästä sekä kaikista eläimistä, jotka kuolevat tai jotka lopetetaan tutkimuksen aikana. Erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteihin, kohde-elimiin ja näkyviin vammoihin. Ne elimet ja kudokset, joissa suuren pitoisuuden ryhmän eläimillä on leesioita, on tutkittava kaikista ryhmistä. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa histopatologiset arvioinnit myös muista ryhmistä selvän pitoisuus-vasteen osoittamiseksi. Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä (korjaantuvuus), sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä, on tutkittava histopatologisesti. Jos suuren pitoisuuden ryhmässä on hyvin paljon varhaisia kuolemantapauksia tai muita ongelmia, jotka vaarantavat tietojen merkityksellisyyden, seuraava pienemmän pitoisuuden ryhmä on tutkittava histopatologisesti. Silmämääräisten havaintojen ja mikroskooppisten löydösten välille on pyrittävä löytämään korrelaatio.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

46. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava seuraavat tiedot: ruumiinpaino, ravinnonkulutus, kliinispatologiset tiedot, makroskooppiset muutokset sekä histopatologiset löydökset. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset. Kaikki tulokset, niin määrälliset kuin satunnaiset, on arvioitava sopivalla tilastomenetelmällä. Kaikkia yleisesti hyväksyttyjä tilastomenetelmiä voi käyttää, ja ne on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

Testiraportti

47. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

▼M4

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle tietoja lähteestä ja aiemmin saatuja tietoja voi ilmoittaa, jos ne koskevat eläimiä, jotka on altistettu samankaltaisessa altistuksessa ja joiden asumis- ja paasto-olosuhteet ovat olleet samat

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— yksityiskohtainen kuvaus inhalaatiokammiosta, mukaan luettuina tilavuus ja kaavakuva

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilman lähde ja ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti kammiossa (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— tulo- ja poistoilman käsittely

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuuden muutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

▼**M4**

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin kokonaismassa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava mieluummin massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.) kuin tilavuusyksikköinä (ppm, ppb jne.)

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät; yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä

— (mieluiten kaavion sisältävä) kuvaus testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— yksityiskohdat kammion lämpötilan, kosteuden ja ilmanvirtauksen seuraamiseen käytetystä laitteistosta (esimerkiksi kalibrointikäyrän laatiminen)

— yksityiskohdat kammion pitoisuuden ja hiukkaskokojakauman määrittämisessä tarvittavien näytteiden keräämiseen tarkoitetusta laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— satunnaistamismenetelmä, jolla eläimet jaettiin testi- ja verrokkiryhmiin

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— kunkin eläimen vastetulosten ja pitoisuustason taulukot (ts. eläimet, joilla ilmeni toksisuusoireita, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste, alkamisajankohta ja kesto)

▼M4

— taulukko kunkin eläimen painoista

— taulukko ravinnonkulutuksesta

— taulukko kliinis-kemiallisista tiedoista

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittämiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Kohde-elin (-elimet) on määritettävä.

— NOAEL- ja LOAEL-arvot on määritettävä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan.E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼**M4**

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

B.30 **KROONISET MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 452 (2009). Alkuperäinen testiohje nro 452 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.30 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (1) (2) (3) (4). Tämän testimenetelmän B.30 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.32 (Karsinogeenisuustesti) ja luvun B.33 (Yhdistetty krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuustesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa.

2. Koska valtaosa kroonisista myrkyllisyystutkimuksista tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos näitä tutkimuksia on tehtävä muilla lajeilla kuin jyrsijöillä, tässä testimenetelmässä kuvattujen periaatteiden ja menetelmien lisäksi voidaan soveltaa myös tässä liitteessä olevassa luvussa B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (5) kuvattuja periaatteita ja menetelmiä asianmukaisin muutoksin, kuten OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (Kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelu ja toteutus) (6) on määritelty.

3. Kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistumisreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistusreitti kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa. Vaikka pitkäaikaiset myrkyllisyystutkimukset, joissa altistus tapahtuu ihon tai hengitysteiden kautta, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta -antoreitistä aiheutuvan kroonisen myrkyllisyyden määrittämiseen ja arviointiin, on pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta hengitysteiden (6) (7) ja ihon kautta (6). Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa, joka koskee akuuttia testausta hengitysteiden kautta (7). Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (10).

▼M4

5. Kroonisesta myrkyllisyystutkimuksesta saadaan tietoa terveyshaitoista, joita käytetylle lajille todennäköisesti aiheutuu toistuvasta altistuksesta niiden elinkaaren suurimman osan aikana. Tutkimuksesta saadaan tietoa myös testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista, kohde-elimistä ja kemikaalin mahdollisesta kertymisestä. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Sitä voidaan käyttää määritettäessä turvallisuuskriteerejä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien tutkimusten tavoitteita ovat seuraavat:

— Testikemikaalin kroonisen myrkyllisyyden määrittäminen

— Kohde-elinten tunnistaminen

— Annos-vaste-suhteen luonnehtiminen

— NOAEL-arvon (tason, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta.

— Kroonisten myrkyllisyysvaikutusten ennustaminen ihmisten altistumistasoilla

— Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (6).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin myrkyllisiä ominaisuuksia, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että mahdollista kroonista myrkyllisyyttä voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tiedot vaikutustavasta, *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsittelevistä tutkimuksista saadut tiedot. Krooninen myrkyllisyys on määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu alustavia tietoja 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä, joissa on käytetty toistuvia annoksia. Kroonisen myrkyllisyystestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (11) (12) (13) (14).

8. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. Tässä yhteydessä on pohdittava, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus ja analyysi, jos testi päättyy yhden tai useamman ryhmän osalta ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (6) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia.

▼M4

9. Kroonisia myrkyllisyystutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: ”Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta.”

10. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (6) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (17) (18). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on oleellista varsinkin tilanteessa, kun on määrä toteuttaa yhdistetty kroonista myrkyllisyyttä ja karsinogeenisuutta koskeva tutkimus (tämän liitteen luku B.33) (11 kohta).

11. Erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämä testimenetelmä B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta on harkittava yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.33) toteuttamista. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus (tämän liitteen luku B.33), on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (9 ja 20–25 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia.

12. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

TESTIN PERIAATE

13. Testikemikaalia annetaan useille koe-eläinryhmille erisuuruisina annoksina joka päivä yleensä 12 kuukauden ajan, joskin on mahdollista valita tätä pidempi tai lyhyempi aika sääntelyvaatimusten mukaisesti (katso 33 kohta). Tämän pituisen ajan katsotaan olevan riittävän pitkä, jotta mahdolliset kumulatiivisen myrkyllisyyden vaikutukset tulevat esiin ilman geriatristen muutosten häiritseviä vaikutuksia. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on sitä lyhyempi. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta, mutta myös hengitysteiden tai ihon kautta testaus voi olla asianmukaista. Tutkimussuunnitelmaan voi myös sisältyä yksi tai useampi eläinten lopettamiskerta kesken kokeen esimerkiksi kolmen ja kuuden kuukauden kohdalla, ja tutkimukseen voidaan ottaa lisää eläinryhmiä tämän kompensoimiseksi (katso 19 kohta). Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin myrkyllisyyteen viittaavien oireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

▼M4

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

14. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän kroonisen myrkyllisyyden määrittämistä ja arviointia (katso 2 kohta), joskin samanlaiset tutkimukset muilla kuin jyrsijöillä saattavat olla tarpeen tietyn lainsäädännön nojalla. Lajin valinta on perusteltava. Tarvittaessa muilla lajeilla kuin jyrsijöillä tehtävät krooniset myrkyllisyystutkimukset on suunniteltava ja toteutettava tässä testimenetelmässä kuvattujen sekä tämän liitteen luvussa B.27 (Oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) kuvattujen periaatteiden mukaisesti Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

15. Tässä testimenetelmässä suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiirtä, voidaan käyttää. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Kroonisessa myrkyllisyystutkimuksessa on käytettävä eläimiä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin kestoltaan lyhyemmässä alustavassa myrkyllisyystutkimuksessa (alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

16. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (19) (20) (21). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien määrän on oltava mahdollisimman pieni. Tällaisia kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on ilmoitettava analyyttiset tiedot tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

17. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen. Eläimet tulee jakaa verrokki- ja

▼M4

testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

18. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Kun tutkimuksessa käytetään jyrsijöitä, jokaisella annostasolla on käytettävä yleensä vähintään 20:tä eläintä kumpaakin sukupuolta. Kun tutkimuksessa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, suositeltava määrä on vähintään neljä eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimuksissa, joissa käytetään hiiriä, kuhunkin annosryhmään saatetaan tarvita enemmän eläimiä, jotta kaikki vaadittavat hematologiset määritykset saadaan tehtyä.

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen sekä satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

19. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen (vähintään 10 eläintä/sukupuoli/ryhmä) esimerkiksi kuuden kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa toksikologisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Tutkimukseen voidaan sisällyttää myös satelliittiryhmiä, jotta tutkittavana olevan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta voidaan seurata. Nämä ryhmät rajataan yleensä tutkimuksen suurimman annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (22). Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken tutkimuksen tai jos tutkimukseen aiotaan sisällyttää satelliittiryhmiä tai erityisvalvonnassa olevien eläinten ryhmiä, tutkimussuunnitelman mukaista eläinten määrää on lisättävä niiden eläinten määrällä, jotka on määrä lopettaa ennen tutkimuksen päättymistä. Näitä eläimiä on yleensä tarkkailtava samalla tavalla kuin päätutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa käytettäviä eläimiä: niiden ruumiinpainoa ja ravinnon-/vedenkulutusta on tarkkailtava ja hematologiset ja kliinis-biokemialliset mittaukset sekä patologiset tutkimukset on tehtävä. Mittaukset voidaan rajata (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmissä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen.

Annosryhmät ja annostus

20. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (6). Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja samanaikaista verrokkiryhmää, paitsi jos tehdään rajatesti (katso 27 kohta). Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

▼M4

21. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohde-elimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimyksiä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Kun otetaan huomioon jäljempänä 22 kohdassa esitetyt tekijät, suurin annos on valittava siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla).

22. Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon. Suurin annos saa olla enintään 1 000 mg painokiloa kohti päivässä (raja-annos, katso 27 kohta).

23. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi viiteannos pienimmällä annostasolla (katso 25 kohta)) perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle.

24. Valittu annostason porrastus määräytyy testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset–nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

25. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (6) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ihmisten ennakoituja altistumistasoja koskeva pohdinta.

▼M4

26. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

27. Jos esitutkimuksista saatujen tietojen perusteella voidaan olettaa, ettei yksi annostaso, joka on vähintään 1 000 mg painokiloa kohti päivässä ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, todennäköisesti aiheuta haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla kemikaaleilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Tätä rajaa (1 000 mg painokiloa kohti päivässä) sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

28. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (6). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis- kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

29. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

30. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

▼M4

31. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä joka viikko) yleensä 12 kuukauden ajan (katso myös 33 kohta), joskin tätä pidempi aika voi olla tarpeen sääntelyvaatimusten perusteella. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen B.9 luvussa (10) on täsmennetty, vähintään 12 kuukauden ajan. Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakso on yleensä 12 kuukautta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (8).

32. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (22). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

33. Vaikka tämä testimenetelmä on tarkoitettu ensisijaisesti 12 kuukauden mittaiseen krooniseen myrkyllisyystutkimukseen, tutkimussuunnitelman mukaan testimenetelmää on mahdollista soveltaa joko lyhyempiin (esimerkiksi kuusi tai yhdeksän kuukautta) tai pitempiin (esimerkiksi 18 tai 24 kuukautta) tutkimuksiin tietyn lainsäädännön nojalla tai tiettyjen mekanististen tarkoitusten perusteella. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on tätä lyhyempi. Tutkimukseen sisältyville satelliittiryhmille, joiden avulla seurataan tutkittavan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta, ei saa antaa testikemikaalia vähintään neljään viikkoon eikä pidempään kuin kolmanneksen tutkimuksen kokonaiskestosta altistuksen päätyttyä. Lisää ohjeita ja tietoa eloonjäämisen käsittelystä tutkimuksessa on ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

HAVAINNOT

34. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä aamuin illoin joka päivä myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Kliinisiä yleishavaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen.

▼M4

35. Kaikista eläimistä on tehtävä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilanteeseen), tutkimuksen ensimmäisen viikon päätteeksi ja kerran kuukaudessa sen jälkeen. Havainnointi on toteutettava siten, että yksittäisten havainnoijien välinen vaihtelu on mahdollisimman pientä ja testiryhmästä riippumatonta. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella mieluiten vakioalueella samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. On pyrittävä varmistamaan, että havainnointiolosuhteissa on mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja ovat mm. ihon, karvapeitteen, silmien ja limakalvojen muutokset sekä sisäeritteiden, kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko ja epätavallinen hengitys) esiintyminen. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (24).

36. Kaikille eläimille on tehtävä silmätutkimus oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin ensimmäistä antokertaa. Tutkimuksen päätteeksi tämä tutkimus on tehtävä mieluiten kaikille eläimille, mutta vähintään suuren annoksen ryhmässä ja verrokkiryhmässä. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, kaikki eläimet on tutkittava. Jos rakenteellinen analyysi tai muut tiedot viittaavat silmiin kohdistuvaan myrkyllisyyteen, silmätutkimuksia on tehtävä useammin.

37. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan neurotoksisia vaikutuksia, voidaan lisäksi arvioida aistien reaktiivisuus erityyppisille ärsykkeille (24) (esimerkiksi kuulon, näön tai asentotunnon kautta välittyville ärsykkeille) (25), (26), (27), tarttumaotteen voimakkuus (28) ja motorinen toiminta (29) ennen tutkimuksen aloittamista ja kolmen kuukauden välein sen jälkeen, kunnes tutkimus on kestänyt 12 kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittauksissa mainittuja toimenpiteitä voidaan käyttää.

38. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan immunotoksisia vaikutuksia, tätä tutkittavaa ominaisuutta koskevat tarkemmat tutkimukset voidaan tehdä tutkimuksen päättyessä.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

39. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun kemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

▼M4

Hematologia ja kliininen biokemia

40. Tutkimuksissa, joissa käytetään jyrsijöitä, hematologiset tutkimukset on tehtävä vähintään kymmenelle urokselle ja kymmenelle naaraalle kutakin ryhmää kohti, kun tutkimus on kestänyt kolme, kuusi ja kaksitoista kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Kaikissa verikokeissa on käytettävä samoja eläimiä. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut hematologiset määritykset saadaan tehtyä (katso 18 kohta). Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos hematologisissa parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa.

41. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (30): valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, punasolujen määrä, verihiutaleiden määrä, hemoglobiinipitoisuus, hematokriitti (punasolujen tilavuusosuus), punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV), keskihemoglobiini (MCH), keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC), protrombiiniaika ja aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika. Muita hematologisia parametreja (kuten Heinzin kappaleet, epätyypillinen punasolujen morfologia tai methemoglobiini) voidaan tarvittaessa mitata testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti. Jos testikemikaali vaikuttaa verta muodostavaan järjestelmään, retikulosyyttien määrän ja luuytimen sytologinen tutkimus voi olla aiheenmukaista, joskaan sitä ei tarvitse tehdä rutiininomaisesti.

42. Kliinis-biokemialliset määritykset tärkeimpien myrkyllisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan vähintään kymmeneltä urokselta ja kymmeneltä naaraalta jokaisesta ryhmästä hematologisia tutkimuksia varten määritetyin aikavälein käyttäen aina samoja eläimiä. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut kliinis- biokemialliset määritykset saadaan tehtyä. Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos kliinisen biokemian parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Eläinten ruokinnan siirtämistä yön yli (hiiriä lukuun ottamatta) ennen verinäytteen ottoa suositellaan. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (30): glukoosi, virtsa (virtsan typpi), kreatiniini, kokonaisproteiini, albumiini, kalsium, natrium, kalium, kokonaiskolesteroli, vähintään kaksi hepatosellulaariseen arviointiin sopivaa testiä (alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, glutamaattidehydrogenaasi, kokonaissappihapot) (31), ja vähintään kaksi hepatobiliaariseen arviointiin sopivaa testiä (alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitransferaasi, 5'-nukleotidaasi, kokonaisbilirubiini, kokonaissappihapot) (31). Muita kliinis-kemiallisia parametreja, kuten paastotriglyseridit, tietyt hormonit ja koliiniesteraasi, voidaan mitata tarvittaessa testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti.

▼M4

43. Virtsa-analyysit on tehtävä vähintään kymmeneltä urokselta ja kymmeneltä naaraalta ryhmää kohti näytteistä, jotka otetaan samoina aikoina kuin hematologiset ja kliinis-kemialliset näytteet. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä, jos virtsa-analyysissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Seuraava parametriluettelo on kliinis-patologisia tutkimuksia koskevan asiantuntijasuosituksen mukainen (30): ulkonäkö, tilavuus, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH, kokonaisproteiini ja glukoosi. Muita määrityksiä ovat ketoaineet, urobilinogeeni, bilirubiini ja piilevä veri. Myös muita parametreja voidaan tarvittaessa käyttää, jos havaitun vaikutuksen (havaittujen vaikutusten) tutkimusta on laajennettava.

44. Koiratutkimuksissa lähtötilanteen hematologiset ja kliinis-biokemialliset muuttujat on yleensä määritettävä ennen käsittelyn aloittamista, mutta jyrsijätutkimuksissa niitä ei tarvitse määrittää (30). Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömät (katso 50 kohta), näiden tietojen hankkimista on harkittava.

Patologia

Ruumiinavaustutkimukset

45. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Mittaukset voidaan kuitenkin määrätä rajattavaksi (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmässä tai satelliittiryhmässä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen (katso 19 kohta). Näille eläimille ei tarvitse tehdä ruumiinavausta eikä jäljempänä olevissa kohdissa kuvattuja toimenpiteitä. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella.

46. Elinten painotiedot on kerättävä kaikilta eläimiltä lukuun ottamatta 45 kohdan jälkimmäisessä osassa lueteltuja eläimiä. Lisämunuaiset, aivot, lisäkivekset, sydän, munuaiset, maksa, munasarjat, perna, kivekset ja kilpirauhanen (punnittava kiinnityksen jälkeen lisäkilpirauhasten kanssa) on puhdistettava niihin kiinnittyvistä kudoksista tarkoituksenmukaisella tavalla, ja elinten märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi. Tutkimuksessa, jossa käytetään hiiriä, lisämunuaisten punnitseminen ei ole pakollista.

47. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (32) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]

▼M4

Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailta; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilta)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengityksen kautta altistuksen yhteydessä hengityselimistön säilytettyjen ja tutkittujen kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9). Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

48. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (32). Vähintään seuraavat histopatologiset tutkimukset on tehtävä:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— kohdekudokset tai kudokset, joissa oli käsittelyyn liittyviä muutoksia suuren annoksen ryhmässä; kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä

— parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

49. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni toksisia vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

50. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

51. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (8 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

Testiraportti

52. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

▼**M4**

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen):

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, mukaan lukien toksisuusoireet

— kliinisten havaintojen luonne, ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos se on pisteytetty) ja kesto (väliaikaisuus/pysyvyys)

— silmätutkimus

— hematologiset testit

— kliinisen biokemian testit

— virtsa-analyyttiset testit

— neurotoksisuutta tai immunotoksisuutta koskevien tutkimusten tulokset

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset

— kaikkien käsittelyyn liittyvien histopatologisten löydösten seikkaperäinen kuvaus

— tiedot imeytymisestä, mikäli saatavilla.

▼M4

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— annos-vastesuhteet

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— aiemmat vertailutiedot

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145–191.

4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

5) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä)

6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

8) Tämän liitteen luku B.8 (Subakuutti myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus)

9) Tämän liitteen luku B.29 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus)

10) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet))

11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

▼M4

14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

▼**M4**

30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam.&Appl. Toxicol. 29: 198–201.

31) EMEA (draft) document ”Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼B

B.31. **PRENATAALISEN KEHITYKSEN AIKAISTEN MYRKYLLISYYS-VAIKUTUSTEN TUTKIMUS**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 414 (2001).

1.1 JOHDANTO

Tämän sikiönkehityksen aikaisten myrkyllisyysvaikutusten testimenetelmän tarkoitus on hankkia yleistä tietoa syntymää edeltävän altistuksen vaikutuksista tiineeseen koe-eläimeen ja sen kohdussa kehittyvään organismiin. Testiin voi sisältyä emoon kohdistuvien vaikutusten arviointi sekä sikiön kuoleman, rakenteellisten epämuodostumien tai poikkeavan kehityksen arviointi. Sikiön toiminnallisia häiriöitä, jotka ovat tärkeä osa kehitystä, ei tutkita tässä menetelmässä. Niitä voidaan tutkia erillisellä testillä tai tämän testin ohessa käyttämällä hermostonkehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia selvittävää menetelmää. Toiminnallisten häiriöiden ja muiden syntymän jälkeisten vaikutusten testauksesta saa tietoa kahden sukupolven reproduktiivisten myrkyllisyysvaikutusten tutkimusmenetelmästä sekä hermostonkehitykseen kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten menetelmästä soveltuvin osin.

Tätä testimenetelmää voidaan joutua mukauttamaan yksittäistapauksissa testiaineen fysikokemiallisten tai toksikologisten ominaisuuksien mukaan. Mukauttaminen on hyväksyttävää, jos on olemassa vakuuttavaa tieteellistä viitettä, että testi olisi siten informatiivisempi. Jos testiä mukautetaan, on mainittu tieteellinen näyttö dokumentoitava huolellisesti tutkimusraportissa.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kehitystoksikologia: tieteenala, joka tutkii kehittyvässä organismissa esiintyviä haittavaikutuksia, jotka voivat aiheutua altistuksesta ennen hedelmöitymistä, syntymää edeltävän kehityksen aikana tai syntymän jälkeisenä aikana sukukypsyysikään asti. Sikiönkehityksen aikaisten myrkyllisyysvaikutusten tärkeimmät ilmenemismuodot ovat 1) organismin kuolema 2) rakenteelliset epämuodostumat 3) poikkeava kasvu sekä 4) toiminnalliset häiriöt. Aikaisemmin kehitystoksikologiaa kutsuttiin usein teratologiaksi.

Haittavaikutus: sellainen käsittelyyn liittyvä poikkeama perustasosta, joka vähentää organismin kykyä pysyä hengissä, lisääntyä tai sopeutua ympäristöön. Kehitystoksikologian kannalta haittavaikutus on laajimmassa merkityksessään mikä tahansa vaikutus, joka haittaa conceptuksen normaalia kehitystä sekä ennen syntymää että syntymän jälkeen.

Poikkeava kehitys: poikkeama poikasen elinten tai ruumiin painossa tai koossa.

Poikkeamat (epämuodostumat): kehityksessä ilmenevät rakenteelliset poikkeamat, joihin sisältyvät sekä epämuodostumat että vaihtelu (28).

Epämuodostuma / merkittävä epänormaalius: rakenteellinen muutos, joka katsotaan eläimelle haitalliseksi (voi olla myös letaali) ja jota esiintyy harvoin.

▼B

Vaihtelu / vähäinen epänormaalius: rakenteellinen muutos, joka katsotaan eläimelle vähän tai ei lainkaan haitalliseksi. Muutos voi olla ohimenevä ja esiintyä suhteellisen usein vertailupopulaatiossa.

Hedelmöitymisen tulos (conceptus): kaikki hedelmöityneestä munasolusta kehittyneet kudokset kaikissa kehitysvaiheissa hedelmöitymisestä syntymään asti. Sisältää alkion tai sikiön sekä sikiökalvot ja istukan.

Implantaatio: blastokystan kiinnittyminen kohdun epiteeliin, mukaan lukien tunkeutuminen epiteelin läpi ja kiinnittyminen endometriumiin.

Alkio: organismin varhais- tai kehitysvaihe, erityisesti munasolun hedelmöitymisen tuote pituusakselin ilmaantumisen jälkeen siihen saakka, kunnes keskeiset rakenteet ovat kehittyneet.

Alkioon kohdistuva myrkyllisyysvaikutus: alkion normaalia rakennetta, kehitystä, kasvua ja/tai elinkelpoisuutta haittaava vaikutus.

Sikiö: syntymätön organismi alkiokehityksen jälkeen.

Sikiöön kohdistuva myrkyllisyysvaikutus: sikiön normaalia rakennetta, kehitystä, kasvua ja/tai elinkelpoisuutta haittaava vaikutus.

Tiineyden keskeytyminen (abortoituminen): hedelmöitymisen tulosten (alkion tai elinkelvottoman sikiön) ennenaikainen poistuminen kohdusta.

Resorptio: implantaation jälkeen kuollut conceptus, joka resorboituu parhaillaan tai on jo resorboitunut.

Varhainen resorptio: todistettavasti tapahtunut implantaatio ilman tunnistettavaa alkiota tai sikiötä.

Myöhäinen resorptio: kuollut alkio tai sikiö, jossa näkyy ulkoisia degeneratiivisia muutoksia.

NOAEL: lyhennys määritelmälle ”no-observed-adverse-effect level” (haitaton vaikutustaso). Korkein annos- tai altistustaso, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

1.3 VERTAILUAINE

Ei käytössä.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan tiineille eläimille ainakin implantaation ja eläimen suunnitellun lopettamisen välisenä aikana. Lopettaminen on tehtävä mahdollisimman lähellä normaalia synnytyspäivää välttäen kuitenkin sitä, että menetettäisiin tutkimustietoja ennenaikaisen synnytyksen johdosta. Testimenetelmän tarkoitus ei ole tutkia yksinomaan organogeneesin eli elinten muodostumisen jaksoa (jyrsijöillä päivät 5–15, kaniinilla päivät 6–18), vaan myös soveltuvissa tapauksissa koko tiineyden aikaisia vaikutuksia alkaen ennen implantaatiota ja päättyen sektiota edeltävään päivään. Hiukan ennen sektiota naaraat lopetetaan, niiden kohdunsisältö tutkitaan ja sikiöistä tutkitaan ulkoiset näkyvät epämuodostumat sekä pehmytkudosten ja luuston muutokset.

▼B

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Eläinlajin valinta**

Testissä suositellaan käytettäväksi parhaiten soveltuvaa eläinlajia sekä sellaisia laboratorioeläinlajeja ja -kantoja, joita käytetään yleisesti syntymää edeltävien myrkyllisyysvaikutusten tutkimuksessa. Jyrsijöistä suositeltava koe-eläin on rotta ja muista eläimistä kaniini. Muiden lajien käyttö on erikseen perusteltava.

1.5.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla jyrsijöillä 22 °C (+ 3°) ja kaniineilla 18 °C (+ 3°). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70 %:a muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Pariutumisen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Pariutumisen jälkeen on suositeltavaa pitää kukin eläin omassa häkissään, mutta myös muutaman eläimen pitäminen samassa häkissä on hyväksyttävää.

1.5.3 **Eläinten valmistelu**

Testissä tulee käyttää terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan ja joita ei ole aiemmin käytetty testeihin. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Eläinten tulee kaikissa testiryhmissä olla samanpainoisia ja -ikäisiä niin tarkasti kuin on käytännössä mahdollista. Kullakin annostasolla tulee käyttää nuoria täysikasvuisia naaraita, jotka eivät ole synnyttäneet. Naaraat tulee parittaa saman lajin ja kannan urosten kanssa, ja sisarusten pariutumista tulee välttää. Jyrsijöillä tiineyden alkupäivä (päivä 0) on se, jolloin vaginan tulpitus ja/tai sperma havaitaan; kaniineilla se on yleensä pariutumisen tai keinosiemennyksen päivä, mikäli keinosiemennystä käytetään. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero. Paritetut naaraat jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmään, ja jos naaraat on paritettu erissä, kunkin erän eläimet tulee jakaa tasaisesti molempiin ryhmiin. Samoin on meneteltävä saman uroksen hedelmöittämien naaraiden kohdalla.

1.6 TESTIN SUORITUS

1.6.1 **Eläinten määrä ja sukupuoli**

Kussakin testi- ja kontrolliryhmässä tulee olla niin paljon naaraita, että ruumiinavaukseen saadaan noin 20 eläintä, joilla implantaatio voidaan havaita. Ryhmät, joissa tällaisia eläimiä on vähemmän kuin 16, eivät mahdollisesti ole asianmukaisia. Emojen kuolleisuus ei välttämättä heikennä tutkimuksen validiteettia, mikäli kuolleisuus ei ylitä keskimäärin 10 %:a.

▼B

1.6.2 **Annosten valmistelu**

Jos annostelun helpottamiseksi käytetään kantaja-ainetta tai muuta lisäainetta, on syytä selvittää sen vaikutus testiaineen absorboitumiseen ja jakautumiseen, testiaineen metaboloitumiseen, elimistössä säilymiseen ja erityksen. Lisäksi on selvitettävä sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka saattavat muuttaa testiaineen myrkyllisyyttä, sekä vaikutukset koe-eläinten ravinnon ja juoman nauttimiseen tai ravitsemustilaan. Kantaja-aineella ei saa olla sikiönkehitykseen tai lisääntymiseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia.

1.6.3 **Annostasot**

Normaalisti testiainetta annetaan päivittäin alkaen implantaatiosta (esim. päivä 5 pariutumisen jälkeen) suunniteltua sektiota edeltävään päivään asti. Jos aikaisemmat tutkimukset, mikäli sellaisia on tehty, eivät osoita merkittävää ennen implantaatiota tapahtuvan alkionmenetyksen mahdollisuutta, ainetta voidaan antaa koko tiineyden ajan parittelusta eläimen suunniteltua lopettamista edeltävään päivään. Eläimen virheellinen käsittely tai tiineyden aikainen stressi voivat johtaa sikiön menetykseen. Jotta sikiön menetys muista kuin testiin liittyvistä syistä estettäisiin, tiineiden eläinten tarpeetonta käsittelyä sekä ulkoisten tekijöiden kuten melun aiheuttamaa stressiä tulee välttää.

Testissä tulee käyttää vähintään kolmea annostasoa ja testin kanssa samaan aikaan tehtäviä kontrolleja. Terveet eläimet jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmään. Annostasojen välit määritetään siten, että toksiset vaikutukset saadaan porrastettua. Jos testiaineen fysikaalinen/kemiallinen olomuoto tai biologiset ominaisuudet eivät aseta rajoituksia, suurin annos määritetään sellaiseksi, että se on jonkin verran myrkyllinen kehittyvälle sikiölle ja/tai emolle (kliinisiä löydöksiä tai ruumiinpainon väheneminen), mutta ei aiheuta kuolemaa tai kovia tuskia. Ainakin yksi suurimman ja pienimmän välillä oleva annostaso asetetaan sellaiseksi, että se aiheuttaa erittäin pienen havaittavan myrkyllisyysvaikutuksen. Pienin annos asetetaan sellaiseksi, että sillä ei ole mitään myrkyllisyysvaikutuksia kehittyvään sikiöön tai emoon. Annostasot on porrastettava siten, että tutkimuksessa saadaan esiin mahdolliset annostasoihin liittyvät reaktiot sekä haitaton altistustaso (NOAEL). Kaksinkertaiset–nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi yli 10-kertaisia annosvälejä). Vaikka tavoitteena onkin määrittää emon haitaton altistustaso, hyväksyttäviä voivat olla myös tutkimukset, joissa tällaista tasoa ei määritetä (1).

Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon aikaisemmat myrkyllisyystiedot sekä tiedot testiaineen tai muiden sen kanssa samantyyppisten materiaalien metaboloitumisesta elimistössä samoin kuin niiden toksikokineettisistä ominaisuuksista. Nämä tiedot auttavat myös osoittamaan, että annostasot on valittu oikein.

Testissä on käytettävä samanaikaista kontrolliryhmää. Sen tulee olla joko plaseboa saava kontrolliryhmä tai kantaja-ainetta saava kontrolliryhmä, mikäli testiaineen antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Kaikille ryhmille annetaan tilavuudeltaan sama määrä joko testi- tai kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän tai -ryhmien eläimiä tulee käsitellä samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä. Kantaja-aineen kontrolliryhmille tulee antaa suurin käytetty määrä kantaja-ainetta (kuten alimmassa testiryhmässä).

▼B

1.6.4 **Raja-annostesti**

Jos jokin testin annostaso, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokilo)/vrk ja joka annetaan suun kautta tässä testimenetelmässä kuvattujen menettelyjen mukaisesti, ei aiheuta lainkaan havaittavaa myrkyllisyysvaikututusta tiineissä eläimissä tai niiden jälkeläisissä ja jos myrkyllisyysvaikutusta ei aikaisempien tutkimustulosten perusteella ole odotettavissa (esimerkiksi rakenteellisesti ja/tai metabolisesti samantyyppiset yhdisteet), täydellinen kolmea annostasoa käyttävä testi ei välttämättä ole tarpeen. Jos odotettavissa on ihmisten altistuminen aineelle, voi olla tarpeen käyttää raja-annostestissä suurempaa annostasoa, kun aine annetaan suun kautta. Muita antotapoja kuten inhalaatiota tai ihoapplikaatiota käytettäessä testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet saattavat usein osoittaa altistuksen enimmäistason (esimerkiksi ihoapplikaatio ei saa aiheuttaa vakavaa paikallista myrkyllisyysvaikutusta).

1.6.5 **Antotapa**

Testiaine tai kantaja-aine annetaan yleensä suun kautta letkulla. Jos käytetään muuta antotapaa, testin tekijän on perusteltava sen käyttö ja muutettava muita kohtia vastaavasti (2) (3) (4). Testiaine annetaan päivittäin suunnilleen samaan aikaan.

Kunkin eläinyksilön annoksen tulee yleensä perustua viimeiseen eläimen ruumiin painon määritykseen. Annoskoon määrittämisessä on kuitenkin oltava erityisen huolellinen viimeisen tiineyskolmanneksen aikana. Aikaisempien tutkimustietojen perusteella on valittava sellainen annoskoko, joka ei aiheuta liikaa myrkyllisyysvaikutuksia emolle. Jos kuitenkin havaitaan liian suuria myrkyllisyysvaikutuksia testiainetta saaneissa emoissa, nämä eläimet on lopetettava inhimillisellä tavalla. Jos useissa tiineissä eläimissä havaitaan liian suuren myrkyllisyysvaikutuksen merkkejä, on syytä harkita koko kyseisen annostasoryhmän lopettamista. Letkuruokinnassa aine on annettava eläimelle yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Nestemäärän tilavuus ei saa ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Kun kantaja-aineena on maissiöljy, tilavuus ei saa olla suurempi kuin 0,4 ml/100 g painoa. Testiaineen nestemäärän tilavuusvaihtelu tulee minimoida pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla voidaan käyttää tilavuudeltaan samaa nestemäärää.

1.6.6 **Emojen havainnointi**

Kliinisiä havaintoja tulee tehdä ja kirjata ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten kliinisestä tilasta kirjataan kuolleisuus, kuoleman lähestyminen, testiin liittyvät käytösmuutokset ja kaikki ilmeisten myrkyllisyysvaikutusten merkit.

1.6.7 **Eläimen paino ja ravinnon nauttiminen**

Eläimet punnitaan tiineyden päivänä 0 (tai viimeistään päivänä 3, jos käytetään ulkopuolisen kasvattajan toimittamia aikaparitettuja eläimiä), ensimmäisen annoksen antopäivänä, vähintään joka kolmas päivä annosten antamisjaksolla sekä eläinten suunniteltuna lopettamispäivänä.

▼B

Ravinnonotto kirjataan kolmen päivän välein ruumiinpainon määrityspäivinä.

1.6.8 **Post mortem -tutkimus**

Naaraat lopetetaan päivää ennen odotettua synnytyspäivää. Naaraat, joissa havaitaan tiineyden keskeytymisen tai ennenaikaisen synnytyksen merkkejä ennen suunniteltua lopetuspäivää, on lopetettava, ja niille on tehtävä perusteellinen makroskooppinen tutkimus.

Kun naaras lopetetaan tai kun se kuolee testin aikana, siitä on makroskooppisesti tutkittava mahdolliset rakenteelliset epämuodostumat tai patologiset muutokset. Systemaattisen virheen minimoimiseksi naaraiden arviointi sektion aikana ja sitä seuraavat sikiöanalyysit tulisi tehdä tietämättä, mihin ryhmään kyseinen naaras kuuluu.

1.6.9 **Kohdunsisällön tutkiminen**

Välittömästi eläimen lopettamisen jälkeen tai mahdollisimman pian kuoleman jälkeen kohtu poistetaan ja tiineys varmistetaan. Kohdut, joissa ei ole näkyviä tiineyden merkkejä, on tutkittava tarkemmin (jyrsijät esimerkiksi ammoniumsulfidivärjäyksellä ja kaniinit Salewski-värjäyksellä tai vastaavalla menetelmällä) asian varmistamiseksi (5).

Tiineiden eläinten kohdut punnitaan, mukaan lukien kohdunkaula. Jos eläimet ovat kuolleet testin aikana, kohtuja ei punnita.

Tiineiden eläinten keltarauhasten määrä määritetään.

Kuolleiden alkioiden tai sikiöiden määrä sekä elinkelpoisten sikiöiden määrä määritetään kohdunsisältöä tutkimalla. Resorptioaste kuvataan, jotta voidaan arvioida conceptuksen suhteellinen kuolinaika (katso kohta 1.2).

1.6.10 **Sikiöiden tutkiminen**

Kunkin sikiön sukupuoli ja ruumiinpaino määritetään.

Kustakin sikiöstä tutkitaan ulkoiset muutokset (6).

Sikiöistä tutkitaan luuston ja pehmytkudosten muutokset (esimerkiksi vaihtelut ja epämuodostumat) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Sikiömuutosten luokittelu on suositeltavaa, mutta ei pakollista. Jos luokitus tehdään, on kunkin luokan määrityskriteerit esitettävä selvästi. Erityistä huomiota on kiinnitettävä lisääntymiselimiin, joista tutkitaan poikkeavan kehityksen merkit.

Kustakin jyrsijäpoikueesta noin puolet preparoidaan luustomuutosten tutkimista varten ja tutkitaan. Toinen puoli preparoidaan pehmytkudosmuutosten tutkimista varten ja tutkitaan käyttäen hyväksyttyjä tai soveltuvia mikrotomiamenetelmiä tai huolellista dissektiomenetelmää.

▼B

Muiden eläinten kuin jyrsijöiden, esimerkiksi kaniinien, poikueista tutkitaan kaikilta sikiöiltä sekä pehmytkudos- että luustomuutokset. Näiden sikiöiden ruumiista tutkitaan pehmytkudosmuutokset huolellisen dissektion avulla. Tähän voi liittyä jatkotoimia sydämen sisäisten rakenteiden (25) arvioimiseksi. Puolelta näin tutkituista sikiöistä irrotetaan päät, joiden pehmytkudosmuutokset (muun muassa silmät, aivot, nenäontelot ja kieli) tutkitaan käyttäen tavanomaisia sarjaleikemenetelmiä (26) tai muita yhtä herkkiä menetelmiä. Näiden sikiöiden vartalo-osat sekä muut sikiöt, joita ei ole tutkittu, preparoidaan luustomuutosten tutkimista varten ja tutkitaan samoilla menetelmillä kuin jyrsijät.

2. MÄÄRITYSTULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tiedot raportoidaan erikseen kustakin emosta ja sen jälkeläisistä ja esitetään taulukossa, jossa on eritelty testiryhmittäin eläinten määrä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten määrä, kuoleman tai lopettamisen aika, tiineiden naaraiden määrä, niiden eläinten määrä, joissa myrkyllisyysvaikutuksia on havaittavissa, kuvaus havaituista myrkyllisyysvaikutuksista mukaan lukien myrkytysoireiden alkamisaika, kesto ja vakavuus, alkiosta tai sikiöstä tehtyjen havaintojen laji sekä kaikki asiaankuuluvat tiedot poikueesta.

Numeeriset tulokset arvioidaan sopivalla tilastollisella menetelmällä käyttäen poikuetta analyysin yksikkönä. Tilastollisen menetelmän on oltava yleisesti hyväksytty, se on valittava tutkimusta suunniteltaessa ja sen valinta on perusteltava. Myös sellaisten eläinten tiedot, jotka kuolevat ennen niiden suunniteltua lopettamista, on raportoitava. Nämä tiedot voidaan sisällyttää ryhmäkeskiarvoihin, mikäli se on perusteltua. Tällaisista eläimistä saatujen tietojen relevanssi ja niin muodoin näiden tietojen sisällyttäminen ryhmäkeskiarvoihin tai jättäminen niistä pois tulee perustella ja arvioida tapauskohtaisesti.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI

Syntymää edeltävien kehitysmyrkyllisyysvaikutusten testin löydökset arvioidaan tarkastelemalla havaittuja vaikutuksia. Arviointiin tulee sisältyä seuraavat tiedot:

— emon ja alkion/sikiön testitulokset sekä eläinten testiainealtistuksen ja toisaalta kaikkien löydösten esiintyvyyden ja vakavuuden välisen mahdollisen suhteen arvioiminen

— sikiön ulkoisten muutosten sekä pehmytkudos- ja luustomuutosten luokittelussa käytetyt kriteerit, jos luokittelua on käytetty

▼B

— soveltuvissa tapauksissa historiallinen kontrolliaineisto, joka tehostaa tutkimustulosten tulkintaa

— kaikkien prosenttiosuuksien tai indeksien laskennassa käytetyt luvut

— soveltuvissa tapauksissa tutkimustulosten asianmukainen tilastollinen analyysi, joka sisältää analyysimenetelmästä sellaiset tiedot, että riippumaton arvioija/tilastoasiantuntija voi niiden avulla arvioida ja rekonstruoida analyysin.

Jos kehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia ei voida osoittaa, on syytä harkita jatkoselvitystä, jossa määritetään absorptio ja testiaineen hyötyosuus.

2.3 TULOSTEN TULKINTA

Syntymää edeltävien myrkyllisyysvaikutusten tutkimuksen tulee antaa tietoja toistuvan tiineydenaikaisen testiainealtistuksen vaikutuksista emoihin sekä niiden jälkeläisten kohdunsisäiseen kehitykseen. Tutkimuksen tulokset on tulkittava yhdessä subkroonisten, lisääntymisfysiologisten, toksikokineettisten ja muiden tutkimusten kanssa. Koska tutkimuksessa painotetaan sekä yleisiä myrkyllisyysvaikutuksia (emoon kohdistuvat vaikutukset) että sikiön kehitykseen vaikuttavien myrkyllisyysvaikutusten loppupisteitä, tutkimustulosten perusteella voidaan jossain määrin erotella toisaalta ne sikiön kehitykseen kohdistuvat vaikutukset, jotka esiintyvät yleisten myrkyllisyysvaikutusten puuttuessa, sekä toisaalta ne vaikutukset, jotka esiintyvät vain sellaisilla annostasoilla, jotka ovat myrkyllisiä myös emolle (27).

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot mukaan lukien CAS-numero, jos tiedossa/käytössä

— puhtaus.

Kantaja-aine (tarvittaessa)

— jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

Koe-eläinlajit

— käytetty eläinlaji ja kanta

— eläinten lukumäärä ja ikä

— toimittaja, häkit, ravinto ja niin edelleen

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Testiolosuhteet:

— annostasojen valintaperusteet

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, testiaineen saavutettu pitoisuus, stabiilisuus ja tasalaatuisuus valmisteessa

▼B

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa

— ympäristöolosuhteet

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset:

Ainakin seuraavat tiedot emon vasteesta myrkylliseen aineeseen:

— eläinten määrä testin alussa, testin lopussa elossa olevien eläinten määrä, tiineiden eläinten määrä, niiden eläinten määrä, joiden tiineys keskeytyi, sekä ennenaikaisesti synnyttäneiden eläinten määrä

— kuolinpäivä testin aikana tai tieto eläimen selviämisestä suunniteltuun lopettamiseen asti

— ennen suunniteltua lopettamista kuolleiden eläinten tiedot kirjataan, mutta niitä ei oteta mukaan ryhmien väliseen tilastolliseen vertailuun

— jokaisen poikkeavan kliinisen löydöksen havaintopäivä ja sen jatkokehitys

— ruumiinpaino, painon muutos ja tiineen eläimen kohdun paino; haluttaessa myös ruumiinpainon muutos korjattuna kohdun painolla

— ravinnonotto sekä nautitun veden määrä, mikäli se on mitattu

— ruumiinavauslöydökset, mukaan lukien kohdun paino

— haitattoman annostason arvot emolle ja kehittyvälle sikiölle.

Kehitykseen liittyvät loppupisteet annostasoittain poikueille, joissa on implantaatioita, mukaan lukien seuraavat tiedot:

— keltarauhasten määrä

— implantaatioiden määrä, elävien ja kuolleiden sikiöiden sekä resorptiotapausten määrä ja prosenttiosuus

— ennen ja jälkeen implantaation tapahtuneiden tiineyden keskeytymisten määrä ja prosenttiosuus.

Kehitykseen liittyvät loppupisteet annostasoittain poikueille, joissa on eläviä sikiöitä, mukaan lukien seuraavat tiedot:

— elävien poikasten määrä ja prosenttiosuus

— sukupuolten välinen suhde

— sikiön ruumiinpaino, mielellään sekä sukupuolen mukaan että molemmille sukupuolille

— ulkoiset epämuodostumat, pehmytkudosten ja luuston epämuodostumat ja muut merkittävät muutokset

— luokittelukriteerit tarvittaessa

▼B

— niiden sikiöiden ja poikueiden kokonais- ja prosenttimäärä, joilla on ulkoisia muutoksia tai pehmytkudosten tai luuston muutoksia, sekä yksittäisten epämuodostumien ja muutosten laji ja esiintyvyys.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **LÄHDELUETTELO**

(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 Toxicologv* 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 Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381–391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229–242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291–306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; :398–408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309–316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169–181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163–173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411–445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61–63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313–355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181–188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251–277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233–239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37–38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126–144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249–292.

▼M4

B.32 **KARSINOGEENISUUSTUTKIMUKSET**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 451 (2009). Alkuperäinen karsinogeenisuustestejä koskeva testiohje nro 451 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.32 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (2) (3) (4) (5) (6). Tämän testimenetelmän B.32 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.30 (Krooninen myrkyllisyystesti) ja luvun B.33 (Yhdistetty krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuustesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä B.32 on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa. Todettakoon kuitenkin, että jotkin yksityiskohdat ja vaatimukset saattavat erota lääkkeitä koskevista vaatimuksista (katso kansainvälisen harmonisointikonferenssin (ICH:n) ohje S1B lääkkeiden karsinogeenisuuden testauksesta).

2. Koska valtaosa karsinogeenisuustesteistä tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos tällaisia tutkimuksia on tehtävä muilla kuin jyrsijöillä, on noudatettava tässä testimenetelmässä esitettyjä sekä tässä liitteessä olevan luvun B.27 (Toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) mukaisia periaatteita ja menettelyjä asianmukaisin muutoksin. Lisää ohjeita on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

3. Karsinogeenisuustutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistusreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistustapa karsinogeenisuustutkimuksissa. Vaikka karsinogeenisuustutkimukset, joihin sisältyy ihon tai hengitysteiden kautta altistus, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta altistuksesta aiheutuvan karsinogeenisuuden määrittämiseen ja arviointiin, voi olla pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja jne. koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta ihon (7) ja hengitysteiden (7) (8) kautta. Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa (8), joka koskee altistusta hengitysteiden kautta. Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (11).

▼M4

5. Karsinogeenisuustutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvasta altistuksesta todennäköisesti seuraa ja jotka kestävät jopa käytettyjen lajien koko eliniän ajan. Tutkimuksesta saadaan tietoa testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista ja mahdollisesta karsinogeenisuudesta, ja sen avulla saatetaan tunnistaa kohde-elimet ja kemikaalin mahdollinen kertyminen. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Ei-genotoksisten karsinogeenien osalta voidaan määrittää kasvainvasteet, joita voidaan käyttää laadittaessa turvallisuuskriteereitä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien karsinogeenisuustutkimusten tavoitteet ovat seuraavat:

— Testikemikaalin sellaisten karsinogeenisten ominaisuuksien tunnistaminen, jotka lisäävät kasvainten ilmaantuvuutta tai pahanlaatuisten kasvainten määrää tai vähentävät kasvainten syntymiseen kuluvaa aikaa verrattuna samanaikaisiin vertailuryhmiin.

— Karsinogeenisuuden kohde-elimen (-elinten) tunnistaminen.

— Kasvainten ilmaantumiseen kuluvan ajan määrittäminen

— Kasvaimen annos-vastesuhteen luonnehtiminen.

— NOAEL-arvon (tason, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta.

— Karsinogeenisten vaikutusten ekstrapolointi ihmisten altistumistasoihin pienillä annoksilla.

— Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin karsinogeenisia ominaisuuksia, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että mahdollista karsinogeenisuutta voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Epäillyn karsinogeenin vaikutustapaa koskevat tiedot ja niiden ottaminen huomioon (2) (7) (12) (13) (14) (15) on erittäin tärkeää, koska paras tutkimusmenetelmä voi vaihdella sen mukaan, tiedetäänkö vai epäilläänkö testikemikaalin olevan genotoksinen karsinogeeni. Lisätietoa vaikutustapaa koskevista huomioista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

8. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien ja genotoksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot, mutageenisuus/genotoksisuustiedot, karsinogeenisuustiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Karsinogeenisuus on määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu

▼M4

alustavia tietoja toistetuilla annoksilla suoritetuista 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä. Lyhytaikaiset testit, joissa tutkitaan syövän puhkeamista ja etenemistä, voivat antaa myös hyödyllistä tietoa. Karsinogeenisuustestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (16) (17) (18) (19).

9. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. On pohdittava sitä, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus, kumulatiivisten kasvainriskien analyysi suhteessa eloonjäämisen pituuteen, kasvaimen ilmaantumiseen kuluvaa aikaa koskeva analyysi sekä analyysi, joka on tehtävä, jos testi keskeytyy yhdessä tai useammassa ryhmässä ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia (20).

10. Karsinogeenisuustutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa nro 19 (turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) (21) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: ”Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta.”

11. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (22) (23). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on oleellista varsinkin tilanteessa, kun on määrä toteuttaa yhdistetty kroonista myrkyllisyyttä ja karsinogeenisuutta koskeva tutkimus (tämän liitteen luku B.33) (12 kohta).

12. Erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämän liitteen luku B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta on harkittava yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.33) toteuttamista. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus (tämän liitteen luku B.33), on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (11 ja 22–25 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia.

▼M4

13. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

TESTIN PERIAATE

14. Testikemikaalia annostellaan päivittäin erisuuruisina annoksina useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta yleensä suun kautta. Testaus voi olla tarkoituksenmukaista myös hengitysteiden tai ihon kautta. Eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyyden merkkien ja neoplastisten leesioiden kehittymisen havaitsemiseksi. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

15. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän karsinogeenisuuden määrittämistä ja arviointia (katso 2 kohta). Muiden lajien kuin jyrsijöiden käyttöä voidaan harkita, kun saatavilla olevat tiedot viittaavat siihen, että muut lajit ovat oleellisempia ihmisten terveyteen kohdistuvien vaikutusten ennustamisessa. Lajin valinta on perusteltava. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiiriä, voidaan käyttää. Vaikka hiiren käyttämisestä karsinogeenisuustestauksessa koituva hyöty voi olla rajallinen (24) (25) (26), jotkin sääntelyohjelmat edellyttävät karsinogeenisuustestien tekemistä hiirellä, ellei päätetä, että tällainen tutkimus on tieteellisesti tarpeeton. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa nro 116 (7).

16. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Karsinogeenisuustutkimus on tehtävä mieluiten eläimillä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin lyhyemmissä alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa. Jos kyseisestä kannasta ja lähteestä peräisin olevien eläinten kuitenkin tiedetään aiheuttavan ongelmia pitkäaikaisissa tutkimuksissa yleensä käytettävien hyväksyttyjen eloonjäämiskriteerien täyttämisessä [katso ohjeasiakirja GD 116 (7)], on harkittava sellaisen eläinkannan käyttämistä, jonka eloonjäämisaste pitkäaikaisessa tutkimuksessa on hyväksyttävä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (27) (28) (29). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien määrän

▼M4

on oltava mahdollisimman pieni. Kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on annettava analyyttista tietoa tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

18. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen. Eläimet tulee jakaa verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

19. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Sen vuoksi jokaisessa annosryhmässä ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä on oltava vähintään 50 eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, mikä on tutkimuksen tavoite, keskeisten estimaattien tilastollista voimaa on mahdollista lisätä jakamalla eläimet eri annosryhmiin eri tavoin epätasaisesti siten, että pienen annoksen ryhmissä on yli 50 eläintä esimerkiksi sen vuoksi, että voidaan arvioida kemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta pienillä annoksilla. On kuitenkin muistettava, että jos ryhmäkokoa kasvatetaan vain jonkin verran, tutkimuksen tilastollinen voima lisääntyy suhteellisen vähän. Lisätietoa tutkimuksen tilastollisesta suunnittelusta ja annostasojen valinnasta tilastollisen voiman maksimoimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

20. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen esimerkiksi 12 kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa neoplastisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Jos tutkimussuunnitelmaan sisältyy kesken tutkimuksen tapahtuvia lopettamisia, kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten määrä jokaisessa annosryhmässä on yleensä 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimussuunnitelman mukaista eläinten kokonaismäärää on lisättävä ennen tutkimuksen päättymistä lopetettavaksi aiottujen eläinten määrällä. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (30). Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

▼M4

Annosryhmät ja annostus

21. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja yhtä samanaikaista verrokkiryhmää. Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

22. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohde-elimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimystä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Kun otetaan huomioon jäljempänä 23 kohdassa esitetyt tekijät, suurin annos on yleensä valittava siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla). Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon.

23. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja – testikemikaalin vaikutustavan mukaan – NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi BMD-arvo (katso 25 kohta) pienimmän annoksen tasolla) saavuttamisen perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle.

24. Valittu annostason porrastus määräytyy testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

25. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (7) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

▼M4

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ihmisten ennakoituja altistumistasoja koskeva pohdinta.

26. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

27. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

28. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

29. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

▼M4

30. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä viikossa), jyrsijöillä yleensä 24 kuukauden ajan (katso myös 32 kohta). Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen B.9 luvussa (11) on täsmennetty, vähintään 24 kuukauden ajan. Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakso on yleensä 24 kuukautta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (9).

31. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (31). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

32. Jyrsijöiden osalta tutkimus kestää yleensä 24 kuukautta, mikä on valtaosa käytettävien eläinten normaalista elinajasta. Tutkimus voi olla tätä pidempi tai lyhyempi sen mukaan, mikä on tutkimuksessa käytettävän eläinlajin kannan elinaika, mutta tämä on kuitenkin perusteltava. Tietyille hiirikannoille, joita ovat esimerkiksi AKR/J, C3H/J tai C57BL/6J, 18 kuukauden mittainen tutkimus voi olla sopivampi. Ohjeita tutkimuksen kestosta, päättymisestä ja tutkimuksessa havaitun eloonjäämisen käsittelemisestä sekä lisäohjeita negatiivisen karsinogeenisuuden hyväksyttävyydestä suhteessa tutkimuksessa ilmenneeseen eloonjäämiseen on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

— Tutkimuksen lopettamista on harkittava, kun eloonjääneiden eläinten määrä pienemmän annoksen ryhmissä tai verrokkiryhmässä on pienempi kuin 25 prosenttia.

— Jos vain suuren annoksen ryhmä kuolee ennenaikaisesti myrkyllisyyden vuoksi, tutkimusta ei tule lopettaa.

— Eloonjäämistä on käsiteltävä kummankin sukupuolen osalta erikseen.

— Tutkimusta ei tule jatkaa sen jälkeen, kun tutkimuksesta saatavat tiedot eivät enää riitä tilastollisesti validin arvioinnin tekemiseen.

▼M4

HAVAINNOT

33. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä jokaisen päivän aamulla ja illalla myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Lisäksi eläimet on tutkittava kerran päivässä toksikologisesti merkityksellisten erityisten merkkien havaitsemiseksi. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä kasvainten kehittymiseen. Jokaisen paljain silmin tai käsin tunnustelemalla havaittavissa olevan kasvaimen toteamisaika, paikka, koko, ulkonäkö ja kehitys on kirjattava.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

34. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

Hematologia, kliininen biokemia ja muut mittaukset

35. Jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa erityisesti vaikutustapaa koskevia pohdintoja varten, eläimiltä voidaan ottaa tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä varten. Myös virtsa-analyysi voi olla tarpeen. Lisätietoa tällaisten näytteiden ottamisen hyödyllisyydestä osana karsinogeenisuustutkimusta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Tarvittaessa verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä ja virtsa-analyysia varten voidaan ottaa kesken tutkimuksen tapahtuvien lopetusten yhteydessä (20 kohta) ja tutkimuksen päättyessä vähintään 10 eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa, ja niitä on tarvittaessa säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa. Verinäytteet voidaan valmistella myös tutkimusta varten etenkin, jos kohde-elin vaikuttaa olevan luuydin, joskin tällaisen tutkimuksen arvoa mahdollisen karsinogeenisuuden/onkogeenisuuden arvioinnissa on pidetty kyseenalaisena (32).

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

36. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille paitsi erityisvalvonnassa oleville eläimille (katso 20 kohta) on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella. Yleensä elinten painot eivät kuulu karsinogeenisuutta käsittelevään tutkimukseen, koska geriatriset muutokset ja myöhemmissä vaiheissa kasvainten kehittyminen mitätöivät elinten painoa koskevien tietojen käyttökelpoisuuden. Nämä tiedot voivat kuitenkin olla erittäin tärkeitä näyttöön perustuvan arvioinnin toteuttamisessa ja etenkin vaikutustapaa koskevissa pohdinnoissa. Jos ne ovat osa satelliittitutkimusta, ne on kerättävä viimeistään vuoden kuluttua tutkimuksen aloittamisesta.

▼**M4**

37. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (33) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös elimet, joita pidetään testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköisinä kohde-eliminä, on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengitysteiden kautta altistumista koskevien tutkimusten yhteydessä hengityselimistön säilytettävien ja tutkittavien kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen luvussa B.8 (8) ja luvussa B.29 (9) annettuja suosituksia. Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

▼M4

Histopatologia

38. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (33). Vähintään seuraavat kudokset on tutkittava:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— Jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä histopatologisia muutoksia, samat kudokset on tutkittava kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä.

— Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

39. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni toksisia vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

40. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

41. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (9 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

Testiraportti

42. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

▼**M4**

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen)

Yleiset tiedot

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat, jos ne on tehty, sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksikokineettiset tiedot (jos saatavilla)

— silmätutkimuksen tiedot (jos saatavilla)

— hematologiset tiedot (jos saatavilla)

— kliinis-biokemialliset tiedot (jos saatavilla).

▼M4

Kliiniset löydökset

— myrkyllisyyden merkit

— kaikkien poikkeavuuksien ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos pisteytetty)

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta).

Ruumiinavaustiedot

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset, poikkeavuuksien ilmaantuvuus ja vaikeusaste.

Histopatologia

— muut kuin neoplastiset histopatologiset löydökset

— neoplastiset histopatologiset löydökset

— makroskooppisten ja mikroskooppisten löydösten välinen korrelaatio

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista käsittelyyn liittyvistä histopatologisista löydöksistä sekä niiden vaikeusaste

— raportti objektilasien vertaisarvioinnista.

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— annos-vastesuhteet

— aiemmat vertailutiedot

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

▼M4

6) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä)

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.8 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus).

10) Tämän liitteen luku B.29 Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus.

11) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet)).

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF&Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. S. 279–284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196–1203.

27) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198–201.

33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

B. 33 **YHDISTETTY KROONINEN MYRKYLLISYYS-/KARSINOGEENISUUSTUTKIMUS**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 453 (2009). Alkuperäinen testiohje nro 453 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.33 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (1) (2) (3) (4) (5). Tämän testimenetelmän B.33 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.32 (Karsinogeenisuustesti) ja luvun B.30 (Krooninen myrkyllisyystesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa. Todettakoon kuitenkin, että jotkin yksityiskohdat ja vaatimukset saattavat erota lääkkeitä koskevista vaatimuksista [katso kansainvälisen harmonisointikonferenssin (ICH:n) ohje S1B lääkkeiden karsinogeenisuuden testauksesta].

2. Koska valtaosa kroonisista myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksista tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos näitä tutkimuksia on tehtävä muilla lajeilla kuin jyrsijöillä, tässä testimenetelmässä kuvattujen periaatteiden ja menetelmien lisäksi voidaan soveltaa myös tässä liitteessä olevassa luvussa B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) kuvattuja periaatteita ja menetelmiä asianmukaisin muutoksin, kuten OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (Kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelu ja toteutus) (7) on määritelty.

3. Kroonisissa myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistusreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistusreitti kroonisissa myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksissa. Vaikka pitkäaikaiset tutkimukset, joihin sisältyy ihon tai hengitysteiden kautta altistus, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta altistuksesta aiheutuvan kroonisen myrkyllisyyden tai karsinogeenisuuden määrittämiseen ja arviointiin, voi olla pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja jne. koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta hengitysteiden (7) (8) ja ihon (7) kautta. Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa, joka koskee akuuttia testausta hengitysteiden kautta (7). Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (11).

▼M4

5. Yhdistetystä myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvasta altistuksesta todennäköisesti seuraa ja jotka kestävät jopa käytettyjen lajien koko eliniän ajan. Tutkimuksesta saadaan tietoa testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista ja mahdollisesta karsinogeenisuudesta, ja sen avulla voidaan tunnistaa kohde-elimet ja kemikaalin mahdollinen kertyminen. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Ei-genotoksisten karsinogeenien osalta voidaan määrittää kasvainvasteet, joita voidaan käyttää laadittaessa turvallisuuskriteereitä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien kroonisten myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimusten tavoitteet ovat seuraavat:

— Testikemikaalin sellaisten karsinogeenisten ominaisuuksien tunnistaminen, jotka lisäävät kasvainten ilmaantuvuutta tai pahanlaatuisten kasvainten määrää tai vähentävät kasvainten syntymiseen kuluvaa aikaa verrattuna samanaikaisiin verrokkiryhmiin.

— Kasvainten ilmaantumiseen kuluvan ajan määrittäminen

— Testikemikaalin kroonisen myrkyllisyyden määrittäminen

— Kroonisen myrkyllisyyden ja karsinogeenisuuden kohde-elimen (-elinten) tunnistaminen

— Annos-vastesuhteen luonnehdinta

— NOAEL-arvon (tason, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta

— Karsinogeenisten vaikutusten ekstrapolointi ihmisten altistumistasoihin pienillä annoksilla

— Kroonisten myrkyllisyysvaikutusten ennustaminen ihmisten altistumistasoilla

— Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta ja kroonista myrkyllisyyttä, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että kemikaalin toksikologisia ominaisuuksia voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Epäillyn karsinogeenin vaikutustapaa koskevat tiedot ja niiden ottaminen huomioon (2) (7) (12) (13) (14) (15) on erittäin tärkeää, koska paras tutkimusmenetelmä voi vaihdella sen mukaan, tiedetäänkö vai epäilläänkö testikemikaalin olevan genotoksinen karsinogeeni. Lisätietoa vaikutustapaa koskevista huomioista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

8. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tiedot vaikutustavasta, *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien ja genotoksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot, mutageenisuus/genotoksisuustiedot, karsinogeenisuustiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuus on määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu alustavia tietoja toistetuilla

▼M4

annoksilla suoritetuista 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä. Lyhytaikaiset testit, joissa tutkitaan syövän puhkeamista ja etenemistä, voivat antaa myös hyödyllistä tietoa. Karsinogeenisuustestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (16) (17) (18) (19).

9. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. On pohdittava sitä, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus, kumulatiivisten kasvainriskien analyysi suhteessa eloonjäämisen pituuteen, kasvaimen ilmaantumiseen kuluvaa aikaa koskeva analyysi sekä analyysi, joka on tehtävä, jos testi keskeytyy yhdessä tai useammassa ryhmässä ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia (20).

10. Karsinogeenisuustutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa (Turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) (21) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: ”Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta.”

11. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (22) (23). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on erityisen tärkeää yhdistetyssä kroonisessa myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksessa.

12. Tällaisen yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen toteuttamista on harkittava erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämän liitteen luku B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus, on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (11 ja 22–26 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia. Lisäohjeita yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen suunnittelusta tutkimuksen tehokkuuden maksimoimiseksi siltä kannalta, että eläinten määrää voidaan mahdollisesti vähentää ja että erilaisia koemenetelmiä voidaan yhtenäistää, on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

▼M4

13. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

TESTIN PERIAATE

14. Tutkimusmenetelmä koostuu kahdesta rinnakkaisesta vaiheesta, jotka ovat krooninen vaihe ja karsinogeenisuusvaihe (vaiheiden kesto: katso 34 ja 35 kohta). Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta, mutta myös hengitysteiden tai ihon kautta testaus voi olla asianmukaista. Kroonisessa vaiheessa testikemikaalia annetaan päivittäin erisuuruisina annoksina useille koe-eläinryhmille yleensä 12 kuukauden ajan, joskin on mahdollista valita tätä pidempi tai lyhyempi aika sääntelyvaatimusten mukaisesti (katso 34 kohta). Tämän pituisen ajan katsotaan olevan riittävän pitkä, jotta mahdolliset kumulatiivisen myrkyllisyyden vaikutukset tulevat esiin ilman geriatristen muutosten häiritseviä vaikutuksia. Tutkimussuunnitelmaan voi myös sisältyä yksi tai useampi eläinten lopettamiskerta kesken kokeen esimerkiksi kolmen ja kuuden kuukauden kohdalla, ja tutkimukseen voidaan ottaa lisää eläinryhmiä tämän kompensoimiseksi (katso 20 kohta). Karsinogeenisuusvaiheessa testikemikaalia annetaan päivittäin useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta. Kummankin ryhmän eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyyden merkkien ja neoplastisten leesioiden kehittymisen havaitsemiseksi. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

15. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän kroonisen myrkyllisyyden ja karsinogeenisuuden määrittämistä ja arviointia (2 kohta). Muiden lajien kuin jyrsijöiden käyttöä voidaan harkita, kun saatavilla olevat tiedot viittaavat siihen, että muut lajit ovat oleellisempia ihmisten terveyteen kohdistuvien vaikutusten ennustamisessa. Lajin valinta on perusteltava. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiiriä, voidaan käyttää. Vaikka hiiren käyttämisestä karsinogeenisuustestauksessa koituva hyöty voi olla rajallinen (24) (25) (26), jotkin sääntelyohjelmat edellyttävät karsinogeenisuustestien tekemistä hiirellä, ellei päätetä, että tällainen tutkimus on tieteellisesti tarpeeton. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Tarvittaessa muilla lajeilla kuin jyrsijöillä tehtävät krooniset myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimukset on suunniteltava ja toteutettava tässä testimenetelmässä kuvattujen sekä tämän liitteen luvussa B.27 (Oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) kuvattujen periaatteiden mukaisesti. Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

16. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Yhdistetty myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimus on tehtävä mieluiten eläimillä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin lyhyemmissä alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa. Jos kyseisestä kannasta ja lähteestä peräisin olevien eläinten kuitenkin tiedetään aiheuttavan ongelmia pitkäaikaisissa tutkimuksissa yleensä käytettävien hyväksyttyjen eloonjäämiskriteerien täyttämisessä [katso ohjeasiakirja GD 116 (7)], on harkittava sellaisen eläinkannan käyttämistä, jonka eloonjäämisaste pitkäaikaisessa tutkimuksessa on hyväksyttävä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

▼M4

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (27) (28) (29). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien määrän on oltava mahdollisimman pieni. Kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on annettava analyyttista tietoa tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

18. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen. Eläimet tulee jakaa verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

19. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Jyrsijöiden osalta jokaisessa annosryhmässä (22 kohdassa määritetyn mukaisesti) ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä, jotka on tarkoitettu tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheeseen, on oltava vähintään 50 eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, mikä on tutkimuksen tavoite, keskeisten estimaattien tilastollista voimaa on mahdollista lisätä jakamalla eläimet eri annosryhmiin eri tavoin epätasaisesti siten, että pienen annoksen ryhmissä on yli 50 eläintä, jolloin voidaan esimerkiksi arvioida kemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta pienillä annoksilla. On kuitenkin muistettava, että jos ryhmäkokoa kasvatetaan vain jonkin verran, tutkimuksen tilastollinen voima lisääntyy suhteellisen vähän. Jyrsijöiden osalta jokaisessa annosryhmässä (22 kohdassa määritetyn mukaisesti) ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä, jotka on tarkoitettu tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheeseen, on oltava vähintään 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. On huomattava, että tämä määrä on pienempi kuin kroonisessa myrkyllisyystutkimuksessa (tämän liitteen luku B.30). Vaikka tämän yhdistetyn tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa on vähemmän eläimiä jokaisessa ryhmässä, niistä saatujen

▼M4

tietojen tulkintaa tukevat kuitenkin tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheesta saadut tiedot, jotka on saatu käyttämällä enemmän eläimiä. Tutkimuksissa, joissa käytetään hiiriä, saatetaan tarvita lisää eläimiä kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa kussakin annosryhmässä, jotta kaikki vaadittavat hematologiset määritykset saadaan tehtyä. Lisätietoa tutkimuksen tilastollisesta suunnittelusta ja annostasojen valinnasta tilastollisen voiman maksimoimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

20. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen esimerkiksi kuuden kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa neoplastisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa, joka kestää yleensä 12 kuukautta, käytetyistä eläimistä saadaan tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheeseen tietoa kesken tutkimuksen lopetetuista eläimistä, jolloin käytettyjen eläinten kokonaismäärä siis pienenee. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheeseen voidaan sisällyttää myös satelliittiryhmiä, jotta tutkittavana olevan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta voidaan seurata. Nämä ryhmät voidaan rajata tutkimuksen suurimpaan annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (30). Lisätietoja siitä, miten tutkimussuunnitelmaan sisällytetään tutkimuksen aikana tapahtuvia lopettamisia, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä samalla, kun käytettävien eläinten kokonaismäärää pienennetään, on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

21. Jos tutkimussuunnitelmaan sisältyy kesken tutkimuksen tapahtuvia lopettamisia, kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten määrä jokaisessa annosryhmässä on yleensä 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimussuunnitelman mukaista eläinten kokonaismäärää on lisättävä ennen tutkimuksen päättymistä lopetettavaksi aiottujen eläinten määrällä. Näitä eläimiä on yleensä tarkkailtava samalla tavalla kuin päätutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa käytettäviä eläimiä: niiden ruumiinpainoa ja ravinnon-/vedenkulutusta on seurattava, ja hematologiset ja kliinisen biokemian mittaukset sekä patologiset tutkimukset on tehtävä, joskin mittaukset voidaan rajata (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmissä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen.

Annosryhmät ja annostus

22. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Vähintään kolmea annostasoa ja samanaikaista verrokkiryhmää on käytettävä sekä kroonista myrkyllisyyttä että karsinogeenisuutta tarkastelevissa vaiheissa. Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

▼M4

23. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa täydellinen kolmea annostasoa soveltava tutkimus ei välttämättä ole tarpeen, jos voidaan ennustaa, että yksi annostaso, joka vastaa vähintään 1 000 mg:n annosta painokiloa kohti päivässä, ei todennäköisesti aiheuta haitallisia vaikutuksia. Tämän tulee perustua alustavista tutkimuksista saatuihin tietoihin ja siihen huomioon, ettei myrkyllisyyttä ole odotettavissa rakenteellisesti samanlaisia kemikaaleja koskevien tietojen perusteella. Tätä rajaa (1 000 mg painokiloa kohti päivässä) sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

24. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohde-elimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimystä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Suurin annos on valittava yleensä siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla). Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon.

25. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja – testikemikaalin vaikutustavan mukaan – NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi BMD-arvo (katso 25 kohta) pienimmän annoksen tasolla) saavuttamisen perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle. Kun toteutetaan yhdistetty karsinogeenisuutta / kroonista myrkyllisyyttä käsittelevä tutkimus, ensisijainen tavoite on hankkia tietoa karsinogeenisuudesta riskinarviointitarkoituksiin. Kroonista myrkyllisyyttä koskevien tietojen hankinta on useimmiten toissijainen tavoite. Tämä on syytä muistaa, kun valitaan tutkimuksen annostasoja ja niiden porrastusta.

26. Valittu annostason porrastus määräytyy tutkimuksen tavoitteiden ja testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

27. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (7) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

▼M4

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ennakoidut ihmisten altistumistasot etenkin keskisuuria ja pieniä annoksia valittaessa

28. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

29. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

30. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

31. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

▼M4

32. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä joka viikko) 12 kuukauden ajan (krooninen vaihe) tai 24 kuukauden ajan (karsinogeenisuusvaihe), katso myös 33 ja 34 kohta. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen luvussa B.9 (11) on täsmennetty, 12 kuukauden ajan (krooninen vaihe) tai 24 kuukauden ajan (karsinogeenisuusvaihe). Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakson pituus on yleensä 12 kuukautta (krooninen vaihe) tai 24 kuukautta (karsinogeenisuusvaihe). Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (9).

33. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (31). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

34. Tämän tutkimuksen annostelujakso ja krooninen vaihe kestävät yleensä 12 kuukautta, mutta tutkimussuunnitelman mukaan testimenetelmää on mahdollista soveltaa joko lyhyempiin (esimerkiksi kuusi tai yhdeksän kuukautta) tai pitempiin (esimerkiksi 18 tai 24 kuukautta) tutkimuksiin tietyn lainsäädännön nojalla tai tiettyjen mekanististen tarkoitusten perusteella. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on tätä lyhyempi. Kaikki tähän vaiheeseen kohdennetut annosryhmät lopetetaan määrättynä ajankohtana kroonisen myrkyllisyyden ja ei-neoplastisten muutosten arvioimiseksi. Tutkimukseen sisältyville satelliittiryhmille, joiden avulla seurataan tutkittavan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta, ei saa antaa testikemikaalia vähintään neljään viikkoon eikä pidempään kuin kolmanneksen tutkimuksen kokonaiskestosta altistuksen päätyttyä.

35. Jyrsijöiden osalta tämän tutkimuksen karsinogeenisuusvaihe kestää yleensä 24 kuukautta, mikä on valtaosa käytettävien eläinten normaalista elinajasta. Tutkimus voi olla tätä pidempi tai lyhyempi sen mukaan, mikä on tutkimuksessa käytettävän eläinlajin kannan elinaika, mutta tämä on kuitenkin perusteltava. Tietyille hiirikannoille, joita ovat esimerkiksi AKR/J, C3H/J tai C57BL/6J, 18 kuukauden mittainen tutkimus voi olla sopivampi. Ohjeita tutkimuksen kestosta, päättymisestä ja tutkimuksessa havaitun eloonjäämisen käsittelemisestä sekä lisäohjeita negatiivisen karsinogeenisuuden hyväksyttävyydestä suhteessa tutkimuksessa ilmenneeseen eloonjäämiseen on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

▼M4

— Tutkimuksen lopettamista on harkittava, kun eloonjääneiden eläinten määrä pienemmän annoksen ryhmissä tai verrokkiryhmässä on pienempi kuin 25 prosenttia.

— Jos vain suuren annoksen ryhmä kuolee ennenaikaisesti myrkyllisyyden vuoksi, tutkimusta ei tule lopettaa.

— Eloonjäämistä on käsiteltävä kummankin sukupuolen osalta erikseen.

— Tutkimusta ei tule jatkaa sen jälkeen, kun tutkimuksesta saatavat tiedot eivät enää riitä tilastollisesti validin arvioinnin tekemiseen.

HAVAINNOT (KROONISEN MYRKYLLISYYDEN VAIHE)

36. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä aamuin illoin joka päivä myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Kliinisiä yleishavaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen.

37. Kaikista eläimistä on tehtävä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilanteeseen), tutkimuksen ensimmäisen viikon päätteeksi ja kerran kuukaudessa sen jälkeen. Havainnointi on toteutettava siten, että yksittäisten havainnoijien välinen vaihtelu on mahdollisimman pientä ja testiryhmästä riippumatonta. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella mieluiten vakioalueella samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. On pyrittävä varmistamaan, että havainnointiolosuhteissa on mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja ovat mm. ihon, karvapeitteen, silmien ja limakalvojen muutokset sekä sisäeritteiden, kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko ja epätavallinen hengitys) esiintyminen. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (32).

38. Kaikille eläimille on tehtävä silmätutkimus oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin ensimmäistä antokertaa. Tutkimuksen päätteeksi tämä tutkimus on tehtävä mieluiten kaikille eläimille, mutta vähintään suuren annoksen ryhmässä ja verrokkiryhmässä. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, kaikki eläimet on tutkittava. Jos rakenteellinen analyysi tai muut tiedot viittaavat silmiin kohdistuvaan myrkyllisyyteen, silmätutkimuksia on tehtävä useammin.

39. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan neurotoksisia vaikutuksia, voidaan lisäksi arvioida aistien reaktiivisuus erityyppisille ärsykkeille (32) (esimerkiksi kuulon, näön tai asentotunnon kautta välittyville ärsykkeille) (33) (34) (35), tarttumaotteen voimakkuus (36) ja motorinen toiminta (37) ennen tutkimuksen aloittamista ja kolmen kuukauden välein sen jälkeen, kunnes tutkimus on kestänyt 12 kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittauksissa mainittuja toimenpiteitä voidaan käyttää.

▼M4

40. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan immunotoksisia vaikutuksia, tätä tutkittavaa ominaisuutta koskevat tarkemmat tutkimukset voidaan tehdä tutkimuksen päättyessä.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

41. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisen 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

Hematologia ja kliininen biokemia

42. Tutkimuksissa, joissa käytetään jyrsijöitä, hematologiset tutkimukset on tehtävä kaikille tutkimuseläimille (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti) kolmen, kuuden ja kahdentoista kuukauden jälkeen sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut hematologiset määritykset saadaan tehtyä (katso 19 kohta). Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos hematologisissa parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta, esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa.

43. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (38): valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, punasolujen määrä, verihiutaleiden määrä, hemoglobiinipitoisuus, hematokriitti (punasolujen tilavuusosuus), punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV), keskihemoglobiini (MCH), keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC), protrombiiniaika ja aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika. Muita hematologisia parametreja (kuten Heinzin kappaleet, epätyypillinen punasolujen morfologia tai methemoglobiini) voidaan tarvittaessa mitata testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti. Jos testikemikaali vaikuttaa verta muodostavaan järjestelmään, retikulosyyttien määrän ja luuytimen sytologinen tutkimus voi olla aiheenmukaista, joskaan sitä ei tarvitse tehdä rutiininomaisesti.

44. Kliinisen biokemian määritykset tärkeimpien myrkyllisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan kaikilta tutkimuseläimiltä (kymmenen urosta ja kymmenen naarasta jokaisesta ryhmästä) hematologisia tutkimuksia varten määritetyin aikavälein. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut kliinis- biokemialliset määritykset saadaan tehtyä. Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos kliinisen biokemian parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Eläinten

▼M4

ruokinnan siirtämistä yön yli (hiiriä lukuun ottamatta) ennen verinäytteen ottoa suositellaan ([1]). Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (38): glukoosi, virtsa (virtsan typpi), kreatiniini, kokonaisproteiini, albumiini, kalsium, natrium, kalium, kokonaiskolesteroli, vähintään kaksi hepatosellulaariseen arviointiin sopivaa testiä (alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, glutamaattidehydrogenaasi, kokonaissappihapot) (39), ja vähintään kaksi hepatobiliaariseen arviointiin sopivaa testiä (alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitransferaasi, 5'-nukleotidaasi, kokonaisbilirubiini, kokonaissappihapot) (39). Muita kliinis-kemiallisia parametreja, kuten paastotriglyseridit, tietyt hormonit ja koliiniesteraasi, voidaan mitata tarvittaessa testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti.

45. Virtsa-analyysit on tehtävä kaikilta tutkimuseläimiltä (10 urosta ja 10 naarasta jokaisesta ryhmästä) näytteistä, jotka otetaan samoina aikoina kuin hematologiset ja kliinis-kemialliset näytteet. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä, jos virtsa-analyysissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Seuraava parametriluettelo on kliinis-kemiallisia tutkimuksia koskevan asiantuntijasuosituksen mukainen (38): ulkonäkö, tilavuus, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH, kokonaisproteiini ja glukoosi. Muita määrityksiä ovat ketoaineet, urobilinogeeni, bilirubiini ja piilevä veri. Myös muita parametreja voidaan tarvittaessa käyttää, jos havaitun vaikutuksen (havaittujen vaikutusten) tutkimusta on laajennettava.

46. Koiratutkimuksissa lähtötilanteen hematologiset ja kliinis-biokemialliset muuttujat on yleensä määritettävä ennen käsittelyn aloittamista, mutta jyrsijätutkimuksissa niitä ei tarvitse määrittää (38). Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömät (katso 58 kohta), näiden tietojen hankkimista on harkittava.

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

47. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Mittaukset voidaan kuitenkin määrätä rajattavaksi (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmässä tai satelliittiryhmässä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen (katso 21 kohta). Näille eläimille ei tarvitse tehdä ruumiinavausta eikä jäljempänä olevissa kohdissa kuvattuja toimenpiteitä. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella.

([1]) Ruokinnan siirtämistä yön yli suositellaan monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksissa. Tärkein syy tälle suositukselle on se, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta ruokinnan siirtäminen yön yli voi häiritä eläinten yleistä metaboliaa ja etenkin ruokintatutkimuksissa häiritä päivittäistä altistusta testikemikaalille. Kaikki eläimet on arvioitava samassa fysiologisessa tilassa, ja yksityiskohtaiset tai neurologiset arvioinnit on mieluiten tehtävä eri päivänä kuin näytteenotto kliinistä biokemiaa varten.

▼**M4**

48. Elinten painotiedot on kerättävä kaikilta eläimiltä lukuun ottamatta 47 kohdan jälkimmäisessä osassa lueteltuja eläimiä. Lisämunuaiset, aivot, lisäkivekset, sydän, munuaiset, maksa, munasarjat, perna, kivekset ja kilpirauhanen (punnittava kiinnityksen jälkeen lisäkilpirauhasten kanssa) on puhdistettava niihin kiinnittyvistä kudoksista tarkoituksenmukaisella tavalla, ja elinten märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi.

49. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (40) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

▼M4

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengitysteiden kautta altistusta koskevien tutkimusten yhteydessä hengityselimistön säilytettävien ja tutkittavien kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen luvussa B.8 (9) ja luvussa B.29 (10) annettuja suosituksia. Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

50. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (40). Vähintään seuraavat histopatologiset tutkimukset on tehtävä:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— kohdekudokset tai kudokset, joissa oli käsittelyyn liittyviä muutoksia suuren annoksen ryhmässä; kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä

— parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

HAVAINNOT (KARSINOGEENISUUSVAIHE)

51. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä jokaisen päivän aamulla ja illalla myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Lisäksi eläimet on tutkittava kerran päivässä tiettyjen, toksikologisesti oleellisten merkkien havaitsemiseksi. Tutkimuksissa, joissa käytetään ruokintaletkua, eläimet on tutkittava heti annostelun jälkeen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä kasvainten kehittymiseen. Jokaisen paljain silmin tai käsin tunnustelemalla havaittavissa olevan kasvaimen toteamisaika, paikka, koko, ulkonäkö ja kehitys on kirjattava.

52. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisen 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

▼M4

Hematologia, kliininen biokemia ja muut mittaukset

53. Jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa erityisesti vaikutustapaa koskevia pohdintoja varten, eläimiltä voidaan ottaa tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä varten. Myös virtsa-analyysi voi olla tarpeen. Näistä parametreista saadaan tietoa tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa, joka kestää yleensä 12 kuukautta (34 kohta), käytettyjä eläimiä koskevien tietojen perusteella. Lisätietoa tällaisten näytteiden ottamisen hyödyllisyydestä osana karsinogeenisuustutkimusta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Jos verinäytteitä otetaan, ne on kerättävä testijakson lopussa vähän ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta, esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa. Verinäytteet voidaan valmistella myös tutkimusta varten etenkin, jos kohde-elin vaikuttaa olevan luuydin, joskin verinäytteiden tutkimisen arvoa mahdollisen karsinogeenisuuden/onkogeenisuuden arvioinnissa karsinogeenisuusvaiheen yhteydessä on pidetty kyseenalaisena (38).

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

54. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille paitsi erityisvalvonnassa oleville eläimille (katso 20 kohta) on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella. Yleensä elinten painot eivät kuulu karsinogeenisuutta käsittelevään tutkimukseen, koska geriatriset muutokset ja myöhemmissä vaiheissa kasvainten kehittyminen mitätöi elinten painoa koskevien tietojen käyttökelpoisuuden. Nämä tiedot voivat kuitenkin olla erittäin tärkeitä näyttöön perustuvan arvioinnin toteuttamisessa ja etenkin vaikutustapaa koskevissa pohdinnoissa. Jos ne ovat osa satelliittitutkimusta, ne on kerättävä viimeistään vuoden kuluttua tutkimuksen aloittamisesta.

55. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (40) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauha-nen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko

▼M4

Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös elimet, joita pidetään testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköisinä kohde-eliminä, on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengityksen kautta altistuksen yhteydessä hengityselimistön säilytettyjen ja tutkittujen kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9). Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

56. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (40). Vähintään seuraavat kudokset on tutkittava:

— Kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— Kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— Kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— Jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä histopatologisia muutoksia, samat kudokset on tutkittava kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä.

— Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI (KARSINOGEENISUUS JA KROONINEN MYRKYLLISYYS)

Tiedot

57. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni myrkyllisiä vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

58. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

59. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (9 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

60. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

▼**M4**

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen):

Yleiset tiedot

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksikokineettiset tiedot, jos saatavilla

— silmätutkimuksen tiedot (jos saatavilla)

— hematologiset tiedot (jos saatavilla)

— kliinis-biokemialliset tiedot (jos saatavilla).

Kliiniset löydökset

— myrkyllisyyden merkit

— kaikkien poikkeavuuksien ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos pisteytetty)

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta).

Ruumiinavaustiedot

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset, poikkeavuuksien ilmaantuvuus ja vaikeusaste.

Histopatologia

— muut kuin neoplastiset histopatologiset löydökset

— neoplastiset histopatologiset löydökset

▼M4

— makroskooppisten ja mikroskooppisten löydösten välinen korrelaatio

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista käsittelyyn liittyvistä histopatologisista löydöksistä sekä niiden vaikeusaste

— raportti objektilasien vertaisarvioinnista.

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— annos-vastesuhteet

— aiemmat vertailutiedot

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

6) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä).

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.8. (Subakuutti myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus)

10) Tämän liitteen luku B.29 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus)

11) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet)).

▼M4

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1–7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9–35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37–68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69–98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF&Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. S. 279–284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196–1203.

▼**M4**

27) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06–9.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15–23.

32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam.&Appl. Toxicol. 29: 198–201.

39) EMEA (draft) document ”Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼B

B.34. **MYRKKYJEN VAIKUTUS LISÄÄNTYMISKYKYYN (YHDEN SUKUPOLVEN TESTI)**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

1.3 VERTAILUAINEET

Ei ole.

1.4 TESTIN PERIAATE

Testattavaa ainetta annetaan erisuuruisina annoksina useille uros- ja naarasryhmille. Urokset altistetaan kasvuaikana ja ainakin yhden täydellisen spermatogeneesisyklin ajan (noin 56 päivää hiirellä ja 70 päivää rotalla), jotta voidaan todeta testattavan aineen mahdolliset haittavaikutukset siemennesteen tuottoon.

Parentaalipolven (P) naaraat on altistettava vähintään kahden estrussyklin ajan, jotta voidaan todeta testattavan aineen mahdolliset haittavaikutukset estrukseen. Sen jälkeen eläimet pariutetaan. Pariuttamisaikana testattavaa ainetta annetaan kummallekin sukupuolelle ja sen jälkeen tiineyden ja imetyksen aikana ainoastaan naaraille. Testausmenetelmää on muunneltava, jos altistus tapahtuu hengitysteiden kautta.

1.5 LAATUKRITEERIT

Ei ole.

1.6 TESTIN KUVAUS

Testin valmistelu

Ennen tutkimuksen aloittamista nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin. Eläimet siirretään koetiloihin ja kokeen aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen kokeen alkua. Testattavaa ainetta suositellaan annettavaksi ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Myös muita antotapoja voidaan käyttää. Samaa antotapaa on käytettävä kaikille koe-eläimille koko koeajan. Jos liuotinta tai muita lisäaineita käytetään annostelun helpottamiseksi, niiden myrkyttömyys on oltava tiedossa. Eläimet on altistettava viikon jokaisena päivänä.

▼B

Koe-eläimet

Eläinlajin valinta

Suositeltavimmat lajit ovat rotta tai hiiri. Koe-eläiminä on käytettävä terveitä eläimiä, joilla ei ole tehty aikaisempia kokeita. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen, ei saa käyttää. Koe-eläinten laji, kanta, sukupuoli, paino ja/tai ikä on oltava tiedossa.

Hedelmällisyysmäärityksiä tehtäessä tutkitaan sekä urokset että naaraat. Kaikki koe- ja kontrollieläimet on vieroitettava ennen altistuksen alkamista.

Lukumäärä ja sukupuoli

Kussakin koe- ja kontrolliryhmässä on oltava niin monta eläintä, että tutkimukseen saadaan noin 20 kantavaa naarasta, joiden tiineys on päättymässä.

Tarkoituksena on tuottaa niin monta tiineyttä ja poikuetta, että testattavan aineen mahdollisista vaikutuksista P-sukupolven eläinten hedelmällisyyteen, tiineyteen ja emon käyttäytymiseen sekä F_1-sukupolven imeväisvaiheeseen, kasvuun ja kehitykseen syntymästä vieroitukseen voidaan tehdä luotettava arviointi.

Koe-olosuhteet

Ravintoa ja vettä on oltava vapaasti saatavilla. Synnytyksen lähestyessä kantavat naaraat tulee sijoittaa yksitellen synnytyshäkkeihin, joihin voidaan laittaa pesäntekotarvikkeita.

Annostasot

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää. Jos aineen annostelussa käytetään liuotinta, kontrolleille annostellaan liuotinta suurimman annoksen saavalle ryhmälle annettu määrä. Jos testattava aine vähentää ravinnon tarvetta tai hyväksikäyttöä, tutkimukseen voidaan liittää ravintokontrolliryhmä. Elleivät testattavasta aineesta johtuvat fysikaalis-kemialliset tai biologiset vaikutukset aiheuta rajoituksia, suurimman annoksen on aiheutettava parentaalisukupolvessa myrkkyvaikutuksia mutta ei kuolleisuutta. Keskimmäisen annostason(tasojen) on aiheutettava testattavan aineen pienimmät havaittavissa olevat myrkkyvaikutukset eikä pienimmällä annoksella saa olla havaittavia haittavaikutuksia kumpaankaan sukupolveen. Kun annos annetaan kapseleina tai ruokintaletkulla, se tulee määrittää kunkin eläimen painon perusteella ja säätää viikoittain painon muutosten mukaan. Kantavien naaraiden annos voidaan myös määrittää naaraan painon perusteella tiineyden 0-päivänä ja 6. päivänä.

Raja-annostesti

Jos lievästi myrkyllisiä aineita tutkittaessa 1 000 mg/kg ei vaikuta lisääntymiskykyyn, muita annostasoja ei tarvitse tutkia. Mikäli suurimmalla annoksella tehty esitesti aiheuttaa emossa selviä myrkkyvaikutuksia, mutta ei vaikuta hedelmällisyyteen, muita annostasoja ei ole tarpeen tutkia.

▼B

Testin suorittaminen

Testin aikataulu

Parentaalipolven (P) urosten päivittäinen altistus on aloitettava vieroituksen jälkeen 5–9 viikon iässä ja vähintään viiden vuorokauden koeolosuhteisiin sopeuttamisen jälkeen. Rottia altistetaan 10 viikkoa ennen pariuttamisaikaa (hiiriä kahdeksan viikkoa). Urokset lopetetaan ja tutkitaan pariuttamisajan kuluttua. Vaihtoehtoisesti ne voidaan pitää testin ruokavaliolla mahdollisen toisen poikueen tuottamista varten. Tällöin ne lopetetaan ja tutkitaan jossakin vaiheessa ennen tutkimuksen päättymistä. Parentaalipolven (P) naaraiden altistuksen on alettava vähintään viiden vuorokauden sopeutumisajan kuluttua ja jatkuttava ainakin kahden viikon ajan ennen pariutumista. P-naaraiden päivittäisen altistuksen on jatkuttava koko kolmen viikon pariuttamisajan ja tiineysajan aina F_1-poikasten vieroitukseen asti. Altistusaikataulun muutoksia voidaan harkita testattavasta aineesta saatavilla olevien tietojen, kuten metabolisten vaikutusten tai biokertyvyyden perusteella.

Pariuttamismenettely

Tutkittaessa myrkkyjen vaikutusta hedelmällisyyteen voidaan eläimet pariuttaa joko 1:1 (yksi uros yhtä naarasta kohden) tai 1:2 (yksi uros kahta naarasta kohden).

Kun pariutetaan 1:1, yhtä naarasta pidetään saman uroksen luona kunnes tiineys alkaa tai kolme viikkoa on kulunut. Naaraat on tutkittava joka aamu sperman tai emätintulpan havaitsemiseksi. Sperman tai emätintulpan toteamispäivä on tiineyden 0-päivä.

Pariutumattomat parit tutkitaan näennäisen lisääntymiskyvyttömyyden selvittämiseksi.

Näihin tutkimuksiin voi kuulua uuden pariutumismahdollisuuden järjestäminen toisen hedelmällisen naaraan tai uroksen kanssa, sukupuolielinten mikroskooppinen tutkimus ja estrussyklin sekä siemennestetuotannon tutkiminen.

Poikueiden koko

Lisääntymiskykytutkimuksen kuluessa altistettujen eläinten annetaan synnyttää normaalisti ja hoitaa poikueensa vieroitukseen asti ilman, että poikueita yhtenäistetään.

Jos poikueet yhtenäistetään, seuraavaa menetelmää suositellaan käytettäväksi. Syntymän jälkeen 1-4 päivän välisenä aikana poikuetta voidaan mukauttaa poistamalla liiat poikaset niin, että poikueeseen jää, jos mahdollista, neljä urosta ja neljä naarasta.

Silloin kun uros- tai naaraspuolisten poikasten määrä on sellainen, että poikueeseen ei jää neljää poikasta kumpaakin sukupuolta, voidaan tehdä osittaismukautus (esimerkiksi viisi urosta ja kolme naarasta). Alle kahdeksan poikasen poikueita ei mukauteta.

▼B

Eläinten tarkkailu

Kaikkien eläinten tarkkailu suoritetaan vähintään kerran päivässä koko tutkimuksen ajan. Käyttäytymistavan muutokset, vaikeat tai pitkittyneet synnytysoireet ja kaikki myrkkyoireet sekä kuolleisuus on kirjattava. Ennen pariutumista ja pariutumisajan kuluessa ravinnon kulutus voidaan mitata päivittäin. Synnytyksen jälkeinen ja imetyksen aikainen ravinnon kulutus (ja veden kulutus kun testattava aine annetaan juomavedessä) mitataan samana päivänä kun poikue punnitaan. P-urokset ja P-naaraat on punnittava ensimmäisenä altistuspäivänä ja sen jälkeen viikoittain. Nämä huomiot on kirjattava jokaisesta täysikasvuisesta koe-eläimestä erikseen.

Tiineysajan pituus on laskettava tiineyden 0-päivästä. Kukin poikue on tutkittava mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen sekä kirjattava poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena syntyneet, elävänä syntyneet ja paljain silmin havaittavat poikkeavuudet.

Kuolleet ja neljäntenä päivänä lopetetut poikaset säilytetään ja tutkitaan poikkeavuuksien havaitsemiseksi. Elävät poikaset lasketaan ja poikue punnitaan synnytystä seuraavana aamuna sekä neljäntenä ja seitsemäntenä päivänä ja sen jälkeen viikoittain tutkimuksen päättymiseen saakka, jolloin eläimet punnitaan yksitellen.

Emojen ja poikasten fyysiset poikkeavuudet ja käyttäytymishäiriöt kirjataan.

Patologia

Ruumiinavaus

Tutkimuksen kuluessa kuolleet tai lopetetut P-sukupolven eläimet tutkitaan mikroskooppisesti rakenteellisten poikkeavuuksien tai patologisten muutosten toteamiseksi. Huomiota kiinnitetään erityisesti sukupuolielimiin. Kuolleet tai huonokuntoiset poikaset tutkitaan poikkeavuuksien toteamiseksi.

Histopatologia

Kaikkien P-eläinten munasarjat, kohtu, kohdunkaula, emätin, kivekset, lisäkivekset, rakkularauhaset, eturauhanen, koagulaatiorauhanen, aivolisäke ja kohde-elimet on säilytettävä mikroskooppista tutkimusta varten. Ellei niitä ole tutkittu muissa moniannostutkimuksissa, ne on tutkittava mikroskooppisesti kaikkien suurimman annoksen saaneiden ja kontrollieläinten osalta sekä, mikäli mahdollista, tutkimuksen aikana kuolleiden eläinten osalta.

Elimet, joissa näillä eläimillä esiintyy poikkeavuuksia, on myös tutkittava kaikkien muiden P-eläinten osalta. Näissä tapauksissa on kaikki näkyviä patologisia muutoksia osoittavat kudokset tutkittava mikroskooppisesti. Kuten pariuttamismenettelyä selostavassa kohdassa esitetään, lisääntymiskyvyttömiksi epäiltyjen eläinten sukupuolielimet voidaan tutkia mikroskooppisesti.

▼B

2. **TULOKSET**

Tulokset voidaan esittää taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin koeryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa, hedelmällisten urosten määrä, kantavien naaraiden määrä, muutosten laatu ja eläinten prosentuaalinen osuus kutakin muutosta kohden.

Jos mahdollista, tulosten merkitsevyys on arvioitava jotakin tilastollista menetelmää käyttäen. Kaikki tunnetut tilastointimenetelmät ovat sallittuja.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— koe-eläinlaji/kanta,

— myrkkyvaikutukset sukupuolen ja annostason perusteella sekä hedelmällisyys, tiineys ja elinkelpoisuus,

— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja elossa olevat ennen lopetusajankohtaa tai tutkimuksen päättyessä,

— taulukko, josta ilmenee kunkin poikueen paino, poikasten keskipaino ja kunkin poikasen paino tutkimuksen päättyessä,

— lisääntymistä, poikasia ja syntymän jälkeistä kasvua koskevat myrkky- ja muut vaikutukset,

— kunkin oireen toteamispäivä ja kehittyminen,

— P-eläinten painoa koskevat tiedot,

— ruumiinavauslöydökset,

— tarkka selostus kaikista mikroskooppilöydöksistä,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 ARVIOINTI JA TULKINTA

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

4. **LÄHDELUETTELO**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

▼B

B.35. KAKSI SUKUPOLVEA KÄSITTÄVÄ LISÄÄNTYMISKYKYYN KOHDISTUVIEN MYRKYLLISYYSVAIKUTUSTEN TUTKIMUS

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD: n testiohjeesta nro 416 (2001).

1.1 JOHDANTO

Tällä kaksi sukupolvea käsittävällä reproduktiotestillä on tarkoitus tuottaa yleistä tietoa testiaineen vaikutuksista urosten ja naaraiden lisääntymiselinten vahingoittumattomuuteen ja toimintaan. Siihen sisältyy sukupuolirauhasten toiminta, kiimasykli, pariutumiskäyttäytyminen, hedelmöityminen, tiineys, synnytys, imetys ja vieroitus sekä testiaineen vaikutukset jälkeläisten kasvuun ja kehitykseen. Tutkimus voi myös tuottaa tietoja testiaineen vaikutuksista vastasyntyneiden sairastuvuuteen ja kuolleisuuteen sekä alustavia tietoja pre- ja postnataalisen kehityksen aikaisista myrkyllisyysvaikutuksista. Tutkimus voi lisäksi ohjata seuraavien tutkimusten suorittamista. F1-sukupolven kasvun ja kehityksen lisäksi tämän testimenetelmän tarkoitus on arvioida F2-sukupolven urosten ja naaraiden lisääntymiselinten vahingoittumattomuutta ja toimintaa sekä kasvua ja kehitystä. Lisätietoja kehityksen aikaisista myrkyllisyysvaikutuksista ja toiminnallisista häiriöistä voidaan hankkia lisäämällä tässä kuvattuun tutkimusohjelmaan muita osatutkimuksia, joissa sovelletaan yleiseen ja/tai hermojen kehitykseen kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimusmenetelmiä, tai tutkimalla näitä loppupisteitä erillisillä testeillä soveltuvia testimenetelmiä käyttäen.

1.2 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan porrastettuina annoksina useille uros- ja naarasryhmille. P-sukupolven uroksille tulee antaa testiainetta niiden kasvun aikana ja ainakin yhden kokonaisen spermatogeneesisyklin ajan (hiirellä noin 56 päivää ja rotalla 70 päivää), jotta spermatogeneesiin kohdistuvat haittavaikutukset voidaan todeta. Spermaan kohdistuvat vaikutukset määritetään useiden spermaparametrien (esimerkiksi siittiöiden morfologia ja liikkuvuus), kudospreparaattien ja yksityiskohtaisen histopatologisen tutkimuksen avulla. Jos käytettävissä on spermatogeneesiä koskevia tietoja aikaisemmasta toistuvaa annostelua käyttäneestä tutkimuksesta, jonka kesto on riittävä, esimerkiksi 90 päivää, P-sukupolven uroksia ei tarvitse sisällyttää arviointiin. On kuitenkin suositeltavaa säilyttää P-sukupolven spermanäytteet tai digitaaliset tallenteet myöhempää arviointia varten. P-sukupolven naaraille tulee antaa testiainetta niiden kasvun aikana ja useiden kokonaisten kiimasyklien ajan, jotta testiaineen mahdolliset normaalia kiimasykliä häiritsevät haittavaikutukset voidaan todeta. Testiainetta annetaan poikasten vanhemmille (P-sukupolvi) pariutumisen aikana, tiineyden aikana ja niiden F1-poikasten vieroitukseen asti. Vieroituksesta lähtien ainetta annetaan F1-poikasille aikana, jolloin ne kehittyvät sukukypsiksi, pariutumisen aikana sekä F2-sukupolven syntymän jälkeen vieroitukseen asti.

Kaikista eläimistä tutkitaan myrkyllisyysvaikutusten merkit kliinisesti havainnoiden ja patologisten tutkimusten avulla kiinnittäen erityistä huomiota urosten ja naaraiden lisääntymiselinten vahingoittumattomuuteen ja toimintaan sekä jälkeläisten kasvuun ja kehitykseen kohdistuviin vaikutuksiin.

▼B

1.3 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.3.1 **Eläinlajin valinta**

Suositeltava eläinlaji on rotta. Jos käytetään muita lajeja, niiden käyttö on erikseen perusteltava ja testimenetelmää on tarvittaessa mukautettava. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen tai joilla tiedetään esiintyvän kehityshäiriöitä, ei tule käyttää. Tutkimuksen alussa eläinten painon variaation tulisi olla mahdollisimman pieni, eikä se saa olla suurempi kuin 20 % kummankin sukupuolen painokeskiarvosta.

1.3.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan olisi oltava 22 ^{o}C (± 3^{o}). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70 %:a muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50-60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testiaineen ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Parituksen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Kun parituksen voidaan todeta tapahtuneen, kukin pariutunut naaras siirretään omaan synnytys- tai poikimishäkkiinsä. Paritetut rotat voidaan myös pitää häkeissä pienissä ryhmissä ja erottaa toisistaan yksi tai kaksi päivää ennen synnytystä. Paritetuille eläimille on annettava synnytyksen lähestyessä asianmukaiset ja etukäteen määritellyt pesäntekoaineet.

1.3.3 **Eläinten valmistelu**

Testissä tulee käyttää terveitä, nuoria eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan ja joita ei ole aiemmin käytetty testeihin. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Mahdollisista sisarussuhteista eläinten välillä on oltava selvillä, jotta sisarusten parittaminen voidaan välttää. Eläimet jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmään (jaottelu ruumiinpainon mukaan on suositeltavaa). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero. P-sukupolvelle on annettava tunnistenumerot ennen annostelun aloittamista. F1-sukupolvelle tunnistenumerot annetaan paritukseen valittujen eläinten vieroituksen yhteydessä. F1-sukupolven kaikkien valittujen eläinten alkuperäispoikue on merkittävä muistiin. Lisäksi suositellaan, että poikasille annetaan yksilöllinen tunniste mahdollisimman pian syntymän jälkeen, mikäli yksilöt aiotaan punnita tai mikäli niille aiotaan tehdä toiminnallisia testejä.

P-sukupolven eläinten tulee olla käsittelyn alkaessa noin 5-9 viikon ikäisiä. Eläinten tulee kaikissa testiryhmissä olla samanpainoisia ja -ikäisiä niin tarkasti kuin on käytännössä mahdollista.

▼B

1.4 TESTIN SUORITUS

1.4.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Kussakin testi- ja kontrolliryhmässä on oltava riittävä määrä eläimiä, jotta testiin saadaan mielellään vähintään 20 tiinettä naarasta, jotka synnyttävät tai joiden synnytysaika on lähellä. Tämä ei ehkä ole mahdollista testattaessa aineita, jotka aiheuttavat käsittelyyn liittyviä ei-toivottuja vaikutuksia (esimerkiksi steriiliys tai liian suuri myrkyllisyys ylimmällä annostasolla). Tavoitteena on tuottaa tarpeeksi tiineystapauksia, jotta voidaan tehdä merkitsevä arvio testiaineen vaikutuksesta hedelmällisyyteen, tiineyteen, emon käytökseen ja imetykseen, F1-sukupolven poikasten kasvuun ja kehitykseen hedelmöityksestä sukukypsyyteen, sekä F1-sukupolven poikasten (F2) kehitykseen vieroitukseen asti. Jos tutkimuksessa ei päästä tavoiteltuun tiineiden eläinten määrään (20), tutkimus ei silti välttämättä ole epävalidi. Tutkimuksen validiteetti tulee arvioida kussakin tapauksessa erikseen.

1.4.2 **Annosten valmistelu**

Testiaineen antaminen suun kautta (ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna tai letkulla) on suositeltavaa, paitsi jos jokin muu antotapa (esimerkiksi ihoapplikaatio tai inhalaatio) todetaan sopivammaksi.

Tarvittaessa testiaine liuotetaan tai siitä tehdään suspensio sopivaan kantaja-aineeseen. Ensiksi tulisi aina harkita vesiliuoksen/suspension käyttämistä, milloin se on mahdollista, seuraavaksi öljyliuoksen/emulsion (esimerkiksi maissiöljy) käyttämistä ja vasta sitten muiden kantaja-aineiden käyttämistä. Jos kantaja-aineena käytetään muuta kuin vettä, kantaja-aineen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiilius kantaja-aineessa on määritettävä.

1.4.3 **Annostasot**

Testissä tulee käyttää vähintään kolmea annostasoa ja testin kanssa samaan aikaan tehtävää kontrollia. Jos testiaineen fysikaalinen/kemiallinen olomuoto tai biologiset ominaisuudet eivät aseta rajoituksia, suurin annos valitaan sellaiseksi, että se aiheuttaa myrkyllisyysvaikutuksen mutta ei aiheuta kuolemaa tai kovia tuskia. Mikäli odottamatonta kuolleisuutta esiintyy, hyväksyttävä on yleensä sellainen tutkimus, jossa P-sukupolven kuolleisuus on alle 10 %. Annostasot on porrastettava laskevasti siten, että tutkimuksessa saadaan esiin mahdolliset annostasoihin liittyvät vaikutukset sekä haitaton altistustaso (NOAEL). Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi yli kymmenkertaisia annosvälejä). Tutkimuksissa, joissa testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna, annostasojen väliset erot saavat olla enintään kolminkertaisia. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon aikaisemmat myrkyllisyystiedot ja erityisesti toistettujen annostelututkimusten tulokset. Tutkimuksessa on otettava huomioon myös tiedot testiaineen tai muiden sen kanssa samantyyppisten materiaalien metaboloitumisesta elimistössä samoin kuin niiden toksikokineettisistä ominaisuuksista. Nämä tiedot auttavat myös osoittamaan, että annostasot on valittu oikein.

▼B

Kontrolliryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testiaineen antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän eläimiä tulee käsitellä samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä (testiainekäsittelyä lukuun ottamatta). Jos käytetään kantaja-ainetta, kontrolliryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin käytetty kantaja-aineannos. Jos testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna ja se vähentää ravinnonottoa tai ravinnon hyväksikäyttöä elimistössä, voi olla tarpeen käyttää parikontrolliryhmää. Samanaikaisen parikontrolliryhmän sijasta voidaan käyttää tietoja, jotka on saatu sellaisista tutkimuksista, joilla on selvitetty vähentyneen ravinnonoton vaikutusta lisääntymisfysiologisiin parametreihin.

Kantaja-ainetta tai muuta lisäainetta käytettäessä aineesta on syytä selvittää seuraavat ominaisuudet: vaikutus testiaineen absorboitumiseen, jakautumiseen, metaboloitumiseen ja elimistössä säilymiseen, sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka saattavat muuttaa testiaineen myrkyllisyyttä, sekä vaikutukset koe-eläinten ravinnon- ja juomanottoon tai ravitsemustilaan.

1.4.4 **Raja-annostesti**

Jos jokin testin annostaso, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokilo)/vrk tai vastaava suhteellinen määrä ravinnossa tai juomavedessä, milloin testiaine annetaan ravinnon tai juomaveden seassa, ja joka annetaan tässä testimenetelmässä kuvattujen menettelyjen mukaisesti, ei aiheuta lainkaan havaittavaa myrkyllisyysvaikutusta poikasten vanhemmissa tai poikasissa ja jos myrkyllisyysvaikutusta ei aikaisempien tutkimustulosten perusteella ole odotettavissa (esimerkiksi rakenteellisesti ja/tai metabolisesti samantyyppiset yhdisteet), täydellinen useita annostasoja käyttävä testi ei välttämättä ole tarpeen. Raja-annostestiä voidaan soveltaa, paitsi silloin, kun ihmisten altistuminen viittaa siihen, että on käytettävä suurempaa suun kautta annettavaa annosta. Muita antotapoja, kuten inhalaatiota tai ihoapplikaatiota käytettäessä, testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet, esimerkiksi liukoisuus, saattavat usein osoittaa altistuksen enimmäistason ja rajoittaa sitä.

1.4.5 **Antotapa**

Testiainetta annetaan eläimille seitsemänä päivänä viikossa. Suun kautta tapahtuva antotapa (ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna tai letkulla) on suositeltava. Jos käytetään muuta antotapaa, testin tekijän on perusteltava muun antotavan käyttö ja muutettava muita kohtia vastaavasti. Kaikille eläimille tulee antaa testiaineannokset samalla tavalla asianmukaisena koeaikana. Jos testiaine annetaan letkulla, on syytä käyttää mahaletkua. Kerralla annettavan nesteen tilavuus ei saa ylittää 1 ml/100 g eläimen painoa (maissiöljyä käytettäessä tilavuus saa olla enintään 0,4 ml/100 g eläimen painoa), paitsi käytettäessä vesiliuosta, jolloin enimmäistilavuus voi olla 2 ml/100 g eläimen painoa. Testiaineen tilavuuden vaihtelu tulee minimoida pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla voidaan käyttää tilavuudeltaan samaa nestemäärää. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Letkuannostelua käyttävissä tutkimuksissa poikaset saavat yleensä testiainetta vain epäsuorasti emon maidosta vieroitukseen asti, jolloin annosten antaminen poikasille aloitetaan. Tutkimuksissa, joissa testiaine annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, poikaset saavat lisäksi testiainetta suoraan, kun ne alkavat itse syödä imetysajan viimeisellä viikolla.

▼B

Jos aineita annetaan eläimille ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testiainemäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testiaineen pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annos; käytetty tapa on mainittava. Jos testiaine annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava vähintään viikoittain siten, että annostaso pysyy samana eläimen ruumiinpainoon nähden. Näin meneteltäessä on otettava huomioon tiedot testiaineen leviämisestä istukan kautta.

1.4.6 **Testiaikataulu**

P-sukupolven urosten ja naaraiden päivittäinen käsittely aloitetaan, kun eläimet ovat 5–9 viikon ikäisiä. F1-sukupolven urosten ja naaraiden päivittäinen käsittely aloitetaan vieroituksen yhteydessä pitäen kuitenkin mielessä, että jos testiaine annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, F1-sukupolven poikaset saattavat altistua testiaineelle jo imetysaikana. Molempien sukupuolten käsittelyä jatketaan sekä P- että F1-ryhmissä ainakin kymmenen viikon ajan ennen parittamisvaihetta. Molempien sukupuolten käsittelyä jatketaan myös kahden viikon parittamisjakson aikana. Urokset lopetetaan inhimillisellä tavalla ja tutkitaan, kun niitä ei enää tarvita lisääntymisfysiologisten vaikutusten arviointiin. P-sukupolven naaraiden käsittelyä jatketaan koko tiineysajan ja F1-sukupolven poikasten vieroitukseen asti. Annosteluaikataulun mukauttamista harkittaessa tulee ottaa huomioon käytettävissä olevat tiedot testiaineesta, mukaan lukien aikaisemmat myrkyllisyystiedot sekä metaboloituminen tai biologinen kertyminen. Kunkin eläimen annos on yleensä määriteltävä eläimen viimeksi määritetyn ruumiinpainon mukaan. Annoksen mukauttamisessa viimeisen tiineyskolmanneksen aikana on kuitenkin oltava varovainen.

P- ja F1-sukupolvien urosten ja naaraiden käsittelyä jatketaan eläinten lopettamiseen asti. P- ja F1-sukupolvien kaikki aikuiset urokset ja naaraat tulee lopettaa inhimillisellä tavalla, kun eläimiä ei enää tarvita lisääntymisfysiologisten vaikutusten arviointiin. F1-sukupolven poikaset, joita ei valita paritukseen, ja kaikki F2-sukupolven poikaset lopetetaan inhimillisellä tavalla vieroituksen jälkeen.

1.4.7 **Paritus**

1.4.7.1 *P-sukupolven paritus*

Kussakin parituksessa jokainen naaras on samassa häkissä yhden, samalla annostasolla olevan uroksen kanssa (1:1-paritus) siihen saakka, kunnes eläimet parittelevat tai kunnes kaksi viikkoa on kulunut. Naaraat tutkitaan päivittäin sperman tai vaginan tulpituksen toteamiseksi. Tiineyden päivä 0 katsotaan päiväksi, jolloin jompikumpi todetaan. Jos parittelua ei tapahdu, voidaan harkita naaraan uutta paritusta saman ryhmän hedelmällisiksi todettujen urosten kanssa. Pariutuneet eläinparit on merkittävä muistiin. Sisarusten parittamista on vältettävä.

▼B

1.4.7.2 *F1 -sukupolven paritus*

F1-sukupolven eläinten paritus tapahtuu siten, että kustakin poikueesta valitaan vieroituksen yhteydessä vähintään yksi uros ja yksi naaras, jotka paritetaan samalla annostasolla olevien eri poikueeseen kuuluvien poikasten kanssa. Näin syntyvä sukupolvi on F2-sukupolvi. Poikaset valitaan kustakin poikueesta satunnaisesti, jos poikasten ruumiinpainossa tai ulkomuodossa ei ole merkittäviä eroja. Jos tällaisia eroja havaitaan, kustakin poikueesta on valittava sitä parhaiten edustavat yksilöt. Käytännössä valinta on paras tehdä ruumiinpainon perusteella, mutta se voidaan tehdä myös ulkomuodon perusteella. F1-sukupolven poikasia ei saa parittaa ennen kuin ne ovat saavuttaneet täyden sukukypsyyden.

Poikimattomien parien hedelmättömyyden todennäköinen syy on arvioitava. Menetelminä voidaan käyttää toista paritusta muiden hedelmällisiksi todettujen urosten tai naaraiden kanssa, lisääntymiselinten mikroskooppitutkimusta sekä kiimasyklien ja spermatogeneesin tutkimista.

1.4.7.3 *Toinen paritus*

Joissakin tapauksissa, esimerkiksi kun havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia poikueen koossa tai epäselviä vaikutuksia ensimmäisessä parituksessa, on suositeltavaa parittaa P- tai F1-sukupolven aikuiset eläimet uudelleen toisen poikueen tuottamiseksi. Suositeltava tapa on parittaa uudelleen naaraat tai urokset, jotka eivät ole tuottaneet poikuetta vastakkaisen sukupuolen hedelmälliseksi todetun eläimen kanssa. Jos toisen poikueen tuottamista pidetään tarpeellisena jommassakummassa sukupolvessa, eläimet on paritettava uudelleen noin viikon kuluttua viimeisen poikueen vieroituksesta.

1.4.7.4 *Poikueen koko*

Eläinten on annettava poikia normaalisti ja kasvattaa poikaset vieroitukseen asti. Poikueen koon vakioiminen ei ole välttämätöntä. Jos vakiointia käytetään, vakiointimenetelmä on kuvattava yksityiskohtaisesti.

1.5 HAVAINNOT

1.5.1 **Kliiniset havainnot**

Yleinen kliininen havainnointi on tehtävä päivittäin, ja letkuruokinnassa havainnoinnin ajoitusta suunniteltaessa on syytä ottaa huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut myrkyllisyysvaikutukset ovat suurimmillaan. Käytösmuutokset, vaikean tai pitkittyneen synnytyksen merkit ja kaikki myrkyllisyysvaikutusten merkit on kirjattava. Kukin eläin on lisäksi tutkittava yksityiskohtaisesti esimerkiksi punnituksen yhteydessä ainakin viikoittain. Kaikkia eläimiä havainnoidaan kaksi kertaa päivässä ja tarvittaessa viikonloppuisin kerran päivässä sairastuvuuden ja kuolleisuuden toteamiseksi.

▼B

1.5.2 **Poikasia saaneiden eläinten paino sekä ravinnon- ja nesteenotto**

Poikasia saaneet eläimet (P ja F1) punnitaan annostelun aloituspäivänä ja sen jälkeen ainakin kerran viikossa. Poikasia saaneet naaraat (P ja F1) punnitaan ainakin tiineyspäivinä 0, 7, 14 ja 20 tai 21 sekä imetyksen aikana poikueiden punnituspäivinä sekä eläinten lopetuspäivänä. Havainnot raportoidaan erikseen kustakin täysikasvuisesta eläimestä. Paritusta edeltävänä aikana ja tiineysjaksojen aikana ravinnonotto tulee mitata vähintään viikoittain. Juomanotto mitataan vähintään viikoittain, jos testiaine annetaan juomaveteen sekoitettuna.

1.5.3 **Kiimasykli**

Kiimasyklin pituus ja normaalius arvioidaan P- ja F1-sukupolven naaraista ottamalla vaginasta irtosolunäyte ennen pariutumista sekä haluttaessa myös pariutumisjakson aikana, kunnes pariutumisen voidaan todeta tapahtuneen. Otettaessa irtosolunäytettä vaginasta tai kohdunkaulasta on varottava limakalvojen vahingoittamista ja siitä seuraavaa valeraskautta (1).

1.5.4 **Siemennesteen muuttujat**

Lopettamisen yhteydessä kaikilta P- ja F1-uroksilta kirjataan kivesten ja lisäkivesten paino ja yksi kappale kumpaakin elintä säilötään histopatologista tutkimusta varten (katso kohdat 1.5.7 ja 1.5.8.1). Sekä P- että F1-sukupolven kustakin ryhmästä erotetaan vähintään kymmenen uroksen osajoukko, jonka lopuista kiveksistä ja lisäkiveksistä lasketaan homogenisoinnille resistentit spermatidit ja lisäkiveksen häntään varastoituneen siemennesteen määrä. Samalta osajoukolta kerätään siemenneste lisäkiveksen hännästä tai siemenjohtimesta siittiöiden liikkuvuuden ja morfologian arviointia varten. Jos havaitaan käsittelyyn liittyviä vaikutuksia tai jos muissa tutkimuksissa on osoitettu mahdollisia vaikutuksia spermatogeneesiin, jokaisen ryhmän kaikkien urosten siemenneste tulee arvioida. Muussa tapauksessa riittää, että laskenta tehdään kontrolliryhmän ja korkean annostasoryhmän P- ja F1-eläimille.

Homogenisoinnille resistenttien kiveksissä olevien spermatidien ja lisäkiveksen häntään varastoituneiden siittiöiden määrä on laskettava (2)(3). Lisäkiveksen häntään varastoituneiden siittiöiden määrä voidaan johtaa kvalitatiiviseen arviointiin käytetyn suspension sisältämien siittiöiden pitoisuudesta ja tilavuudesta sekä jäljelle jääneen lisäkiveksen hännän kudoksen jauhamisen ja/tai homogenoinnin jälkeen saadusta siittiöiden lukumäärästä. Laskenta tulee tehdä valitulle urosten osajoukolle kaikissa annosryhmissä heti eläinten lopettamisen jälkeen, paitsi jos käytetään video- tai digitaalista tallennusta tai jos näytteet jäädytetään myöhempää analyysia varten. Näissä tapauksissa kontrolliryhmät ja ylin annosryhmä voidaan analysoida ensin. Jos mitään käsittelyyn liittyviä vaikutuksia (esimerkiksi vaikutukset siittiöiden määrään, liikkuvuuteen tai morfologiaan) ei havaita, muita annosryhmiä ei tarvitse analysoida. Jos taas ylimmässä annosryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä vaikutuksia, myös alemmat annosryhmät on arvioitava.

▼B

Lisäkiveksessä (tai siemenjohtimessa) olevien siittiöiden liikkuvuus tulee arvioida tai videoida heti eläimen lopettamisen jälkeen. Siittiöt kerätään niitä mahdollisimman vähän vaurioittaen ja sperma laimennetaan liikkuvuusanalyysia varten hyväksyttyjä menetelmiä käyttäen (4). Progressiivisesti liikkuvien siittiöiden prosenttiosuus tulee määrittää joko subjektiivisesti tai objektiivisesti. Kun tehdään tietokoneavusteinen liikkuvuusanalyysi (5) (6) (7) (8) (9) (10), progressiivinen liikkuvuus johdetaan käyttäjän määrittelemien keskimääräisten nopeuden ja suoruuden kynnysarvojen eli lineaarisen indeksin mukaan. Jos näytteet on videoitu (11) tai kuvat on muulla tavoin tallennettu ruumiinavauksen yhteydessä, jatkoanalyysi tarvitsee tehdä vain kontrolliryhmän ja ylimmän annosryhmän P- ja F1-sukupolvien uroksille. Jos kuitenkin havaitaan käsittelyyn liittyviä vaikutuksia, myös alemmat annosryhmät on arvioitava. Jos video- tai digitaalitallenteita ei ole tehty, kaikkien testiryhmien kaikki näytteet tulee analysoida ruumiinavauksen yhteydessä.

Lisäkiveksen (tai siemenjohtimen) siemennestenäytteestä tehdään morfologinen arvio. Siemenneste (vähintään 200 siittiötä/näyte) tutkitaan fiksatiivikäsiteltynä märkäpreparaattina (12) ja luokitetaan joko normaaliksi tai epänormaaliksi. Morfologisiin siemennesteen epänormaaliuksiin kuuluvat siittiöiden fuusio, eristyneet päät sekä päiden tai häntien epämuodostumat. Arviointi on tehtävä kaikista annosryhmistä valitulle urosten osajoukolle joko heti eläinten lopettamisen jälkeen tai myöhemmin video- tai digitaalitallenteiden pohjalta. Kun preparaatit on käsitelty fiksatiivilla, ne voidaan tutkia myöhemminkin. Näissä tapauksissa kontrolliryhmä ja ylin annosryhmä voidaan tutkia ensin. Jos mitään käsittelyyn liittyviä vaikutuksia (esimerkiksi vaikutuksia sperman morfologiaan) ei havaita, alempia annosryhmiä ei tarvitse analysoida. Jos käsittelyyn liittyviä vaikutuksia esiintyy ylimmässä annosryhmässä, myös alemmat annostasoryhmät on arvioitava.

Jos jokin edellä kuvatuista siemennesteen muuttujista on jo tutkittu vähintään 90 päivää kestäneissä systeemisen myrkyllisyyden tutkimuksissa, tutkimusta ei tarvitse toistaa tässä yhteydessä. On kuitenkin suositeltavaa tallentaa P-sukupolven näytteet tai siemennesteen digitaalinen tallenne mahdollista myöhempää tutkimusta varten.

1.5.5 **Poikaset**

Kukin poikue tutkitaan mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen (imetyspäivä 0) ja poikueista määritetään poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena ja elävänä syntyneiden poikasten määrä sekä merkittävien poikkeavuuksien esiintyminen. Poikasista, jotka löydetään kuolleina päivänä 0, on mielellään tutkittava mahdolliset kehityshäiriöt ja kuolinsyy, mikäli mahdollista, ja ruumiit säilötään. Elävät poikaset lasketaan ja punnitaan kukin erikseen synnytyksen yhteydessä (imetyspäivä 0) tai päivänä 1 sekä säännöllisesti punnituspäivinä, esimerkiksi imetyspäivinä 4, 7, 14 ja 21. Emoissa tai poikasissa havaitut ruumiilliset epämuodostumat tai epänormaali käyttäytyminen on merkittävä muistiin.

▼B

Poikasten ruumiillisesta kehityksestä kirjataan lähinnä painonlisäys. Muista fyysisistä muuttujista (esimerkiksi korvien ja silmien avautuminen, hampaiden puhkeaminen, karvankasvu) voidaan saada täydentäviä tietoja, mutta tällaiset tiedot tulee mielellään arvioida sukukypsyystietojen pohjalta (esimerkiksi ikä ja ruumiinpaino emättimen avautuessa tai terskan ja esinahan erotessa) (13). Toiminnalliset tutkimukset (esimerkiksi motoriset toiminnot, aistitoiminnot, refleksien kehitys), jotka liittyvät erityisesti sukukypsyyden saavuttamiseen, suositellaan tehtäväksi F1-sukupolven poikasille ennen vieroitusta ja/tai sen jälkeen, mikäli edellä mainittuja tutkimuksia ei ole tehty erillisten tutkimusten yhteydessä. F1-sukupolven vieroitetuista, paritukseen valituista poikasista tulee määrittää ikä emättimen avautuessa ja esinahan irtautuessa. Peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys on mitattava F1-sukupolven poikasilta syntymän jälkeisenä päivänä 0, mikäli F1-sukupolven sukupuolijakauman muutokset tai sukukypsyyden saavuttamisen ajoitus antavat siihen aihetta.

Toimintoja koskevia havaintoja ei tarvitse tehdä ryhmistä, jotka muutoin osoittavat selviä haittavaikutusten merkkejä (esimerkiksi merkittävä painonnousun väheneminen). Jos toiminnallisia tutkimuksia tehdään, niitä ei tule tehdä paritettaviksi valituille poikasille.

1.5.6 **Ruumiinavaus**

Rakenne-epämuodostumat tai patologiset muutokset tutkitaan makroskooppisesti lopettamisen tai tutkimuksen kuluessa sattuneen kuoleman yhteydessä kaikista poikasia saaneista eläimistä (P ja F1), kaikista poikasista, joissa on näkyviä epämuodostumia tai kliinisiä merkkejä, sekä yhdestä satunnaisesti F1- ja F2-sukupolvesta valitusta poikasesta kummastakin sukupuolesta ja kustakin poikueesta. Erityistä huomiota tulee kiinnittää lisääntymiselimiin. Kuolemaisillaan olevista poikasista, jotka lopetetaan inhimillisellä tavalla, sekä kuolleista poikasista (niiden ruumiin kunnon salliessa) tulee tutkia mahdolliset häiriöt ja/tai kuolinsyy, ja ruumiit tulee säilöä.

Kaikkien ensi kertaa poikineiden naaraiden kohduista tutkitaan implantaatiokohtien olemassaolo ja niiden määrä tavalla, joka ei haittaa histopatologista tutkimusta.

1.5.7 **Elinten paino**

Lopettamisen aikaan P- ja F1-sukupolven vanhemmilta määritetään ruumiinpaino sekä seuraavien elinten paino (parilliset elimet punnitaan erikseen):

— kohtu ja munasarjat,

— kivekset ja lisäkivekset (kokonaispaino ja häntäosan paino),

— eturauhanen,

— rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa sekä niiden nesteet ja eturauhanen (yhtenä kokonaisuutena),

— aivot, maksa, munuaiset, perna, aivolisäke, kilpirauhanen ja lisämunuaiset sekä määritetyt kohde-elimet.

F1- ja F2-sukupolvien ruumiinavaukseen valittujen poikasten paino määritetään lopetuksen yhteydessä. Kummastakin sukupuolesta ja kustakin poikueesta satunnaisesti valitulta poikaselta (katso kohta 1.5.6) punnitaan aivot, perna ja kateenkorva.

▼B

Ruumiinavaustulosten ja elinten punnitustulosten arvioinnissa tulee ottaa huomioon muissa toistuvaa annostelua käyttävissä tutkimuksissa tehdyt havainnot, milloin niitä on saatavissa.

1.5.8 **Histopatologinen tutkimus**

1.5.8.1 Poikasia saaneet eläimet

Poikasia saaneilta eläimiltä (P ja F1) irrotetaan seuraavat elimet ja kudokset tai niiden edustavat näytteet. Kudokset tai näytteet käsitellään fiksatiivilla ja säilötään sopivalla tavalla histopatologista tutkimusta varten.

— emätin, kohtu ja kohdunkaula sekä munasarjat (säilötään soveltuvassa fiksatiivissa),

— yksi kives (säilötään Bouinin fiksatiivissa tai vastaavassa), yksi lisäkives, rakkularauhaset, eturauhanen ja sen etuosa,

— etukäteen määritetyt kohde-elimet kaikilta paritukseen valituilta P- ja F1-eläimiltä.

Kaikille paritukseen valituille ylimpiin annosryhmiin ja kontrolliryhmiin kuuluville P- ja F1-sukupolven eläimille tulee tehdä edellä mainittujen elinten ja kudosten täydellinen histopatologinen tutkimus. P-sukupolven eläinten munasarjojen tutkimus ei ole pakollinen. Elimet, joissa todetaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, on tutkittava myös alemmissa ja keskikokoisissa annosryhmissä NOAEL-tason määrityksen helpottamiseksi. Lisäksi on tutkittava histopatologisin menetelmin lisääntymiselimet sellaisilta alempiin ja keskikokoisiin annosryhmiin kuuluvilta eläimiltä, joiden kohdalla epäillään vähentynyttä hedelmällisyyttä, toisin sanoen niiltä, jotka eivät pariutuneet, hedelmöityneet, siittäneet tai synnyttäneet terveitä poikasia, tai niiltä, joiden kiimasykliin tai sperman määrään, liikkuvuuteen tai morfologiaan testiaine vaikutti. Kaikki vakavat vauriot, kuten surkastumat tai kasvaimet on tutkittava.

Kivesten yksityiskohtaisella histopatologisella tutkimuksella (esimerkiksi Bouinin fiksatiivi, parafiinivalu ja 4–5 μm paksut poikittaisleikkeet) tulee määrittää käsittelyn aiheuttamat vaikutukset, kuten rauhaseen jääneet spermatidit, puuttuvat itusolukerrokset tai -tyypit, monitumaiset jättisolut tai spermatogeenisten solujen irtoaminen lumeniin (14). Koskemattomasta lisäkiveksestä tulee tutkia pää-, runko- ja häntäosa pitkittäisleikkeen avulla. Lisäkiveksestä tulee arvioida leukosyytti-infiltraatio, solutyyppien esiintyvyyden muutokset, aberrantit solutyypit sekä siemennesteen fagosytoosi. PAS- ja hematoksyliinivärjäystä voidaan käyttää urosten lisääntymiselinten tutkimukseen.

Imetyksen jälkeisen vaiheen munasarjojen pitäisi sisältää varhaismunarakkuloita ja kasvavia munarakkuloita sekä imetysvaiheen suuria keltarauhasia. Histopatologisessa tutkimuksessa olisi pystyttävä osoittamaan varhaismunarakkuloiden väheneminen kvalitatiivisesti. Varhaismunarakkuloiden kvantitatiivinen arvio tulee tehdä F1-sukupolven naaraille. Eläinten määrän, munasarjaleikkeen valinnan sekä leikkeen näytekoon tulee sopia käytettävään tilastolliseen arviointimenettelyyn. Tutkimuksessa on laskettava varhaismunarakkuloiden määrä, johon voidaan yhdistää pienten kasvavien munarakkuloiden määrä, jotta käsiteltyjä munasarjoja ja kontrolliryhmään kuuluvia munasarjoja voidaan verrata. (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2 Vieroitetut poikaset

Vakavasti epämuodostuneet kudokset ja kohde-elimet kaikilta poikasilta, joilla on ulkoisia epämuodostumia tai kliinisiä merkkejä, sekä yhdeltä sellaiselta F1- ja F2-sukupolvesta satunnaisesti valitulta poikaselta kummastakin sukupuolesta ja kustakin poikueesta, jota ei ole valittu paritukseen, käsitellään fiksatiivilla ja säilötään sopivalla tavalla histopatologista tutkimusta varten. Säilötyille kudoksille tehdään täydellinen histopatologinen määritys, jossa pääpaino on lisääntymiselinten tutkimisessa.

2. MÄÄRITYSTULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tiedot raportoidaan yksilöittäin ja esitetään taulukossa, jossa on eritelty testiryhmittäin ja sukupolvittain eläinten määrä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten määrä, milloin eläimet ovat kuolleet tai lopetettu, fertiilien eläinten määrä, tiineiden naaraiden määrä, niiden eläinten määrä, joissa myrkyllisyysvaikutuksia on havaittavissa, kuvaus havaituista myrkyllisyysvaikutuksista mukaan lukien myrkytysoireiden alkamisaika, kesto ja vakavuus, millaisia havaintoja vanhemmista ja poikasista on tehty, millaisia histopatologisia muutoksia on havaittu sekä kaikki asiaankuuluvat tiedot poikueesta.

Numeeriset tulokset arvioidaan sopivalla, yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä, joka on valittava tutkimusta suunniteltaessa ja jonka valinta on perusteltava. Annostasovasteiden tilastolliset mallit voivat olla avuksi tietojen analyysissa. Tutkimusselosteessa on oltava analyysimenetelmästä ja käytetystä tietokoneohjelmasta riittävät tiedot, jotta riippumaton arvioija/tilastoasiantuntija voi niiden avulla arvioida ja rekonstruoida analyysin.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI

Kaksi sukupolvea käsittävän lisääntymiskykyyn kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimuksen löydökset — mukaan lukien ruumiinavauslöydökset ja mikroskooppiset löydökset — on arvioitava havaittujen vaikutusten pohjalta. Arvioinnissa tulee todeta testiaineen annostason ja epämuodostumien tai häiriöiden — mukaan lukien vakavat vauriot, tietyt kohde-elimet, vaikutukset hedelmällisyyteen, kliiniset häiriöt, vaikutukset lisääntymiskykyyn ja poikueen kokoon/laatuun, ruumiinpainon muutokset, vaikutukset kuolleisuuteen sekä muut myrkyllisyysvaikutukset — esiintyvyyden ja vaikutusten vakavuuden välinen mahdollinen suhde. Testitulosten arvioinnissa on otettava huomioon testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet ja toksikokineettiset tiedot, milloin jälkimmäisiä on saatavissa.

Asianmukaisesti toteutetussa lisääntymiskykyyn kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimuksessa pitäisi saada tyydyttävä arvio haitattomasta annostasosta sekä tietoa haittavaikutuksista lisääntymiskykyyn, synnytykseen, imetykseen sekä syntymän jälkeiseen kehitykseen mukaan lukien kasvu ja sukupuolinen kehitys.

▼B

2.3 TULOSTEN TULKINTA

Kaksi sukupolvea käsittävä lisääntymiskykyyn kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimus tuottaa tietoja toistuvan testiainealtistuksen vaikutuksista kaikissa lisääntymiskierron vaiheissa. Erityisesti tutkimus tuottaa tietoja lisääntymisfysiologisista muuttujista sekä poikasten kehityksestä, kasvusta, sukukypsyyden saavuttamisesta ja eloonjäämisestä. Tutkimuksen tulokset on tulkittava yhdessä subkroonisten, prenataalisen kehityksen aikaisten ja toksikokineettisten sekä muiden käytettävissä olevien tutkimustulosten kanssa. Tämän tutkimuksen tulosten pohjalta voidaan arvioida tietyn kemikaalin jatkotutkimustarve. Tulosten ekstrapolointi koskemaan ihmistä on validia rajoitetussa määrin. Tuloksia voidaan parhaiten käyttää haitattoman annostason ja ihmisille sallitun altistuksen määrittämiseen (20) (21) (22) (23).

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1. TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet,

— tunnistetiedot,

— puhtaus.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji ja kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— toimittaja, häkit, ravinto, pesäntekoaineet ja niin edelleen,

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Testiolosuhteet:

— annostasojen valintaperusteet,

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, testiaineen saavutettu pitoisuus,

— valmisteen stabiilisuus ja tasalaatuisuus,

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta,

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

▼B

Tulokset:

— ravinnonotto sekä nautitun veden määrä, mikäli se on mitattu, ruumiinpainon lisäys nautittua ravintogrammaa kohti sekä saadun testiaineen määrä P- ja F1-eläimillä, lukuun ottamatta sitä aikaa, kun eläimet pidetään yhdessä, ja vähintään imetysajan viimeisen kolmanneksen aikana,

— absorptiotiedot (jos mitattu),

— paritukseen valittujen P- ja F1-eläinten painotiedot,

— poikueiden ja poikasten painotiedot,

— P-eläinten paino lopettamishetkellä sekä elinten absoluuttinen ja suhteellinen paino,

— kliinisten havaintojen laatu, vakavuus ja kesto (riippumatta siitä, korjaantuvatko vauriot myöhemmin),

— kuolinaika testin kuluessa tai elikö koe-eläin lopettamiseen asti,

— myrkkyvastetiedot sukupuolen ja annoksen mukaan sekä parituksen, hedelmällisyyden, tiineyden, syntymän, elinkelpoisuuden ja imetyksen indeksit; selosteessa tulee esittää luvut, joista nämä indeksit on laskettu,

— toksiset tai muut vaikutukset lisääntymisfysiologiaan, poikasiin, syntymänjälkeiseen kasvuun ja niin edelleen,

— ruumiinavauslöydökset,

— yksityiskohtaiset tiedot kaikista histopatologisista löydöksistä,

— P- ja F1 -sukupolvien niiden naaraiden lukumäärä, joilla on normaali kiimasykli, sekä syklin pituus,

— lisäkiveksen hännän siittiöiden kokonaismäärä, progressiivisesti liikkuvien siittiöiden prosenttiosuus, morfologisesti normaalien siittiöiden prosenttiosuus ja poikkeavien siittiöiden prosenttiosuus kunkin tietyn poikkeavuuden mukaan,

— aika pariutumiseen asti, mukaan lukien pariutumista edeltävien päivien määrä,

— tiineyden kesto,

— implantaatioiden ja keltarauhasten määrä sekä poikueiden koko,

— elävänä syntyneiden poikasten määrä ja implantaation jälkeen tapahtuneet abortoitumiset,

— selvästi näkyvistä epämuodostumista kärsivien poikasten lukumäärä; erityisen pienikasvuisten poikasten lukumäärä, jos se on määritetty,

— tiedot poikasten fyysisistä kehitysvaiheista ja muut syntymän jälkeisen kehityksen tiedot; arvioitujen kehitysvaiheiden valinta on perusteltava,

— poikasten ja aikuisten toiminnallisesta havainnoinnista saadut tiedot soveltuvin osin,

— tulosten tilastollinen käsittely tapauksen mukaan.

▼B

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset, mukaan lukien haitattoman altistustason (NOAEL) arvot emojen ja poikasten osalta.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons. Teoksessa: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (toim.), 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. Teoksessa: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida, s. 319–333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401–415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8: 330–337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6: 491–505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17: 298–303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (toim.) (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. Teoksessa: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (toim.), Plenum, New York, pp. 421–426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. Teoksessa: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (toim.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5: 379–383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. Teoksessa: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston, and C.A. Kimmel, (toim.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. Teoksessa: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (toim.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. Teoksessa: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (toim.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). Teoksessa: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (toim.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). Teoksessa: Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (toim.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36 **TOKSIKOKINETIIKKA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 417 (2010). Testikemikaalin toksikokinetiikkaa tarkastelevien tutkimusten tavoitteena on tuottaa tietoa kemikaalin imeytymisestä, jakautumisesta, biotransformaatiosta (esimerkiksi metaboliasta) ja erittymisestä, jotta pitoisuus tai annos voidaan suhteuttaa havaittuun myrkyllisyyteen ja jotta kemikaalin myrkyllisyyden mekanismia opitaan ymmärtämään paremmin. Toksikokinetiikka voi auttaa ymmärtämään toksikologisia tutkimuksia, sillä sen avulla voidaan osoittaa, että koe-eläimet altistuvat testikemikaalille systemaattisesti. Lisäksi sen avulla voidaan määrittää, mitkä ovat kiertäviä osia (alkuperäinen kemikaali / metaboliitit). Näiden tutkimusten perusteella määritetyt toksikokineettiset perusparametrit tuottavat tietoa myös testikemikaalin mahdollisesta kertyvyydestä kudoksiin ja/tai elimiin sekä testikemikaalille altistumisen aiheuttamasta mahdollisesta biotransformaatiosta.

2. Toksikokineettiset tiedot voivat vaikuttaa myös eläinmyrkyllisyystietojen asianmukaisuuden ja oleellisuuden arviointiin, kun tietoja ekstrapoloidaan ihmisiin kohdistuvien vaarojen ja/tai riskien arviointia varten. Lisäksi toksikokineettisistä tutkimuksista voidaan saada hyödyllistä tietoa annostasojen määrittämisestä myrkyllisyystutkimuksia varten (lineaarinen vs. ei-lineaarinen kinetiikka), antoreittiin liittyvistä vaikutuksista, biologisesta hyötyosuudesta sekä tutkimussuunnitelmaan liittyvistä seikoista. Tietyntyyppisiä toksikokineettisiä tietoja voidaan käyttää fysiologiaan perustuvan toksikokineettisen mallin kehittämisessä.

3. Metaboliitteihin liittyville ja toksikokineettisille tiedoille on tärkeitä käyttötarkoituksia: niiden avulla voidaan esimerkiksi ennustaa mahdollisia myrkyllisyyksiä ja vaikutustapoja sekä niiden suhdetta annostasoon ja altistumisreittiin. Metaboliatiedoista voidaan lisäksi saada hyödyllistä tietoa, jota voidaan käyttää arvioitaessa testikemikaalin eksogeenisesti tuottamille metaboliiteille altistumisen toksikologista merkitystä.

4. Asianmukaisten toksikokineettisten tietojen avulla voidaan vahvistaa kvantitatiivisten rakenne-aktiivisuussuhteiden sekä interpolointiin tai ryhmittelyyn perustuvien toimintatapojen hyväksyttävyyttä ja sovellettavuutta kemikaalien turvallisuuden arvioinnissa. Kinetiikkatietoja voidaan käyttää myös muiden tutkimusten toksikologisen merkityksen arvioinnissa (esimerkiksi *in vivo / in vitro*).

5. Tätä testimenetelmää voidaan soveltaa, kun testikemikaalia annetaan suun kautta, ellei muuta antoreittiä ole mainittu (katso etenkin 74–78 kohta).

ALUSTAVAT HUOMIOT

6. Eri luokkiin kuuluvien kemikaalien (esimerkiksi torjunta-aineet, biosidit, teollisuuskemikaalit) toksikokinetiikkaan liittyvien tutkittavien ominaisuuksien ja parametrien mittauksen osalta sääntelyjärjestelmissä on erilaisia vaatimuksia ja tarpeita. Toisin kuin useimmissa testimenetelmissä, tässä testimenetelmässä kuvataan toksikokineettistä testausta, johon sisältyy monia mittauksia ja tutkittavia ominaisuuksia. Tulevaisuudessa saatetaan kehittää lukuisia uusia testimenetelmiä ja/tai ohjeasiakirjoja, joissa kutakin tutkittavaa ominaisuutta kuvataan erikseen ja tarkemmin. Tämän testimenetelmän osalta se, mitä testejä tai arviointeja tehdään, määräytyy kunkin sääntelyjärjestelmän vaatimusten ja/tai tarpeiden mukaisesti.

▼M4

7. Kun testikemikaalia arvioidaan sääntelytarkoituksia varten, sen toksikokineettisen käyttäytymisen määrittämiseksi voidaan joutua tekemään useita tutkimuksia. Tiettyjen sääntelytarpeiden tai tilanteiden mukaan kaikki mahdolliset tutkimukset eivät kuitenkaan ole välttämättä tarpeen testikemikaalin arvioinnissa. Toksikokineettisten tutkimusten suunnittelussa tarvitaan siis joustavuutta, kun otetaan huomioon tutkittavan testikemikaalin ominaisuudet. Joissakin tapauksissa on selvitettävä vain tietyt kysymykset testikemikaaliin liittyviä vaaroja ja riskejä koskevien huolenaiheiden hälventämiseksi. Joissakin tilanteissa toksikokineettisiä tietoja voidaan kerätä muissa tutkimuksissa tehtävän arvioinnin yhteydessä. Toisissa tilanteissa ylimääräiset ja/tai kattavammat toksikokineettiset tutkimukset voivat olla tarpeen sen mukaan, mitkä ovat sääntelytarpeet ja/tai herääkö testikemikaalin arvioinnin aikana uusia kysymyksiä.

8. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista ja sen oleellisista metaboliiteista ja niiden analogeista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tähän voi sisältyä muiden oleellisten testimenetelmien avulla saatuja tietoja (*in vivo* -tutkimukset, *in vitro* -tutkimukset ja/tai *in silico* -arvioinnit). Seuraavista tiedoista voi olla hyötyä tutkimuksen suunnittelussa ja tulosten tulkinnassa: kemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kuten oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin (ilmaistuna log P_{OW} -arvona), pKa, vesiliukoisuus, höyrynpaine ja molekyylipaino. Ne voidaan määrittää asianmukaisin menetelmin, jotka on kuvattu kulloisissakin testimenetelmissä.

RAJOITUKSET

9. Tätä testimenetelmää ei ole tarkoitettu käytettäväksi erityisolosuhteissa, kuten tiineiden tai imettävien eläinten ja niiden jälkeläisten yhteydessä tai arvioitaessa elintarvikkeita tuottavissa altistuneissa eläimissä olevia mahdollisia jäämiä. Testimenetelmän B.36 mukaisen tutkimuksen tuottamista tiedoista voidaan kuitenkin saada taustatietoa, joka ohjaa nimenomaan näihin seikkoihin liittyvien tutkimusten suunnittelua. Tätä testimenetelmää ei ole tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. OECD:n testiohjeiden sovellettavuutta nanomateriaaleihin koskevasta alustavasta arvioinnista laadittu raportti viittaa siihen, että testiohje nro 417 (joka vastaa tätä testimenetelmää B.36) ei välttämättä sovellu nanomateriaaleihin (1).

MÄÄRITELMÄT

10. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä.

ELÄINTEN HYVINVOINTIA KOSKEVAT HUOMAUTUKSET

11. Ohjeita eläinten humaanista käsittelystä on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (2). OECD:n ohjeasiakirjaan GD 19 on suositeltavaa tutustua kaikkien tässä testimenetelmässä kuvattujen *in vitro*- ja *in vivo* -tutkimusten yhteydessä.

MENETELMIEN KUVAUS

Esitutkimukset

12. Esitutkimusten käyttö on erittäin suositeltavaa, kun valitaan toksikokineettisten tutkimusten kokeellisia parametreja (kuten metabolia, massatase, analyysimenetelmät, annoksen määritys, uloshengitysilman CO_2-pitoisuus jne.). Kemikaalia ei välttämättä tarvitse leimata radioaktiivisesti luonnehdittaessa joitakin näistä parametreista.

▼M4

Eläinten valinta

Laji

13. Toksikokinetiikan testauksessa käytettävän eläinlajin (ja kannan) on oltava mieluiten sama kuin muissa kyseisen testikemikaalin yhteydessä toteutetuissa toksikologisissa tutkimuksissa. Yleensä on käytettävä rottaa, koska sitä on käytetty laajalti toksikologisissa tutkimuksissa. Toisten tai ylimääräisten lajien käyttö voi olla perusteltua, jos kriittisistä toksikologisista tutkimuksista on saatu näyttöä merkittävästä myrkyllisyydestä näissä lajeissa tai jos niihin liittyvä myrkyllisyys/toksikokinetiikka osoittautuu olevan ihmisen kannalta merkityksellisempää. Eläinlajin ja kannan valinta on perusteltava.

14. Ellei muuta ole mainittu, tässä testimenetelmässä testilajilla tarkoitetaan rottaa. Tiettyjä menetelmän näkökohtia voi olla tarpeen muokata, jos käytetään muita testilajeja.

Ikä ja kanta

15. Tutkimuksessa tulee käyttää nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä (ikä annostelun aikana yleensä 6–12 viikkoa) (katso myös 13 ja 14 kohta). Jos tutkimuksessa käytetään muita kuin nuoria täysikasvuisia eläimiä, se on perusteltava. Kaikkien eläinten on oltava samanikäisiä tutkimuksen alussa. Yksittäisten eläinten paino saa vaihdella enintään ± 20 prosenttia testiryhmän keskipainosta. Käytettävän kannan on oltava mieluiten sama kuin se, jota on käytetty testikemikaalia koskevan toksikologisen tietokannan laatimisessa.

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

16. Jokaista testattavaa annosta kohti on käytettävä vähintään neljää eläintä, joiden sukupuoli on sama. Käytettävien eläinten sukupuolen valinta on perusteltava. Kummankin sukupuolen (neljän uroksen ja neljän naaraan) käyttöä on harkittava, jos on näyttöä siitä, että myrkyllisyydessä on huomattavia sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Yleensä eläimet on pidettävä häkeissä yksittäin testijakson ajan. Ryhmähäkeissä pitäminen voi olla perusteltua tietyissä olosuhteissa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C) ja suhteellisen ilmankosteuden 30–70 prosenttia. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Testikemikaali

18. Tutkimuksen kaikissa massataseen ja metaboliittien määrityksissä on käytettävä ^{14}C-leimattua radioaktiivista testikemikaalia. Jos voidaan osoittaa, että

— massatase ja metaboliitit voidaan määrittää asianmukaisesti käyttämällä muuta kuin radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia

— ei-radioaktiivisen testikemikaalin kanssa käytetyn menetelmän analyyttinen tarkkuus ja herkkyys on sama tai parempi kuin se, joka olisi voitu saada radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia käyttäen

▼M4

radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia ei tarvitse käyttää. Myös muita radioaktiivisia ja vakaita isotooppeja voidaan käyttää varsinkin, jos kyseinen osa aiheuttaa testikemikaalin myrkyllisyyden tai on osa sitä. Jos mahdollista, radioleima on sijoitettava metabolisesti vakaan molekyylin (joka ei ole vaihdettavissa, ei poistu metabolisesti CO_2:na eikä tule osaksi organismin hiilipoolia eli biomassaa) ydinosaan. Molekyyli voi olla tarpeen leimata useista paikoista tai tietyiltä alueilta, jotta testikemikaalin metabolista kulkeutumista voidaan seurata.

19. Radioaktiivisesti leimatut ja leimaamattomat testikemikaalit on analysoitava asianmukaisilla menetelmillä puhtauden ja identiteetin määrittämiseksi. Radioaktiivisen testikemikaalin on oltava radioaktiivisesti niin puhdas kuin tietylle testikemikaalille on mahdollista (puhtausasteen on oltava mieluiten yli 95 prosenttia). Epäpuhtaudet, joiden pitoisuus on vähintään kaksi prosenttia, on pyrittävä tunnistamaan. Puhtaus sekä määritettyjen epäpuhtauksien identiteetti ja pitoisuus on ilmoitettava. Yksittäisissä sääntelyohjelmissa voidaan antaa lisäohjeita seoksista koostuvien testikemikaalien määrittämistä ja spesifikaatioita sekä puhtauden määrittämiseen tarkoitettujen menetelmien valintaa varten.

Annoksen valinta

Esitutkimus

20. Tavallisesti esitutkimukseen riittää kerta-annos suun kautta. Annoksen on oltava myrkytön mutta riittävän suuri, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit ja jotta voidaan täyttää esitutkimuksen ilmoitettu tarkoitus tämän testimenetelmän 12 kohdassa todetun mukaisesti.

Päätutkimukset

21. Päätutkimuksissa on suotavaa käyttää vähintään kahta annosta, sillä vähintään kahdesta annosryhmästä saatavista tiedoista voi olla apua määritettäessä annoksia muihin myrkyllisyystutkimuksiin ja arvioitaessa jo saatavilla olevien myrkyllisyystestien annosvastetta.

22. Kahta annosta käytettäessä molempien on oltava riittävän suuria, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit. Myrkyllisyystiedot on otettava huomioon annoksen valinnassa. Jos tietoja ei ole saatavilla (esimerkiksi akuuteista suun kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä käsittelevistä tutkimuksista, joihin on kirjattu myrkyllisyyden kliiniset merkit, tai toistuvan annoksen myrkyllisyyttä käsittelevistä tutkimuksista), suuremmaksi annokseksi voidaan harkita arvoa, joka on pienempi kuin LD_{50}-estimaatti (suun ja ihon kautta) tai LC_{50}-estimaatti (hengitysteiden kautta) tai akuutin myrkyllisyystason estimaatin pienempi arvo. Pienemmän annoksen tulee olla jokin osuus suuremmasta annoksesta.

23. Jos tutkitaan vain yhtä annostasoa, annoksen on oltava riittävän suuri, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit, mutta annoksen ei tule aiheuttaa ilmeistä myrkyllisyyttä. Lisäksi on perusteltava, miksi tutkimukseen ei sisällytetty toista annostasoa.

24. Jos on määritettävä annoksen vaikutus kineettisiin prosesseihin, kaksi annosta ei välttämättä riitä, ja vähintään yhden annoksen on oltava riittävän suuri näiden prosessien saturoimiseksi. Jos plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala (AUC-arvo) ei ole lineaarinen kahden päätutkimuksessa käytetyn annostason välillä, se on vahva osoitus siitä, että yksi tai useampi kineettinen prosessi saturoituu jossain kohdassa kahden annostason välillä.

▼M4

25. Sellaisten testikemikaalien yhteydessä, joiden myrkyllisyys on vähäistä, on käytettävä enimmäisannosta 1 000 mg painokiloa kohti (suun ja ihon kautta -antoreitit) (jos annostelu tapahtuu hengitysteiden kautta, katso ohjeet tämän liitteen luvusta B.2; yleensä tämä annos on enintään 2 mg/l). Kemikaalikohtaisten pohdintojen perusteella suurempi annos voi olla tarpeen sen mukaan, mitkä ovat sääntelytarpeet. Annoksen valinta on aina perusteltava.

26. Tiedot kerta-annoksen toksikokinetiikasta ja kudoksiin jakaantumisesta saattavat riittää mahdollisen kertyvyyden ja/tai pysyvyyden määrittämiseksi. Tietyissä olosuhteissa saatetaan kuitenkin tarvita toistuvan annoksen annostelu, jotta i) mahdollista kertyvyyttä ja/tai pysyvyyttä tai toksikokineettisiä muutoksia (esimerkiksi entsyymi-induktiota ja -estoa) voidaan käsitellä tarkemmin, tai ii) jos sovellettava sääntelyjärjestelmä edellyttää sitä. Vaikka tutkimuksissa, joissa käytetään toistuvaa annostelua, pienen annoksen toistuva annostelu yleensä riittää, suuren annoksen toistuva annostelu voi kuitenkin olla tarpeen tietyissä olosuhteissa (katso myös 57 kohta).

Testikemikaalin annostelu

27. Testikemikaali on liuotettava tai suspendoitava tasaisesti samaan kantaja-aineeseen, jota on käytetty muissa testikemikaalilla tehdyissä tutkimuksissa, joissa tarkasteltiin suun kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä ja joissa käytettiin ruokintaletkua, mikäli kantaja-aineesta on saatavilla tällaisia tietoja. Kantaja-aineen valinta on perusteltava. Kantaja-aineen valinta ja annostelutilavuus on otettava huomioon tutkimuksen suunnittelussa. Tavanomainen antotapa on ruokintaletkun kautta, mutta tietyissä tilanteissa kemikaali voi olla parempi antaa gelatiinikapselissa tai ravinnon seassa (kummassakin tapauksessa on esitettävä perustelut). Jokaiselle eläimelle annettu todellinen annos on vahvistettava.

28. Ruokintaletkun kautta kerrallaan annosteltavan nesteen enimmäistilavuus määräytyy koe-eläinten koon, annoksen kantaja-aineen tyypin ja sen mukaan, onko eläin pidetty ravinnotta ennen testikemikaalin antamista. Ravinnon antaminen tai ravinnotta pitäminen ennen annostelua on perusteltava. Yleensä tilavuus on pidettävä niin pienenä kuin vesipitoisten tai muiden kuin vesipitoisten kantaja-aineiden osalta on käytännöllistä. Jyrsijöillä annoksen tilavuus saa yleensä olla enintään 10 ml painokiloa kohti. Lipofiilisempien testikemikaalien kanssa käytettävien kantaja-aineiden aloitustilavuus voi olla 4 ml painokiloa kohti. Toistuvassa annostelussa on harkittava pienempiä annostilavuuksia (esimerkiksi 2–4 ml painokiloa kohti), kun eläinten pitäminen ravinnotta päivittäin on vasta-aiheista. Mikäli mahdollista, on harkittava sen annostilavuuden käyttämistä, joka annettiin suun kautta ruokintaletkulla muissa testikemikaalin tutkimuksissa.

29. Testikemikaali voidaan annostella suonensisäisesti, ja testikemikaalin pitoisuus veressä ja/tai eritteissä voidaan mitata biologisen hyötyosuuden tai suhteellisen oraalisen absorption määrittämiseksi. Suonensisäistä annostelua koskevassa tutkimuksessa testikemikaalia annetaan kerta-annos (joka on yleensä enintään pienemmän suun kautta annettavan annoksen suuruinen, katso annoksen valinta -kohta) käyttäen asianmukaista kantaja-ainetta. Tätä ainetta on annettava sopiva tilavuus (esimerkiksi 1 ml painokiloa kohti) valittuun antopaikkaan vähintään neljälle sopivaa sukupuolta edustavalle eläimelle (molempia sukupuolia voidaan käyttää, mikäli tarpeen, katso 16 kohta). Kun testikemikaalia annetaan suonensisäisesti, annos on valmisteltava siten, että kemikaali on täysin liuennut tai suspendoitunut. Suonensisäisessä annostelussa käytettävä kantaja-aine ei saa rikkoa verisuonia tai

▼M4

häiritä verenvirtausta. Jos testikemikaali annetaan infuusiona, infuusionopeus on ilmoitettava ja se on pidettävä vakiona eläinten välillä, jos käytetään infuusiopumppua. Jos eläimelle asetetaan kanyyli kaulalaskimoon (testikemikaalin antamista ja/tai verinäytteiden ottamista varten) tai jos annosteluun käytetään reisilaskimoa, on käytettävä anestesiaa. Anestesian tyyppi on valittava huolellisen harkinnan perustella, sillä se voi vaikuttaa toksikokinetiikkaan. Eläinten on annettava toipua riittävästi ennen testikemikaalin ja kantaja-aineen annostelua.

30. Muita antoreittejä, kuten suun ja hengitysteiden kautta, (katso 74–78 kohta), voidaan käyttää tiettyjen testikemikaalien yhteydessä, kun otetaan huomioon niiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja ihmisten odotuksenmukainen käyttö tai altistuminen.

Mittaukset

Massatase

31. Massatase määritetään laskemalla yhteen annetun (radioaktiivisen) annoksen prosenttiosuus, joka on erittynyt virtsaan, ulosteeseen ja uloshengitysilmaan, sekä prosenttiosuus, joka on kudoksissa, eläimen ruumiin jäännöksissä ja koe-eläinhäkin pesuvedessä (katso 46 kohta). Yleensä annostellun (radioaktiivisesti leimatun) testikemikaalin kokonaissaantoja pidetään riittävinä, kun ne ovat vähintään 90 prosenttia.

Imeytyminen

32. Alustava arvio imeytymisestä saadaan vähentämällä maha-suolikanavassa ja/tai ulosteessa olevan annoksen prosenttiosuus määritetystä massataseesta. Katso lisätietoja imeytymisen prosenttiosuuden laskemisesta 33 kohdasta. Lisätietoja eritteiden tutkimisesta on 44–49 kohdassa. Jos suun kautta annostelun jälkeisen imeytymisen määrää ei voida määrittää tarkasti massatasetutkimusten perusteella (esimerkiksi kun ulosteessa on yli 20 prosenttia annetusta annoksesta), lisätutkimukset voivat olla tarpeen. Nämä tutkimukset voivat koostua joko 1) testikemikaalin annostelusta suun kautta ja testikemikaalipitoisuuden mittaamisesta sapessa tai 2) testikemikaalin annostelusta suun kautta ja suonensisäisesti sekä testikemikaalin nettopitoisuuden mittaamisesta virtsassa, uloshengitysilmassa ja eläimen ruumiissa kummankin antoreitin osalta. Kummassakin tutkimusmenetelmässä radioaktiivisuuden mittaus toteutetaan testikemikaalin ja metaboliittien kemikaalikohtaisen analyysin korvaavana menetelmänä.

33. Jos tehdään sappeen erittymistä koskeva tutkimus, käytetään yleensä suun kautta -antoreittiä. Tässä tutkimuksessa kanyloidaan vähintään neljän sopivaa sukupuolta edustavan eläimen (tai tarvittaessa kumpaakin sukupuolta edustavien eläinten) sappitiehyet, ja eläimille annetaan kerta-annos testikemikaalia. Testikemikaalin annostelun jälkeen radioaktiivisuuden/testikemikaalin erittymistä sappeen on seurattava niin pitkään kuin on tarpeen, jotta annetusta annoksesta voidaan arvioida se prosenttiosuus, joka erittyy tätä reittiä. Sen avulla voidaan laskea suoraan suun kautta tapahtuvan imeytymisen määrä seuraavasti:

$$\text{Imeytymisen prosenttiosuus} = \frac{(\text{määrä sapessa} + \text{virtsassa} + \text{uloshengitysilmassa} + \text{ruumiissa ilman maha} - \text{suolikanavan sisältöä})}{\text{annettu annos}} \times 100$$

34. Tiettyihin luokkiin kuuluvien testikemikaalien osalta imeytynyt annos voi erittyä suolen limakalvojen kautta. Näissä tapauksissa katsotaan, että ulosteessa olevan annoksen prosenttiosuuden mittaus rotilta, joiden sappitiehyt on kanyloitu ja joille annos on annettu suun kautta, ei edusta imeytymätöntä annosta. Kun suoleen erittymistä oletetaan tapahtuvan, on suositeltavaa, että imeytyneen annoksen prosenttiosuus perustuu imeytymiseen, joka lasketaan vertaamalla suun kautta -reitin ja suonensisäisen reitin erittymistä (kanyloimaton tai sappitiehyeen kanyloitu rotta) (katso 35 kohta). Lisäksi suositellaan, että jos suoleen erittymisen kvantifiointia pidetään tarpeellisena, erittyminen mitataan myös rotalta, jonka sappitiehyt on kanyloitu, annoksen suonensisäisen annostelun jälkeen.

▼M4

Biologinen hyötyosuus

35. Biologinen hyötyosuus voidaan määrittää suun kautta ja suonensisäisen annostelun ryhmien plasman/veren kinetiikasta 50–52 kohdassa kuvatun mukaisesti testikemikaalin ja/tai tärkeimpien metaboliittien spesifisellä kemiallisella analyysilla, jolloin radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia ei tarvita. Testikemikaalin tai tärkeimmän metaboliitin (tärkeimpien metaboliittien) biologinen hyötyosuus (F) voidaan laskea seuraavasti:

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

Tässä yhtälössä AUC on plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala ja exp tarkoittaa testattua antoreittiä (suun, ihon tai hengitysteiden kautta).

36. Systeemisten vaikutusten riskinarvioinnissa myrkyllisen komponentin biologista hyötyosuutta pidetään yleensä ensisijaisena imeytymisen prosenttiosuuteen nähden, kun eläinkokeiden systeemisiä pitoisuuksia verrataan vastaaviin biomonitorointitietoihin, jotka on saatu työntekijöiden altistumistutkimuksista. Tilanne voi muuttua monimutkaisemmaksi, jos annokset ovat ei-lineaarisella alueella, joten on tärkeää, että toksikokineettisessä seulonnassa määritetään lineaarisen alueen annokset.

Kudoksiin jakautuminen

37. Tieto testikemikaalin ja/tai sen metaboliittien jakautumisesta kudoksiin on tärkeää kohdekudosten tunnistamiseksi, myrkyllisyyden taustalla olevien mekanismien ymmärtämiseksi sekä tiedon saamiseksi testikemikaalin ja sen metaboliittien mahdollisesta kertyvyydestä ja pysyvyydestä. Kudoksissa ja eläimen ruumiissa olevan (radioaktiivisen) kokonaisannoksen prosenttiosuus on mitattava vähintään erityskokeen päättyessä (yleensä viimeistään seitsemän päivän kuluttua annoksen antamisesta tai aikaisemmin testikemikaalille tyypillisen käyttäytymisen mukaan). Jos kudoksissa ei havaita testikemikaalia tutkimuksen päättyessä (esimerkiksi sen takia, että testikemikaali on voinut eliminoitua ennen tutkimuksen päättymistä lyhyen puoliintumisajan vuoksi), tulosten tulkinnassa on oltava huolellinen virhetulkintojen välttämiseksi. Tällaisissa tilanteissa kudoksiin jakautumista on tutkittava samalla kun tutkitaan testikemikaalin (ja/tai metaboliitin) huippupitoisuutta plasmassa/veressä (T_{max}) tai virtsaan erittymisen huippunopeutta, mikäli tarpeen (katso 38 kohta). Lisäksi tietyissä aikapisteissä on mahdollisesti otettava kudosnäytteitä, jotta voidaan arvioida testikemikaalin ja/tai sen metaboliittien jakautumista kudoksiin sekä aikariippuvuutta (mikäli tarpeen). Siitä on apua myös massataseen määrittämisessä ja/tai muissa seikoissa sen mukaan, mitä toimivaltainen viranomainen edellyttää. Kudosnäytteet on otettava seuraavista kudoksista: maksa, rasva, maha-suolikanava, munuaiset, perna, kokoveri, eläimen ruumis, kohde-elimen kudokset ja muut sellaiset kudokset, joilla voi olla merkitystä testikemikaalin toksikologisessa arvioinnissa (esimerkiksi kilpirauhanen, punasolut, lisääntymiselimet, iho, silmät (etenkin värillisillä eläimillä)). Ylimääräisten kudosten analyysia samoissa aikapisteissä on harkittava, jotta eläimiä voidaan käyttää mahdollisimman tehokkaasti, ja erityisesti silloin, kun kohde-elimeen kohdistuvaa myrkyllisyyttä havaitaan subkroonisissa tai kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa. (Radioaktiivinen) jäämäpitoisuus ja kudos/plasma-pitoisuussuhde on myös ilmoitettava.

38. Lisäksi kudokseen jakautumisen arviointia voidaan tarvita muissa aikapisteissä, kuten plasman/veren huippupitoisuuden (esimerkiksi T_{max}) tai virtsaan erittymisen huippunopeuden aikana (ne on selvitetty plasman/veren kinetiikkaa tai erittymistä käsittelevissä kokeissa). Myös toimivaltainen viranomainen voi edellyttää näitä arviointeja. Nämä tiedot voivat olla hyödyllisiä, kun pyritään ymmärtämään myrkyllisyyttä sekä testikemikaalin ja metaboliittien kertyvyyttä ja pysyvyyttä. Näytteiden valinta on perusteltava; yleensä analysoitavien näytteiden on oltava samoja kuin edellä mainitut (katso 37 kohta).

▼M4

39. Radioaktiivisuuden kvantifiointi kudoksiin jakautumista käsittelevissä tutkimuksissa voidaan toteuttaa seuraavilla menetelmillä: elinten dissekointi, homogenisointi, polttaminen ja/tai liuottaminen sekä talteen otettujen jäämien nestetuikelaskenta (LSC). Tietyt tekniikat, esimerkiksi määrällinen koko kehon autoradiografia ja reseptoreiden mikroskooppinen autoradiografia, voivat osoittautua hyödyllisiksi, kun määritetään testikemikaalin jakautumista elimiin ja/tai kudoksiin (3) (4), vaikka näiden tekniikoiden kehitys on eri vaiheessa.

40. Muiden altistumisreittien kuin suun kautta -reitin osalta näytteet on kerättävä ja analysoitava tietyistä kudoksista, esimerkiksi inhalaatiotutkimuksissa keuhkoista ja ihotutkimuksissa ihosta. Katso 74–78 kohta.

Metabolia

41. Eritteistä (ja plasmasta, jos tarpeen) on otettava näytteet, jotta muuttumaton testikemikaali ja metaboliitit voidaan määrittää ja kvantifioida 44–49 kohdassa kuvatun mukaisesti. Näytteiden yhdistäminen metaboliittien määrittämiseksi tietyssä annosryhmässä on hyväksyttävää. Metaboliittien profilointi kultakin ajanjaksolta on suositeltavaa. Jos tämä ei ole mahdollista näytteiden puuttumisen ja/tai radioaktiivisuuden vuoksi, virtsa- ja ulostenäytteiden yhdistäminen eri aikapisteistä on hyväksyttävää. Sen sijaan eri sukupuolilta peräisin olevien tai eri annoksiin liittyvien näytteiden yhdistäminen ei ole hyväksyttävää. Käsiteltyjen eläinten virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman (ja tarvittaessa sapen) radioaktiivisuus on arvioitava käyttäen asianmukaisia laadullisia ja määrällisiä menetelmiä.

42. Kaikki metaboliitit, joiden määrä on vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, on pyrittävä määrittämään, jotta testikemikaalista voidaan laatia metaboliamalli. Testikemikaalit, joiden määrän eritteissä on havaittu olevan vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, on määritettävä. Määrittäminen tarkoittaa komponenttien tarkkaa rakenteellista määrittelemistä. Tavallisesti määritys tehdään joko metaboliitin rinnakkaiskromatografialla tunnettujen standardien mukaisesti käyttäen kahta erilaista järjestelmää tai tekniikoita, joilla positiivinen rakennemääritys on mahdollista. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi massaspektrometria, ydinmagneettiresonanssispektroskopia (NMR) jne. Rinnakkaiskromatografian osalta kromatografiatekniikoita, joissa hyödynnetään samaa paikallaan pysyvää faasia kahden erilaisen liuotinjärjestelmän kanssa, ei pidetä riittävänä kahden menetelmän varmistuksena metaboliitin identiteetille, koska menetelmät eivät ole toisistaan riippumattomia. Rinnakkaiskromatografialla määrittäminen on tehtävä käyttämällä kahta erilaista, analyyttisesti riippumatonta järjestelmää, kuten ohutlevykromatografiaa (käänteisfaasi- ja suorafaasi-TLC:tä) ja korkean suorituskyvyn nestekromatografiaa (HPLC:tä). Jos kromatografinen erottelu on laadultaan hyväksyttävä, spektroskopian keinoin tehtävä lisävahvistus ei ole tarpeen. Selvä määritys voidaan tuottaa vaihtoehtoisesti menetelmillä, joista saadaan rakenteellista tietoa. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi nestekromatografia/massaspektrometria (LC-MS) tai nestekromatografia / kaksivaiheinen massaspektrometria (LC-MS/MS), kaasukromatografia/massaspektrometria (GC-MS) ja NMR-spektrometria.

43. Jos ei ole mahdollista määrittää metaboliitteja, joiden pitoisuus on vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, loppuraportissa on esitettävä sille perustelut tai selitys. Voi olla tarkoituksenmukaista määrittää myös metaboliitteja, joiden pitoisuus on alle viisi prosenttia annetusta annoksesta. Tämä auttaa ymmärtämään metaboliareittiä testikemikaaliin liittyvien vaarojen ja/tai riskin arvioimisen kannalta paremmin. Rakenne on vahvistettava aina kun mahdollista. Tähän voi sisältyä myös profilointi plasmassa tai veressä tai muissa kudoksissa.

▼M4

Erittyminen

44. Annetun annoksen erittymisnopeus ja -määrä on määritettävä mittaamalla virtsasta, ulosteesta ja uloshengitysilmasta talteen otetun (radioaktiivisen) annoksen prosenttiosuus. Näistä tiedoista on apua myös massataseen määrittämisessä. Virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman kautta erittyneen testikemikaalin määrät on määritettävä sopivin väliajoin (katso 47–49 kohta). Toistuvan annoksen kokeet on suunniteltava asianmukaisesti siten, että erittymistietojen kerääminen on mahdollista 26 kohdassa kuvattujen tavoitteiden saavuttamiseksi. Tämän avulla vertailu kerta-annoskokeisiin on mahdollista.

45. Jos esitutkimus on osoittanut, ettei testikemikaalia (radioaktiivisuutta) erity uloshengitysilmaan suuria määriä (49 kohdan mukaisesti), varsinaisessa tutkimuksessa ei tarvitse kerätä uloshengitysilmaa.

46. Jokainen eläin on sijoitettava erilliseen metaboliahäkkiin eritteiden (virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman) keräämistä varten. Kunkin keräysvaiheen lopuksi (katso 47–49 kohta) metaboliahäkit on huuhdeltava sopivalla liuottimella (tätä kutsutaan ”häkin pesuvedeksi”), jotta varmistetaan, että testikemikaalia saadaan talteen mahdollisimman paljon (radioaktiivisuus). Eritteiden kerääminen on lopetettava seitsemäntenä päivänä tai sen jälkeen, kun vähintään 90 prosenttia annetusta annoksesta on saatu talteen sen mukaan, kumpi vaatimus täyttyy ensin.

47. Testikemikaalin (radioaktiivisuuden) kokonaismäärät virtsassa on määritettävä vähintään kahdessa aikapisteessä ensimmäisenä keruupäivänä. Toisen niistä on oltava 24 tuntia annostelun jälkeen. Sen jälkeen tämä on tehtävä päivittäin tutkimuksen päättymiseen saakka. Useamman kuin kahden näytteenottoajankohdan käyttäminen ensimmäisenä päivänä (esimerkiksi 6, 12 ja 24 tunnin kuluttua) on suositeltavaa. Esitutkimusten tulokset tulee analysoida tietojen saamiseksi vaihtoehtoisista tai ylimääräisistä näytteidenkeruun aikapisteistä. Näytteidenkeruuaikataulut on perusteltava.

48. Testikemikaalin (radioaktiivisuuden) kokonaismäärät ulosteessa on määritettävä päivittäin tutkimuksen päättymiseen saakka siten, että ensimmäinen määritys tehdään 24 tunnin kuluttua annoksen antamisesta, elleivät vaihtoehtoiset tai ylimääräiset aikapisteet ole esitutkimusten mukaan tarkoituksenmukaisempia. Vaihtoehtoiset näytteidenkeruuaikataulut on perusteltava.

49. Uloshengitysilman CO_2:n ja muiden haihtuvien aineiden kerääminen voidaan lopettaa tietyssä kokeessa, jos uloshengitysilmassa havaitaan alle yksi prosentti annetusta annoksesta 24 tunnin pituisen keräysjakson aikana.

Aikaan perustuvat tutkimukset

Plasman/veren kinetiikka

50. Näiden tutkimusten tarkoituksena on tuottaa estimaatit testikemikaalin toksikokineettisistä perusparametreista [esimerkiksi C_{max}, T_{max}-puoliintumisaika ($t_{1/2}$), AUC]. Nämä tutkimukset voidaan tehdä yhdellä annoksella, mieluummin kuitenkin kahdella tai useammalla annoksella. Annos on määritettävä kokeen luonteen ja/tai käsiteltävän ongelman mukaan. Kinetiikkatietoja voidaan tarvita tiettyjen ongelmien, kuten testikemikaalin biologisen hyötyosuuden, ratkaisemiseksi tai sen selvittämiseksi, miten annos vaikuttaa puhdistumaan (ts. saturoituuko puhdistuma annoksesta riippuvalla tavalla).

51. Näissä tutkimuksissa tulee käyttää vähintään neljää eläintä sukupuolta ja annosryhmää kohti. Käytettävien eläinten sukupuolen valinta on perusteltava. Kummankin sukupuolen (neljän uroksen ja neljän naaraan) käyttöä on harkittava, jos on näyttöä siitä, että myrkyllisyydessä on huomattavia sukupuoleen liittyviä eroja.

▼M4

52. (Radioaktiivisesti leimatun) testikemikaalin antamisen jälkeen jokaiselta eläimeltä on otettava verinäyte sopivissa aikapisteissä käyttäen asianmukaista näytteenottomenetelmää. Eläintä kohti otettavien verinäytteiden tilavuutta ja lukumäärää voidaan joutua rajoittamaan siksi, että toistuva näytteenotto saattaa vaikuttaa eläimen terveyteen/fysiologiaan ja/tai analyysimenetelmän herkkyyteen. Jokaisen eläimen näytteet on analysoitava erikseen. Tietyissä olosuhteissa (esimerkiksi metaboliittien luonnehdinta) voi olla tarpeen yhdistää useamman kuin yhden eläimen näytteitä. Yhdistetyt näytteet on merkittävä selvästi, ja yhdistämiselle on esitettävä perustelut. Jos käytetään radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia, kokonaisradioaktiivisuuden analyysi voi olla tarkoituksenmukaista. Jos näin on, kokonaisradioaktiivisuus on analysoitava kokoverestä ja plasmasta tai plasmasta ja punasoluista veri-plasmasuhteen laskemiseksi. Muissa tapauksissa tarkemmat tutkimukset, jotka edellyttävät perusyhdisteen ja/tai metaboliittien määrittämistä tai proteiineihin sitoutumisen arviointia, voivat olla tarpeen.

Muu kudoskinetiikka

53. Näiden tutkimusten tarkoituksena on tuottaa aikaan liittyvää tietoa, jotta myrkyllistä vaikutustapaa, biokertyvyyttä ja biopysyvyyttä koskeviin kysymyksiin voidaan vastata määrittämällä testikemikaalin pitoisuudet eri kudoksissa. Kudosten valinta ja arvioitavien aikapisteiden määrä määräytyvät käsiteltävän kudoksen ja testikemikaalia koskevan toksikologisen tietokannan mukaan. Tällaisten ylimääräisten kudoskinetiikkaa käsittelevien tutkimusten suunnittelussa on otettava huomioon kerätyt tiedot 37–40 kohdissa kuvatun mukaisesti. Näissä tutkimuksissa voidaan käyttää kerta-annosta tai toistuvaa annostelua. Käytettävä lähestymistapa on perusteltava yksityiskohtaisesti.

54. Muiden kudoskinetiikkaa käsittelevien tutkimusten toteuttamisen syitä voivat olla esimerkiksi seuraavat:

— Näyttö pidentyneestä puoliintumisajasta veressä, mikä viittaa siihen, että testikemikaali mahdollisesti kertyy eri kudoksiin.

— Tarve selvittää, onko vakaa tila saavutettu tietyissä kudoksissa (esimerkiksi toistuvan annostelun tutkimuksissa, sillä vaikka testikemikaalin näennäinen vakaa tila veressä on saavutettu, voi olla tarpeen varmistaa, että vakaa tila on saavutettu myös kohdekudoksissa).

55. Tämäntyyppisissä aikaan perustuvissa tutkimuksissa vähintään neljälle eläimelle annosta ja aikapistettä kohti on annettava sopiva annos testikemikaalia suun kautta, ja jakautumista valittuihin kudoksiin on seurattava ajan suhteen. Vain yhtä sukupuolta voidaan käyttää, ellei myrkyllisyyden ole havaittu olevan sukupuolikohtaista. Se, analysoidaanko kokonaisradioaktiivisuutta tai alkuperäistä kemikaalia ja/tai metaboliitteja, määräytyy myös käsiteltävän ongelman perusteella. Kudoksiin jakautuminen on arvioitava asianmukaisia tekniikoita käyttäen.

Entsyymi-induktio/-esto

56. Yhdessä tai useammassa jäljempänä luetellussa tapauksessa saatetaan tarvita tutkimuksia, joissa tarkastellaan entsyymi-induktion/-eston mahdollisia vaikutuksia tai tutkittavana olevan testikemikaalin biotransformaatiota.

1) Saatavilla oleva näyttö osoittaa, että testikemikaalin biotransformaation ja lisääntyneen myrkyllisyyden välillä on suhde.

2) Saatavilla olevat myrkyllisyystiedot osoittavat, että annoksen ja metabolian välinen suhde on ei-lineaarinen.

▼M4

3) Metaboliittien määritystutkimusten tulosten mukaan on määritetty mahdollisesti myrkyllinen metaboliitti, joka on voinut syntyä testikemikaalin indusoimaa entsyymireittiä pitkin.

4) Kun tavoitteena on selittää vaikutuksia, joiden oletetaan liittyvän entsyymi-induktion ilmiöihin.

5) Jos testikemikaalin metabolisessa profiilissa havaitaan toksikologisesti merkittäviä muutoksia joko *in vitro*- tai *in vivo* -kokeissa, jotka on tehty eri lajeilla tai eri olosuhteissa, kyseisen entsyymin (kyseisten entsyymien) luonnehdinta voi olla tarpeen (esimerkiksi I vaiheen entsyymit, kuten sytokromi P450 -riippuvaisen mono-oksigenaasijärjestelmän isoentsyymit, vaiheen II entsyymit, kuten sulfotransferaasin tai uridiinidifosfaattiglukuronosyylitransferaasin isoentsyymit tai muut oleelliset entsyymit). Näitä tietoja voidaan käyttää lajienvälisten ekstrapolointien asianmukaisuuden arvioinnissa.

57. Kun arvioidaan testikemikaaliin liittyviä muutoksia toksikokinetiikassa, on käytettävä sopivia tutkimusprotokollia, jotka on validoitu ja perusteltu asianmukaisesti. Esimerkinomaisiin tutkimussuunnitelmiin sisältyy leimaamattoman testikemikaalin toistuva annostelu, jonka jälkeen annetaan radioaktiivisesti leimattu kerta-annos päivänä 14, tai radioaktiivisesti leimatun kemikaalin toistuva annostelu ja näytteenotot päivinä 1, 7 ja 14 metaboliittien profiilien määrittelemiseksi. Radioaktiivisesti leimatun testikemikaalin toistuva annostelu voi tuottaa tietoa myös biokertyvyydestä (katso 26 kohta).

TÄYDENTÄVÄT TUTKIMUKSET

58. Tässä testimenetelmässä kuvattujen *in vivo* -kokeiden lisäksi tehtävistä täydentävistä tutkimuksista voidaan saada hyödyllistä tietoa testikemikaalin imeytymisestä, jakautumisesta, metaboliasta ja eliminoitumisesta tietyissä lajeissa.

***In vitro* -tietojen käyttö**

59. *In vitro* -tutkimuksissa, joissa käytetään asianmukaisia testijärjestelmiä, voidaan käsitellä useita testikemikaalin metaboliaan liittyviä kysymyksiä. Mahdollisten metaboliittien tutkimiseen voidaan käyttää maksasta eristettyjä tai kasvatettuja hepatosyyttejä ja subsellulaarisia fraktioita (esimerkiksi mikrosomeja ja sytosolia tai S9-fraktiota). Kohde-elimen, kuten keuhkojen, paikallinen metabolia voi olla tutkimisen arvoinen riskinarvioinnin kannalta. Näihin tarkoituksiin kannattaa hyödyntää kohdekudosten mikrosomaalisia fraktioita. Mikrosomeilla tehtävät tutkimukset voivat olla hyödyllisiä mahdollisten sukupuoleen ja elinkaaren vaiheeseen liittyvien erojen selvittämiseksi ja entsyymiparametrien (K_m ja V_{max}) luonnehtimiseksi, sillä niistä voi olla apua metabolian annosriippuvuuden ja altistustasojen välisen suhteen arvioimisessa. Lisäksi mikrosomit voivat olla hyödyllisiä, kun määritetään tiettyjä testikemikaalin metaboliaan osallistuvia mikrosomaalisia entsyymejä, joilla voi olla merkitystä lajienvälisessä ekstrapoloinnissa (katso myös 56 kohta). Biotransformaation mahdollista indusoitumista voidaan myös tutkia käyttämällä kyseisellä testikemikaalilla esikäsiteltyjen eläinten maksan subsellulaarisia fraktioita (esimerkiksi mikrosomeja ja sytosolia). Sitä voidaan tutkia myös *in vitro* hepatosyyttien induktiotutkimusten tai tiettyjen, oleellisia entsyymejä ilmentävien solulinjojen avulla. Tietyissä tilanteissa ja asianmukaisissa olosuhteissa voidaan harkita myös ihmisten kudoksista peräisin olevien subsellulaaristen fraktioiden käyttöä, kun määritetään biotransformaation mahdollisia lajien välisiä eroja. *In vitro* -tutkimusten tulokset voivat olla käyttökelpoisia myös fysiologiaan perustuvien toksikokineettisten mallien (5) kehittämisessä.

▼M4

60. Ihon kautta imeytymistä käsittelevistä *in vitro* -tutkimuksista saatetaan saada täydentäviä tietoja imeytymisen luonnehtimiseksi (6).

61. Kun käsitellään samanlaisia kysymyksiä kuin maksan mikrosomien yhteydessä, voidaan käyttää maksasoluista peräisin olevia primaarisia soluviljelmiä ja tuoreita kudosleikkeitä. Joissakin tapauksissa voi olla mahdollista ratkaista tiettyjä kysymyksiä käyttämällä solulinjoja, joiden on määritetty ilmentävän oleellista entsyymiä, tai yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotettuja solulinjoja. Tietyissä tapauksissa kannattaa tutkia tiettyjen sytokromi P450 -isotsyymien (esimerkiksi CYP1A1:n, 2E1:n, 1A2:n ja muiden) ja/tai II vaiheen entsyymien estoa ja induktiota perusyhdisteellä käyttäen *in vitro* -tutkimuksia. Näin hankituista tiedoista saattaa olla hyötyä rakenteeltaan samanlaisten yhdisteiden tutkimuksissa.

Myrkyllisyystutkimuksista peräisin olevien toksikokineettisten tietojen käyttö täydentävinä tietoina

62. Muissa myrkyllisyystutkimuksissa otettujen veri-, kudos- ja/tai eritenäytteiden analyysi voi tuottaa tietoa biologisesta hyötyosuudesta, plasmapitoisuuden muutoksista aikaan nähden (AUC, C_{max}), biokertyvyyspotentiaalista, puhdistumasta sekä sukupuoleen tai elinkaaren vaiheeseen liittyvistä muutoksista metaboliassa ja kinetiikassa.

63. Tutkimussuunnitelmassa voidaan tarkastella esimerkiksi seuraaviin seikkoihin liittyviä kysymyksiä: imeytymisen saturaatio, biotransformaatio- tai erittymisreitit suuremmilla annoksilla, uusien metaboliareittien toiminta suuremmilla annoksilla ja myrkyllisten metaboliittien rajoittuminen suurempiin annoksiin.

64. Muita vaaran arvioinnissa huomioon otettavia seikkoja voivat olla esimerkiksi seuraavat:

— Ikään liittyvä herkkyys, joka johtuu veri-aivoesteen ja munuaisten tilan eroista sekä detoksifikaatiokapasiteeteista

— Alapopulaation herkkyys, joka johtuu biotransformaatiokapasiteettien eroista tai muista toksikokineettisistä eroista

— Sikiön tai poikasen altistumisen laajuus (istukan läpi tai imetyksen kautta kulkeutuvat kemikaalit).

Toksikokineettisen mallintamisen käyttö

65. Toksikokineettiset mallit voivat olla hyödyllisiä vaaran ja riskinarvioinnin eri näkökohtien kannalta, esimerkiksi systeemisen altistuksen ja sisäisen kudosannoksen ennustamisessa. Mallien avulla voidaan käsitellä myös vaikutustapaan liittyviä erityiskysymyksiä. Mallit voivat olla myös perusteena lajienvälisen, altistusreittien ja annostusmallien ekstrapoloinnille sekä ihmisiin kohdistuvan riskin arvioinnille. Fysiologiaan perustuvien toksikokineettisten mallien, jotka koskevat tiettyä testikemikaalia ja tiettyä lajia, kehittämisessä hyödyllisiä tietoja ovat 1) jakaantumiskertoimet, 2) biokemialliset vakiot ja fysiologiset parametrit, 3) reittikohtaiset imeytymisparametrit ja 4) *in vivo* -kinetiikkatiedot mallin arviointia varten (esimerkiksi oleellisten (> 10 prosenttia) erittymisreittien puhdistumaparametrit, metabolian K_m- ja V_{max}-arvot). Mallin kehittämisessä käytetyt kokeelliset tiedot on tuotettava tieteellisesti pätevillä menetelmillä, ja mallin avulla saadut tulokset on validoitava. Testikemikaali- ja lajikohtaiset parametrit, kuten imeytymisasteet, verenkiertoon ja kudoksiin jakaantuminen ja metaboliset nopeusvakiot, määritetään usein siksi, että tilavapaiden (non-compartmental) tai fysiologiaan perustuvien mallien kehittäminen on helpompaa.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

66. On suositeltavaa, että tutkimusraportissa on sisällysluettelo.

Raportin rakenne

67. Raportin tulee sisältää tämän testimenetelmän kattamat tiedot, ja ne on järjestettävä eri osiin ja kohtiin seuraavasti:

Yhteenveto

68. Tässä tutkimusraportin osassa on oltava yhteenveto tutkimussuunnitelmasta ja kuvaus käytetyistä menetelmistä. Siinä on myös esitettävä keskeiset löydökset, jotka koskevat massatasetta, metaboliittien luonnetta ja määrää, kudosjäämiä, puhdistumanopeutta, biokertyvyyspotentiaalia, sukupuolten välisiä eroja jne. Yhteenveto on laadittava riittävän yksityiskohtaisesti, jotta löydöksiä voidaan arvioida.

Johdanto

69. Raportin tämän osan tulee sisältää tutkimuksen tavoitteet, perustelut ja tutkimussuunnitelma sekä asianmukaiset viitteet ja taustatiedot.

Aineet ja menetelmät

70. Raportin tässä osassa on esitettävä yksityiskohtainen kuvaus kaikista asianmukaisista tiedoista seuraavasti:

a) Testikemikaali

Tässä alakohdassa on esitettävä testikemikaalista seuraavat tunnistetiedot: kemiallinen nimi, molekyylirakenne, sen kemiallisen koostumuksen laadullinen ja määrällinen määritys, kemiallinen puhtaus ja epäpuhtauksien tyyppi ja määrät, mikäli mahdollista. Myös seuraavat tiedot on esitettävä: fysikaalis-kemialliset ominaisuudet sekä fysikaalinen olomuoto, väri, kokonaisliukoisuus ja/tai jakaantumiskerroin, stabiliteetti ja tarvittaessa syövyttävyys. Mikäli tarpeen, myös isomeerejä koskevat tiedot on esitettävä. Jos testikemikaali on leimattu radioaktiivisella aineella, tähän alakohtaan on sisällyttävä myös seuraavat tiedot: radionuklidin tyyppi, leiman sijainti, spesifinen aktiivisuus ja radiokemiallinen puhtaus.

Kantaja-aineen, laimenteiden, suspendoivien aineiden ja emulgointiaineiden tai muiden testikemikaalin annostelussa käytettyjen aineiden tyyppi tai kuvaus niistä on ilmoitettava.

b) Koe-eläimet

Tässä alakohdassa on esitettävä tiedot koe-eläimistä, mukaan luettuina seuraavat seikat: lajin ja kannan valinta sekä perustelut, eläinten ikä tutkimuksen alkaessa, sukupuoli ja paino, terveydentila ja eläinten hoito.

c) Menetelmät

Tässä alakohdassa on esitettävä yksityiskohdat tutkimussuunnitelmasta ja käytetystä menetelmästä. Alakohdassa on esitettävä myös seuraavat tiedot:

1) Perustelut altistumisreitin ja altistusolosuhteiden muuttamiselle, mikäli tarpeen

▼M4

2) Perustelut annostasojen valinnalle

3) Kuvaus seurantatutkimusten kokeellisissa osioissa käytetyistä esitutkimuksista, mikäli tarpeen. Tiedot vahvistava esitutkimus on toimitettava.

4) Tiedot siitä, miten annosteluliuos valmistettiin, sekä mahdollisesti käytetyn liuottimen tai kantaja-aineen tyyppi

5) Testiryhmien lukumäärä ja kussakin ryhmässä olleiden eläinten lukumäärä

6) Annostelutasot ja tilavuus (ja annoksen spesifinen aktiivisuus, jos käytettiin radioaktiivista ainetta)

7) Antoreitti (-reitit) ja -menetelmät

8) Annostelutiheys

9) Paastojakso (jos käytetty)

10) Eläinkohtainen kokonaisradioaktiivisuus

11) Eläinten käsittely

12) Näytteiden kerääminen ja käsittely

13) Metaboliittien erottelussa, kvantifioinnissa ja määrittämisessä käytetyt analyysimenetelmät

14) Käytettyjen menetelmien havaitsemisrajat

15) Muut käytetyt kokeelliset mittaukset ja menettelyt (sekä metaboliittien analysoinnissa käytettyjen menetelmien validointi)

d) Tilastollinen analyysi

Jos tutkimustulosten analysoinnissa käytetään tilastollista analyysia, analyysimenetelmästä ja käytetystä tilasto-ohjelmasta on esitettävä tarpeeksi tietoa, jotta puolueeton arvioija/tilastotieteilijä voi arvioida ja rekonstruoida analyysin uudestaan.

Järjestelmien mallintamistutkimusten (kuten fysiologiaan perustuvat toksikokineettiset mallit) osalta on esitettävä täydellinen kuvaus mallista, jotta malli voidaan rekonstruoida ja validoida riippumattomasti (katso 65 kohta ja lisäys: Määritelmät).

Tulokset

71. Yhteenveto kaikista tiedoista on esitettävä taulukossa asianmukaisen tilastollisen arvioinnin kanssa, ja tiedot on kuvattava tämän osan tekstissä. Yhteenveto radioaktiivisuuden laskentatiedoista on esitettävä tutkimuksen kannalta tarkoituksenmukaisella tavalla, yleensä mikrogramman tai milligramman ekvivalentteina näytteen massaa kohti, joskin myös muita yksiköitä voidaan käyttää. Tämän osan on sisällettävä kaavioita, jotka kuvaavat löydöksiä, jäljennöksiä edustavista kromatografia- ja spektrometriatiedoista, metaboliittien määrittämistä/kvantifiointia sekä ehdotettuja metaboliareittejä metaboliittien molekyylirakenne mukaan luettuna. Lisäksi tämän osan on sisällettävä seuraavat tiedot, mikäli tarpeen:

1) Radioaktiivisuuden määrä ja saanto virtsassa, ulosteessa, uloshengitysilmassa sekä häkin pesuvedessä olevassa virtsassa ja ulosteessa.

— Ihotutkimusten osalta on sisällytettävä myös tiedot käsitellyltä iholta talteenotetusta testikemikaalista, ihohuuhteluista ja ihon jäännösradioaktiivisuudesta, mukaan luettuina laitteet ja metaboliayksikkö sekä ihonpesututkimuksen tulokset. Katso lisätietoja 74–77 kohdasta.

▼M4

— Inhalaatiotutkimusten osalta on sisällytettävä myös tiedot testikemikaalin saannosta keuhkoista ja nenän kudoksista (8). Katso lisätietoja 78 kohdasta.

2) Kudoksiin jakautuminen (ilmoitettava prosenttiosuutena annetusta annoksesta ja pitoisuudesta (mikrogramman ekvivalentteina kudosgrammaa kohti)) ja kudoksista verenkiertoon tai kudoksista plasmaan -suhteet.

3) Jokaisen tutkimuksen perusteella laadittu ainetase sekä kudosten ja eritteiden analyysi.

4) Plasmapitoisuudet ja toksikokineettiset parametrit (biologinen hyötyosuus, AUC, Cmax, Tmax, puhdistuma, puoliintumisaika) sen jälkeen, kun kemikaalia on annettu oleellista altistumisreittiä (oleellisia altistumisreittejä) pitkin.

5) Testikemikaalin imeytymisnopeus ja -laajuus sen jälkeen, kun sitä on annettu oleellista altistumisreittiä (oleellisia altistumisreittejä) pitkin.

6) Eritteistä talteenotettujen testikemikaalin ja metaboliittien määrät (ilmoitetaan prosenttiosuutena annetusta annoksesta).

7) Viittaus liitteessä esitettäviin tietoihin, jotka sisältävät jokaisen eläimen tiedot kaikista mittaustuloksista (esimerkiksi annoksen annostelu, saannon prosenttiosuus, pitoisuudet, toksikokineettiset parametrit jne.)

8) Kuva ehdotetuista metaboliareiteistä ja metaboliittien molekyylirakenteista.

Pohdinta ja päätelmät

72. Tässä osassa kirjoittajan (kirjoittajien) on

1) esitettävä ehdotettu metaboliareitti, joka perustuu metaboliaa koskeviin tuloksiin ja testikemikaalin jakautumiseen eri komponentteihin

2) pohdittava mahdollisia lajien ja sukupuolten välisiä eroja testikemikaalin jakautumisessa ja/tai biotransformaatiossa

3) taulukoitava seuraavat tiedot ja pohdittava niitä: metaboliittien määrittäminen ja niiden lukumäärä, puhdistumanopeudet, biokertyvyyspotentiaali sekä perusaineen ja/tai metaboliitin (metaboliittien) kudosjäämäpitoisuus ja toksikokineettisten parametrien mahdolliset annosriippuvaiset muutokset, mikäli tarpeen

4) sisällytettävä tähän osaan kaikki oleelliset myrkyllisyystutkimusten aikana saadut toksikokineettiset tiedot

5) esitettävä ytimekkäät päätelmät, joita tutkimuksen tulokset tukevat

6) lisättävä osia (jos tarpeen).

73. Muita osia tulee käyttää tutkimusta tukevien kirjallisuustietojen, taulukoiden, kuvien, liitteiden jne. lisäämiseksi raporttiin.

▼M4

VAIHTOEHTOISET ALTISTUMISREITIT

Ihon kautta altistus

Ihon kautta käsittely

74. Tässä osassa esitetään spesifistä tietoa ihon kautta annetun testikemikaalin toksikokinetiikan tutkimisesta. Ihon kautta imeytymisen osalta on luettava tämän liitteen luku B.44 [Ihon kautta imeytyminen: *in vivo* -menetelmä (9)]. Muiden tutkittavien ominaisuuksien, kuten jakautumisen ja metabolian, osalta voidaan käyttää tätä testimenetelmää B.36. Ihon kautta käsittelyssä testikemikaalista tulee käyttää yhtä tai useampaa annostasoa. Testikemikaalin (testikemikaalia sisältävä laimentamaton tai laimennettu materiaali tai formulaatio, joka applikoidaan iholle) on oltava sama kuin se, jolle ihmiset tai muut kohdelajit voivat altistua, tai kyseisen kemikaalin realistinen korvike. Annostaso(t) on valittava tämän testimenetelmän 20–26 kohdan mukaisesti. Ihon kautta annettavan annoksen valinnassa voidaan ottaa huomioon seuraavat seikat: oletettu ihmisten altistuminen ja/tai annokset, joissa on havaittu myrkyllisyyttä muissa ihon kautta välittyvää myrkyllisyyttä koskevissa tutkimuksissa. Ihon kautta annettava annos (annettavat annokset) on tarvittaessa liuotettava sopivaan kantaja-aineeseen, ja annosteltavan määrän on oltava halutun annoksen kannalta riittävä. Juuri ennen kokeen alkua eläinten selästä poistetaan karvapeite leikkaamalla. Karvapeite voidaan myös ajella, mutta se tulee tehdä noin vuorokautta ennen testin alkua. Karvapeitettä poistettaessa on varottava vahingoittamasta ihoa, sillä se voi muuttaa ihon läpäisykykyä. Noin 10 prosenttia ruumiin pinnasta on oltava ajeltuna, jotta siihen voidaan annostella testikemikaalia. Erittäin myrkyllisten kemikaalien yhteydessä tämä alue voi olla pienempi kuin 10 prosenttia, mutta mahdollisimman suuri osa alueesta on peitettävä ohuella ja yhtenäisellä kerroksella testikemikaalia. Samaa käsittelyaluetta on käytettävä kaikissa testiryhmissä, joissa tutkitaan ihon kautta altistusta. Käsitellyt alueet on suojattava sopivalla paikalleen kiinnitettävällä suojuksella. Eläimet on pidettävä omissa häkeissään.

75. Ihonpesututkimus on tehtävä, jotta voidaan arvioida, mikä määrä testikemikaalin annetusta annoksesta voi poistua iholta, kun käsitelty ihoalue pestään miedolla saippualla ja vedellä. Tästä tutkimuksesta voi myös olla apua määritettäessä massatasetta, kun testikemikaali annostellaan ihon kautta. Tässä ihonpesututkimuksessa on annettava kerta-annos testikemikaalia kahdelle eläimelle. Annostaso valitaan tämän testimenetelmän 23 kohdan mukaisesti (katso lisätietoja ihokontaktiajasta myös 76 kohdasta). Pesuvesistä talteenotetut testikemikaalimäärät on määritettävä, jotta voidaan arvioida sitä, miten tehokkaasti pesutoimenpide poistaa testikemikaalia.

76. Ellei syövyttävyys estä sitä, testikemikaalia on pidettävä iholla vähintään kuusi tuntia. Kun suojus poistetaan, käsitelty alue on pestävä ihonpesututkimuksessa kuvatun menettelyn mukaisesti (katso 75 kohta). Sekä suojuksesta että pesuvesistä on analysoitava testikemikaalin jäämät. Tutkimuksen päättyessä jokainen eläin on lopetettava humaanisti viitteen (2) mukaisesti, ja käsitelty ihoalue on irrotettava. Käsitellystä ihosta on analysoitava tarkoituksenmukainen osa testikemikaalijäämien (radioaktiivisuuden) määrittämiseksi.

77. Lääkkeiden toksikokineettisessä arvioinnissa saatetaan tarvita muita toimenpiteitä asianmukaisen sääntelyjärjestelmän mukaisesti.

▼M4

Inhalaatio

78. Testikemikaalista on käytettävä yhtä pitoisuutta (tai useampaa, mikäli tarpeen). Pitoisuus (pitoisuudet) on valittava tämän testimenetelmän 20–26 kohdan mukaisesti. Inhalaatiokäsittelyt on tehtävä käyttäen nenäkartiota tai vain pää -laitetta muita altistumisreittejä pitkin tapahtuvan imeytymisen estämiseksi (8). Jos käytetään muita inhalaatioaltistusolosuhteita, niiden perustelut on dokumentoitava. Inhalaatioaltistuksen kesto on määriteltävä; yleensä altistus kestää 4–6 tuntia.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.

4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40,

5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.

6) Tämän liitteen luku B.45 (Ihon kautta imeytyminen: *in vitro* -menetelmä)

7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.44 (Ihon kautta imeytyminen: *in vivo* -menetelmä)

10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

ADME: Lyhennesana englanninkielisistä sanoista ”Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion” (imeytyminen, jakautuminen, metabolia ja erittyminen).

Ainetase: Katso ”Massatase”.

Antoreitti: (suun kautta, suonensisäisesti, ihon kautta, hengitysteiden kautta jne.): Tarkoittaa sitä tapaa, jolla kemikaalit annostellaan elimistöön (esimerkiksi suun kautta ruokintaletkulla, suun kautta ravinnon seassa, hengitysteiden kautta, suonensisäisesti jne.).

AUC: (Area under the plasma concentration-time curve eli plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala): Testikemikaalin pitoisuutta plasmassa ajan suhteen kuvaavan käyrän alapuolinen pinta-ala. Se edustaa elimistöön imeytyneen testikemikaalin kokonaismäärää ennalta määritetyn ajanjakson aikana. Lineaarisissa olosuhteissa AUC (ajasta nolla äärettömyyteen saakka) on verrannollinen elimistöön imeytyneen testikemikaalin kokonaismäärään imeytymisnopeudesta riippumatta.

Autoradiografia: (koko kehon autoradiografia): Käytetään radioaktiivisen testikemikaalin sijainnin määrittämiseen kudoksessa (laadullisesti ja/tai määrällisesti). Tässä tekniikassa käytetään röntgenkuvausfilmiä tai nykyään ennemminkin digitaalista kuvantamista fosforilevylle radioaktiivisesti leimattujen molekyylien tai niiden fragmenttien saamiseksi näkyviin tallentamalla tutkittavan kohteen lähettämää säteilyä. Elinten dissekointiin verrattuna määrällisestä koko kehon autoradiografiasta voi olla joitakin etuja arvioitaessa testikemikaalin jakautumista ja määritettäessä radioaktiivisen materiaalin kokonaissaantoa ja hajoamista kudoksissa. Eräs merkittävä etu on esimerkiksi se, että sitä voidaan käyttää värillisiä eläimiä koskevassa mallissa, jolloin voidaan arvioida testikemikaalin ja melaniinin välistä mahdollista suhdetta, sillä melaniini voi sitoa tiettyjä molekyylejä. Vaikka tämä tekniikka voi olla hyödyllinen koko kehoon kohdistuvissa arvioinneissa sellaisten sitoutumispaikkojen osalta, joiden kapasiteetti on suuri mutta affiniteetti pieni, se voi olla rajallinen tunnistettaessa tiettyjä kohdepaikkoja, esimerkiksi reseptoreihin sitoutumisen paikkoja, jolloin havaitseminen edellyttää suhteellisen suurta resoluutiota ja herkkyyttä. Autoradiografiaa käytettäessä kokeet, joiden tavoitteena on määrittää annostellun yhdisteen massatase, on tehtävä kudoksiin jakautumiskokeesta erillisessä ryhmässä tai erillisenä tutkimuksena, jossa kaikki eritteet (joihin voi sisältyä myös uloshengitysilma) ja kokonaiset ruumiit homogenisoidaan ja analysoidaan nestetuikelaskennalla.

Biokertyvyys: Katso ”Kertyvyys”.

Biologinen hyötyosuus: Annetun annoksen se fraktio, joka pääsee systeemiseen verenkiertoon tai fysiologiseen vaikutuspaikkaan. Testikemikaalin biologisella hyötyosuudella tarkoitetaan yleensä perusyhdistettä, mutta sillä voidaan tarkoittaa myös sen metaboliitteja. Se koskee ainoastaan yhtä kemiallista muotoa. *Huomio:* biologinen hyötyosuus ja imeytyminen eivät ole sama asia. Esimerkiksi suun kautta imeytymisen (jolloin ainetta on suolen seinämässä ja porttiverenkierrossa) ja biologisen hyötyosuuden (jolloin ainetta on systeemisessä verenkierrossa ja kudoksissa) välinen ero voi syntyä esimerkiksi kemiallisesta hajoamisesta, joka johtuu aineen metabolisoitumisesta suolen seinämässä, ulosvirtauskuljetuksesta takaisin suoliston onteloon tai presysteemisestä metaboliasta maksassa (10). Myrkyllisen komponentin (perusyhdisteen tai metaboliitin) biologinen hyötyosuus on kriittinen parametri ihmisiin kohdistuvan riskin arvioinnissa (ekstrapolointi suuresta pieneen annokseen tai reitistä toiseen), jotta ulkoisista NOAEL- tai BMD-arvoista (sovellettu annos) voidaan johtaa sisäinen arvo. Suun kautta annostelun yhteydessä aiheutuvien maksavaikutusten osalta riittää suun kautta imeytyminen. Kaikkien muiden vaikutusten, jotka ilmenevät muualla kuin aineen antokohdassa, biologinen hyötyosuus on kuitenkin imeytymistä luotettavampi parametri käytettäväksi riskinarvioinnissa.

Biopysyvyys: Katso ”Pysyvyys”.

Biotransformaatio: Tutkittavan testikemikaalin (yleensä entsymaattinen) kemiallinen muuntuminen eri kemikaaliksi elimistössä. ”Metabolian” synonyymi.

$\mathbf{C_{max}}$: Joko enimmäis- tai huippupitoisuus veressä (plasmassa/seerumissa) annostelun jälkeen tai enimmäis- tai huippuerittyminen (virtsaan tai ulosteeseen) annostelun jälkeen.

▼M4

Detoksifikaatioreitit: Vaihesarja, joka johtaa myrkyllisten kemikaalien eliminoitumiseen kehosta joko metabolisen muuntumisen tai erittymisen kautta.

Eksogeeninen: Organismin tai järjestelmän ulkopuolella aiheutettu tai tuotettu (asia).

Ekstrapolointi: Yhden tai useamman arvon päättely sen perusteella, mitä tiedetään tai mitä on havaittu.

Entsymaattiset parametrit: K_m: Michaelisin vakio ja V_{max}: enimmäisnopeus.

Entsyymit/isotsyymit: Kemiallisia reaktioita katalysoivia (nopeuttavia) proteiineja. Isotsyymit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat samanlaisia kemiallisia reaktioita mutta joiden aminohapposekvenssi on erilainen.

Erittyminen: Prosessi(t), jonka (joiden) kautta annosteltu testikemikaali ja/tai sen metaboliitit poistuvat kehosta.

Herkkyys: Menetelmän tai välineen kyky erotella mittausvasteita siten, että ne edustavat kyseisen muuttujan eri tasoja.

Huippupitoisuus veressä (plasmassa/seerumissa): Veren (plasman/seerumin) enimmäis- tai huippupitoisuus annostelun jälkeen (katso myös ”C_{max}”).

Imeytyminen: Kemikaalien siirtyminen kudoksiin tai niiden läpi. Imeytymisellä tarkoitetaan perusyhdistettä ja kaikkia sen metaboliitteja. Sitä ei tule sekoittaa biologinen hyötyosuus -käsitteeseen.

Induktio/entsyymi-induktio: Ympäristön ärsykkeen tai induktorimolekyylin aiheuttama entsyymisynteesi.

Interpolointi: Kohdekemikaaliin liittyvän ominaisuuden ennustamisessa käytetään tietoja yhden tai useamman kemikaalin ominaisuuksista.

Jakaantumiskerroin: Tunnetaan myös nimellä jakautumiskerroin; se on kahdessa liuottimessa olevan kemikaalin erilaisen liukoisuuden mittari.

Jakautuminen: Testikemikaalin ja sen johdannaisten leviäminen koko organismiin.

Järjestelmien mallintaminen (fysiologiaan perustuva toksikokinetiikka, farmakokinetiikkaan, fysiologiaan perustuva farmakokinetiikka, biologiaan perustuva jne.): Abstrakti malli, jossa käytetään matemaattista kieltä kuvaamaan järjestelmän käyttäytymistä.

Kertyvyys (biokertyvyys): Testikemikaalin määrän lisääntyminen kudoksissa ajan myötä (yleensä rasvakudoksissa toistuvan altistuksen jälkeen). Jos testikemikaalia syötetään elimistöön enemmän kuin sitä eliminoituu, organismiin kertyy testikemikaalia, jolloin saatetaan saavuttaa myrkyllisiä testikemikaalipitoisuuksia.

Kohdekudos: Kudos, jossa myrkyllisen aineen pääasiallinen haittavaikutus ilmenee.

Kudoksiin jakautuminen: Testikemikaalin palautuva liike elimistön yhdestä paikasta toiseen. Kudoksiin jakautumista voidaan tutkia elinten dissektion, homogenisoinnin, polttamisen tai nestetuikelaskennan avulla tai koko kehon laadullisella ja/tai määrällisellä autoradiografialla. Edellinen on hyödyllinen määritettäessä pitoisuutta ja saantoa kudoksista sekä jäljellä olevasta ruumiista samoilla eläimillä, mutta sen tarkkuus voi olla riittämätön kaikkien kudosten osalta ja sen kokonaissaanto voi olla tarkoituksenmukaista pienempi (< 90 prosenttia). Katso jälkimmäisen määritelmä edeltä.

▼M4

Lineaarisuus / lineaarinen kinetiikka: Kinetiikan kannalta prosessi on lineaarinen silloin, kun kaikki eri osien väliset siirtymisnopeudet ovat verrannollisia määriin tai pitoisuuksiin nähden (eli ensimmäisen kertaluvun reaktio). Tällöin puhdistuma- ja jakautumistilavuudet ovat vakioita, kuten myös puoliintumisajat. Saavutetut pitoisuudet ovat verrannollisia annostelumäärään (altistukseen), ja kertymisen ennustaminen on helpompaa. Lineaarisuutta/ei-lineaarisuutta voidaan arvioida vertailemalla oleellisia parametreja (kuten AUC-arvoa) eri annosten tai kerrallisen ja toistuvan altistuksen jälkeen. Annosriippuvuuden puute saattaa viitata siihen, että yhdisteen metaboliaan osallistuvat entsyymit ovat saturoituneet. AUC-arvon suureneminen toistuvan altistuksen jälkeen (verrattuna kerta-altistukseen) saattaa viitata metabolian estymiseen, ja AUC-arvon pieneneminen saattaa puolestaan viitata metabolian indusoitumiseen [katso myös (11)].

Mallien validointi: Prosessi, jossa arvioidaan, kuvaako jokin malli käytettävissä olevia toksikokineettisiä tietoja yhdenmukaisesti. Malleja voidaan arvioida vertailemalla mallin avulla saatuja ennusteita ja kokeellisia arvoja yhteiseen riippumattomaan muuttujaan (esimerkiksi aikaan). Arvioinnin laajuus on perusteltava suhteessa mallin käyttötarkoitukseen.

Massatase: Järjestelmään tulevan ja siitä poistuvan testikemikaalin määrä.

Metabolia: ”Biotransformaation” synonyymi.

Metaboliitit: Metabolian tai metabolisten prosessien tuotteet.

Myrkyllisyyden mekanismi / myrkyllisyyden vaikutustapa: Vaikutusmekanismi tarkoittaa tiettyjä biokemiallisia interaktioita, joiden kautta testikemikaalin vaikutus syntyy. Vaikutustapa tarkoittaa yleisempiä reittejä, joiden kautta testikemikaalin myrkyllisyys aiheutuu.

Osa: Kehon, kudoksen tai solun rakenteellinen tai biokemiallinen osio (tai yksikkö), joka on muista osista erillinen.

Puhdistumanopeus: Määrällinen mittari, jolla mitataan sitä nopeutta, jolla testikemikaali poistuu verestä, plasmasta tai tietystä kudoksesta aikayksikköä kohti.

Puoliintumisaika ($t_{1/2}$): Aika, jossa testikemikaalin pitoisuus pienenee puoleen tietyssä osassa. Yleensä sillä tarkoitetaan plasmapitoisuutta tai testikemikaalin määrää koko kehossa.

Pysyvyys (biopysyvyys): Kemikaalin pitkäaikainen läsnäolo (biologisessa järjestelmässä) sen vuoksi, että se hajoaa/eliminoituu hitaasti.

Reseptorien mikroskooppinen autoradiografia (tai reseptorien mikroautoradiografia): Tätä tekniikkaa voidaan käyttää tutkittaessa tiettyjen kudospaikkojen tai solupopulaatioiden välistä ksenobioottista vuorovaikutusta, esimerkiksi reseptoreihin sitoutumista tai tiettyä vaikutustapaa koskevissa tutkimuksissa, joissa voidaan tarvita suurta resoluutiota ja suurta tarkkuutta, mikä taas ei ole mahdollista koko kehon autoradiografiassa.

Sappieritys: Erittyminen sappiteiden kautta.

Saturaatio: Tila, jolloin yksi tai useammin kineettinen prosessi (esimerkiksi imeytyminen, metabolia tai puhdistuma) on suurimmillaan (eli saturoitunut).

▼**M4**

Suun kautta imeytyminen: Prosenttiosuus antopaikasta (esimerkiksi maha-suolikanavasta) imeytyneestä testikemikaaliannoksesta. Tätä kriittistä parametria voidaan käyttää, jotta saadaan selville, mikä fraktio annostellusta testikemikaalista pääsee porttilaskimoon ja sen jälkeen maksaan.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu kemikaali tai seos.

$\mathbf{T_{max}}$: C_{max}-arvon saavuttamiseen tarvittava aika.

Toksikokinetiikka (farmakokinetiikka): Kemikaalien imeytymistä, jakautumista, metaboliaa ja erittymistä aikaan nähden käsittelevä tutkimus.

Vakaan tilan pitoisuus veressä (plasmassa): Avoimen järjestelmän tasapainotila, jossa kaikki järjestelmään vaikuttavat tekijät ja vastakkaiset tekijät ovat tasapainossa siten, että sen kaikkien komponenttien pitoisuus on vakaa, vaikka aine virtaa järjestelmän läpi.

▼B

B.37. **ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS AKUUTIN ALTISTUKSEN JÄLKEEN**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Aineiden toksisten vaikutusten arvioinnissa on tärkeää ottaa huomioon mahdollisuus, että tietyt aineluokat voivat aiheuttaa erityistä neurotoksisuutta, jota ei ehkä todeta muissa toksisuuskokeissa. Tiettyjen organofosfaattien on havaittu aiheuttavan viivästynyttä neurotoksisuutta, ja niitä tulisi pitää mahdollisina tutkimuskohteina.

Viivästynyttä polyneuropatiaa aiheuttavat aineet voidaan tunnistaa *in vitro* -seulontatesteillä. Negatiiviset tulokset näistä tutkimuksista eivät kuitenkaan todista, ettei testiaine ole neurotoksinen.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa 8.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Organofosfaatteja ovat varauksettomat organofosfaattiesterit, tioesterit tai organofosfori-, organofosfoni- tai organofosforamidihappoanhydridit tai samantyyppisten fosforotioidi-, fosfonotioidi- tai fosforotioamidihappoanhydridit tai muut tässä aineluokassa joskus tavattavat aineet, jotka voivat aiheuttaa viivästynyttä neurotoksisuutta.

Viivästynyt neurotoksisuus on oireryhmä, johon liittyy ataksian, selkäytimen ja ääreishermon distaalisten aksonopatioiden pitkittynyt viivästynyt ilmeneminen ja neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto ja vanheneminen hermokudoksessa.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuainetta voidaan testata positiivisella verrokkiryhmällä sen osoittamiseksi, ettei testatun lajin vaste muutu laboratoriokoeolosuhteissa merkitsevästi.

Yksi esimerkki laajalti käytetystä neurotoksisesta aineesta on tri-o-tolyylifosfaatti (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-nimistö: fosforihappo, tris(2-metyylifenyyli)esteri), tunnettu myös nimellä tris-o-kresyylifosfaatti.

1.4 KOEMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine annostellaan kerta-annoksena suun kautta kanoille, joita on suojeltu akuuteilta kolinergisiltä vaikutuksilta silloin kun se on ollut tarkoituksenmukaista. Eläimiä havainnoidaan 21 päivän ajan käyttäytymispoikkeavuuksien, ataksian ja paralyysin suhteen. Kustakin ryhmästä satunnaisesti valituille kanoille tehdään biokemialliset määritykset, erityisesti neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto, yleensä 24 ja 48 tunnin kuluttua annostelusta. Kahdenkymmenenyhden päivän kuluttua altistuksesta loput kanat lopetetaan ja valitut hermokudokset tutkitaan histopatologisesti.

▼B

1.5 KOEMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Valmistelut**

Terveet nuoret täysikasvuiset kanat, joilla ei ole häiritseviä virussairauksia, lääkitystä eikä käynnin poikkeavuuksia, jaetaan satunnaisotannalla koe- ja verrokkiryhmiin ja niitä totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen alkua.

Kokeessa käytettävien testihäkkien on oltava tarpeeksi tilavia, jotta kanat voivat liikkua vapaasti ja käynnin havainnointi käy helposti.

Testiainetta pitäisi yleensä annostella suun kautta mahaletkun avulla, liivatekapseleina tai vastaavalla menetelmällä. Nesteet voidaan antaa laimentamattomina tai liuotettuna sopivaan vehikkeliin, kuten maissiöljyyn. Kiinteät aineet tulee mahdollisuuksien mukaan liuottaa, koska suuret määrät kiinteää ainetta liivatekapseleissa eivät välttämättä imeydy tehokkaasti. Muiden kuin vesipitoisten vehikkelien toksiset ominaisuudet on oltava tiedossa ja jos ne eivät ole, on ne määritettävä ennen koetta.

1.5.2 **Koeolosuhteet**

1.5.2.1 *Koe-eläimet*

Kokeessa suositellaan käytettäväksi nuoria täysikasvuisia kanoja *(Gallus gallus domesticus),* jotka ovat iältään 8–12 kuukautta. Kanojen tulee olla normaalikokoisia, -lajisia ja -kantaisia ja mieluiten kasvatettu oloissa, joissa ne ovat voineet liikkua vapaasti.

1.5.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Kokeessa tulee käyttää koeryhmän lisäksi yhtä vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää ja yhtä positiivista verrokkiryhmää. Vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää tulee käsitellä täsmälleen samoin kuin koeryhmää testiaineen annostelua lukuun ottamatta.

Kussakin ryhmässä tulee olla riittävä määrä lintuja, jotta vähintään kuusi lintua voidaan lopettaa biokemiallisia määrityksiä varten (kolme kanaa kahtena eri ajankohtana) ja kuusi lintua säilyy hengissä 21 päivän havaintojakson ajan patologisia tutkimuksia varten.

Positiivista verrokkiryhmää voidaan tutkia samanaikaisesti tai se voi olla tuore historiallinen verrokkiryhmä. Siinä on oltava vähintään kuusi kanaa, joita on käsitelty tunnetulla viivästynyttä neurotoksisuutta aiheuttavalla aineella. Näistä kuudesta kanasta kolmelle tehdään biokemialliset määritykset ja kolmelle patologiset tutkimukset. Historiallisten tietojen ajoittaista päivitystä suositellaan. Uusia positiivisia kontrollitietoja pitäisi kehittää, kun kokeen suorittava laboratorio muuttaa joitakin olennaisia seikkoja koekäytännössä (esim. kanta, ravinto, elinolosuhteet).

▼B

1.5.2.3 *Annostasot*

Päätutkimuksessa käytettävä annostaso on määritettävä alustavassa tutkimuksessa, johon sisältyy tarkoituksenmukainen määrä kanoja ja annostasoryhmiä. Jonkinasteinen letaliteetti alustavassa tutkimuksessa on tyypillisesti välttämätöntä riittävän annoksen määrittämiseksi päätutkimusta varten. Akuuttien kolinergisten vaikutusten aiheuttaman kuoleman estämiseksi voidaan kanoille antaa atropiinia tai muuta suoja-ainetta, joka ei tiettävästi vaikuta viivästyneisiin neurotoksisiin vasteisiin. Testiaineiden ei-letaali enimmäisannos voidaan määrittää erilaisilla koemenetelmillä (ks. menetelmä B.1 bis). Kanoja koskevat historialliset tiedot tai muut toksikologiset tiedot voivat helpottaa annosten valintaa.

Päätutkimuksen testiaineen annostason tulee olla mahdollisimman korkea ottaen huomioon alustavan annosvalintatutkimuksen tulokset ja 2 000 mg/kg:n yläraja-annos. Mahdollisesti ilmenevä kuolleisuus ei saisi olla niin laajaa, etteikö riittävä määrä eläimiä säilyisi hengissä 21. päivänä tehtäviä biokemiallisia (kuusi eläintä) ja histologisia (kuusi eläintä) tutkimuksia varten. Atropiinia tai muuta suoja-ainetta, jotka eivät tiettävästi vaikuta viivästyneisiin neurotoksisiin vasteisiin, tulisi käyttää akuuteista kolinergisistä vaikutuksista johtuvien kuolemien estämiseksi.

1.5.2.4 *Raja-annoskoe*

Jos kokeessa ei vähintään 2 000 mg/kg/vrk:n annostasolla tässä tutkimuksessa kuvatuilla toimenpiteillä todeta havaittavia toksisia vaikutuksia ja jos toksisuutta ei ole odotettavissa rakenteellisesti samantyyppisistä aineista olevien tietojen perusteella, tutkimusta suuremmalla annoksella ei pidetä tarpeellisena. Raja-annoskoe voidaan tehdä paitsi silloin kun odotettavissa oleva altistus ihmisellä viittaa tarpeeseen käyttää korkeampaa annostasoa.

1.5.2.5 *Havainnointijakso*

Havainnointijakso kestää 21 päivää.

1.5.3 **Kokeen suorittaminen**

Kun eläimille on annettu suoja-ainetta akuutista kolinergisestä vaikutuksesta johtuvan kuoleman estämiseksi, annostellaan testiaine kerta-annoksena.

1.5.3.1 Yleishavainnot

Havainnoinnin tulee alkaa heti käsittelyn alettua. Kaikkia kanoja tulee havainnoida tarkoin useita kertoja kahden ensimmäisen päivän aikana ja sen jälkeen vähintään kerran päivässä 21 päivän ajan tai siihen asti kunnes eläin aiotaan lopettaa. Kaikki toksisuusoireet tulee kirjata muistiin, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, tyyppi, voimakkuus ja kesto. Ataksia tulee mitata vähintään neliportaisella ordinaaliasteikolla, ja paralyysi tulee kirjata muistiin. Patologisia tutkimuksia varten valitut kanat on päästettävä häkistä vähintään kahdesti viikossa ja pakotettava joksikin aikaa liikkumaan, kuten kiipeämään tikkaita, vähäisten toksisten vaikutusten havainnoinnin helpottamiseksi. Kuolemaisillaan olevat ja voimakasta kärsimystä tai kipua osoittavat eläimet tulee poistaa heti kun niiden tila huomataan ja lopettaa humaanilla tavalla ja niille tulee tehdä ruumiinavaus.

▼B

1.5.3.2 Ruumiinpaino

Kaikki kanat on punnittava juuri ennen testiaineen annostelua ja vähintään kerran viikossa sen jälkeen.

1.5.3.3 Biokemia

Kuusi satunnaisesti kustakin käsittelyä saavasta koeryhmästä ja vehikkeliä saavasta verrokkiryhmästä valittua kanaa sekä kolme kanaa positiivisesta verrokkiryhmästä (silloin kun tätä ryhmää tutkitaan samanaikaisesti) lopetetaan muutaman päivän kuluttua annostelusta ja niiden aivoista ja lannerangasta tehtyjä preparaatteja arvioidaan neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen osalta. Lisäksi voi olla hyödyllistä tehdä preparaatti lonkkahermokudoksesta neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen arvioimiseksi. Yleensä kolme lintua sekä verrokki- että kustakin koeryhmästä lopetetaan 24 tunnin kuluttua ja toiset kolme 48 tunnin kuluttua annostelusta. Positiivisesta kontrolliryhmästä sen sijaan lopetetaan kolme kanaa 24 tunnin kuluttua annostelusta. Jos havainnot myrkytyksen kliinisistä oireista (tämä voidaan usein arvioida havainnoimalla kolinergisten merkkien alkamisajankohtaa) viittaavat toksisen aineen erittäin hitaaseen eliminaatioon, voi olla suositeltavaa ottaa kudosnäyte kolmesta linnusta kahtena eri ajankohtana 24–72 tunnin sisällä annostelusta.

Näille näytteille voidaan tehdä myös asetyylikoliiniesteraasi (AChE)-analyysit, jos se katsotaan tarkoituksenmukaiseksi. AChE voi kuitenkin reaktivoitua spontaanisti *in vivo* ja johtaa aineen voimakkuuden aliarviointiin AChE:n estäjänä.

1.5.3.4 Silmämääräinen ruumiinavaus

Jokaisen eläimen (sekä lopetettavaksi suunniteltujen ja kuolemaisillaan olevien) silmämääräiseen ruumiinavaukseen tulee sisältyä aivojen ja selkäytimen ulkonäön havainnointi.

1.5.3.5 Histopatologinen tutkimus

Havainnointijaksosta hengissä säilyneiden ja biokemiallisissa tutkimuksessa käyttämättömien eläinten hermokudos tutkitaan mikroskooppisesti Kudokset on kiinnitettävä perusfuusiotekniikoilla *in situ.* Sektiot tulee ottaa pikkuaivoista (keskellä kulkeva pitkittäistaso), ydinjatkeesta, selkäytimestä ja ääreishermoista. Selkäydinsektiot tulee ottaa kaularangan yläosasta, rintarangan keskiosasta ja lannerstirangan alueelta. Säärihermon distaalialueelta ja sen kaksoiskantalihasta (m. gastrocnemicus) huoltavista haaroista ja lonkkahermosta otetaan näyte. Sektiot värjätään sopivalla myeliini- ja aksonispesifisillä aineilla.

2. **TULOKSET**

Negatiiviset tulokset tässä menetelmässä valituilla kohdevaikutuksilla (biokemia, histopatologia ja käyttäytymisen havainnointi) eivät normaalisti vaadi viivästyneen neurotoksisuuden lisätestausta. Kohdevaikutuksia koskevat epävarmat tai keskeneräiset tulokset voivat vaatia lisätutkimuksia.

Yksilötiedot on esitettävä. Ne on myös esitettävä yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi eläinten lukumäärä koeryhmittäin testin alussa, leesioita, käyttäytymis- tai biokemiallisia vaikutuksia osoittaneiden eläinten lukumäärä, leesio- tai vaikutustyypit ja niiden vaikeusaste sekä eläinten prosentuaaliset määrät kutakin erityyppistä ja vaikeusasteeltaan erilaisia leesioita tai vaikutusta kohti.

▼B

Tämän tutkimuksen tuloksia tulee arvioida käyttäytymis-, biokemiallisten ja histopatologisten vaikutusten esiintyvyyden, vaikeusasteen ja korrelaation perusteella ja kussakin koe- ja verrokkiryhmässä havaittujen muiden vaikutusten suhteen.

Numeerisia tuloksia tulee arvioida tarkoituksenmukaisin ja yleisesti hyväksytyin tilastollisin menetelmin. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

3. **RAPORTOINTI**

TESTIRAPORTTI

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

— käytetty kanta,

— eläinten lukumäärä ja ikä,

— lähde, elinolosuhteet jne., ja

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

— selostus testiaineen valmistamisesta, säilyvyydestä ja homogeenisuudesta, silloin kun se on tarkoituksenmukaista,

— vehikkelin valintaperusteet,

— selonteko testiaineen annostelusta,

— selonteko ravinnon ja veden laadusta,

— annosvalintojen perustelu,

— annosteltujen annosten erittely, mukaan lukien selonteko vehikkelistä ja annostellun aineen määrästä ja fyysisestä muodosta, ja

— mahdollisen suoja-aineen identifiointi ja selonteko sen annostelusta.

Tulokset:

— ruumiinpaino,

— toksinen vaste annostasoittain, mukaan lukien kuolleisuus,

— kliinisten havaintojen luonne, voimakkuus ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta),

— biokemiallisten menetelmien ja löydösten yksityiskohtainen kuvaus,

— ruumiinavauslöydökset,

— kaikkien histopatologisten löydösten yksityiskohtainen kuvaus, ja

— tulosten tilastollinen käsittely silloin kun se on tarkoituksenmukaista.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. **LÄHDELUETTELO**

Tämä menetelmä on analoginen OECD TG 418:n kanssa.

▼B

B.38. **ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS 28 PÄIVÄN TOISTUVAN ANNOSTELUN TUTKIMUKSESSA**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Aineiden toksisten vaikutusten arvioinnissa on tärkeää ottaa huomioon mahdollisuus, että tietyt aineluokat voivat aiheuttaa erityistä neurotoksisuutta, jota ei ehkä todeta muissa toksisuuskokeissa. Tiettyjen organofosfaattien on havaittu aiheuttavan viivästynyttä neurotoksisuutta, ja niitä tulisi pitää mahdollisina tutkimuskohteina.

Viivästynyttä polyneuropatiaa aiheuttavat aineet voidaan tunnistaa *in vitro* -seulontatesteillä. Negatiiviset tulokset näistä tutkimuksista eivät kuitenkaan todista, ettei testiaine ole neurotoksinen.

Tästä 28 päivää kestävästä viivästynyttä neurotoksisuutta koskevasta kokeesta saadaan tietoa mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvat altistukset rajoitetun aikajakson sisällä todennäköisesti aiheuttavat. Kokeesta saadaan tietoa annosvasteesta ja sen avulla voidaan arvioida haitatonta vaikutustasoa (NOAEL), mistä voi olla hyötyä altistuksen turvallisuusperusteiden määrittelyssä.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Organofosfaatteja ovat varauksettomat organofosfaattiesterit, tioesterit tai organofosfori-, organofosfoni- tai organofosforamidihappoanhydridit tai samantyyppisten fosforotioidi-, fosfonotioidi- tai fosforotioamidihappoanhydridit tai muut tässä aineluokassa joskus tavattavat aineet, jotka voivat aiheuttaa viivästynyttä neurotoksisuutta.

Viivästynyt neurotoksisuus on oireyhtymä, johon liittyy ataksian, selkäytimen ja ääreishermon distaalisten aksonopatioiden pitkittynyt viivästynyt ilmeneminen ja neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto ja vanheneminen hermokudoksessa.

1.3 KOEMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annostellaan kanoille päivittäin suun kautta 28 päivän ajan. Eläimiä havainnoidaan vähintään kerran päivässä käyttäytymispoikkeavuuksien, ataksian ja paralyysin suhteen 14 päivän ajan viimeisestä annoksesta laskettuna. Kustakin ryhmästä satunnaisesti valituille kanoille tehdään biokemialliset määritykset, erityisesti neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto, yleensä 24 ja 48 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Kaksi viikkoa viimeisen annoksen jälkeen loput kanat lopetetaan ja valitut hermokudokset tutkitaan histopatologisesti.

▼B

1.4 KOEMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Valmistelut**

Terveet nuoret täysikasvuiset kanat, joilla ei ole häiritseviä virussairauksia, lääkitystä eikä käynnin poikkeavuuksia, jaetaan satunnaisotannalla koe- ja verrokkiryhmiin ja niitä totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen alkua.

Kokeessa käytettävien testihäkkien on oltava tarpeeksi tilavia, jotta kanat voivat liikkua vapaasti ja käynnin havainnointi käy helposti.

Testiainetta annostellaan päivittäin seitsemänä päivänä viikossa mieluiten mahaletkun kautta tai liivatekapseleina. Nesteet voidaan antaa laimentamattomina tai liuotettuna sopivaan vehikkeliin, kuten maissiöljyyn. Kiinteät aineet tulee mahdollisuuksien mukaan liuottaa, koska suuret määrät kiinteää ainetta liivatekapseleissa eivät välttämättä imeydy tehokkaasti. Muiden kuin vesipitoisten vehikkelien toksiset ominaisuudet on oltava tiedossa ja jos ne eivät ole, on ne määritettävä ennen koetta.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Koe-eläimet*

Kokeessa suositellaan käytettäväksi nuoria täysikasvuisia kanoja *(Gallus gallus domesticus),* jotka ovat iältään 8–12 kuukautta. Kanojen tulee olla normaalikokoisia, -lajisia ja -kantaisia ja mieluiten kasvatettu oloissa, joissa ne ovat voineet liikkua vapaasti.

1.4.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Kokeessa tulee yleensä käyttää vähintään kolmea koeryhmää ja yhtä vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää. Vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää tulee käsitellä täsmälleen samoin kuin koeryhmää lukuun ottamatta testiaineen annostelua.

Kussakin ryhmässä tulee olla riittävä määrä lintuja, jotta vähintään kuusi lintua voidaan lopettaa biokemiallisia määrityksiä varten (kolme kanaa kahtena eri ajankohtana) ja kuusi lintua säilyy hengissä 14 päivän havaintojakson ajan patologiaa varten.

1.4.2.3 *Annostasot*

Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon viivästynyttä neurotoksisuutta koskevan akuutin testin tulokset ja kaikki muut testiyhdisteestä saatavilla olevat toksisuus- tai kinetiikkatiedot. Korkein annostaso tulee valita siten, että se aiheuttaa toksisia vaikutuksia, mieluiten viivästynyttä neurotoksisuutta, mutta ei kuolemaa eikä ilmeistä kärsimystä. Tämän jälkeen annostasot valitaan asteittain alenevasti mahdollisen annosvasteen ja haitattoman vaikutustason (NOAEL) osoittamiseksi alhaisimmalla annostasolla.

▼B

1.4.2.4 *Raja-annoskoe*

Jos kokeessa ei vähintään 1 000 mg/kg/vrk:n annostasolla tässä tutkimuksessa kuvatuilla toimenpiteillä todeta havaittavia toksisia vaikutuksia ja jos toksisuutta ei ole odotettavissa rakenteellisesti samantyyppisistä aineista olevien tietojen perusteella, tutkimusta suuremmalla annoksella ei pidetä tarpeellisena. Raja-annoskoe voidaan tehdä paitsi silloin kun odotettavissa oleva altistus ihmisellä viittaa tarpeeseen käyttää korkeampaa annostasoa.

1.4.2.5 *Havainnointijakso*

Kaikkia eläimiä tulee havainnoida vähintään kerran päivässä altistusaikana ja 14 päivän ajan sen jälkeen, lukuun ottamatta eläimiä, joille aiotaan tehdä ruumiinavaus.

1.4.3 **Kokeen suorittaminen**

Eläimille annetaan testiainetta seitsemänä päivänä viikossa 28 päivän ajan.

1.4.3.1 *Yleishavainnot*

Havainnoinnin tulee alkaa heti käsittelyn alettua. Kaikkia kanoja tulee havainnoida tarkoin vähintään kerran päivässä kunakin 28 käsittelypäivänä ja 14 päivän ajan annostelun päätyttyä tai siihen asti kunnes eläin aiotaan lopettaa. Kaikki toksisuusoireet tulee kirjata muistiin, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, tyyppi, voimakkuus ja kesto. Havaintoihin tulee sisältyä muun muassa käyttäytymispoikkeavuudet. Ataksia tulee mitata vähintään neliportaisella ordinaaliasteikolla ja paralyysi tulee kirjata muistiin. Kanat on päästettävä häkistä vähintään kahdesti viikossa ja pakotettava joksikin aikaa liikkumaan, kuten kiipeämään tikkaita, vähäisten toksisten vaikutusten havainnoinnin helpottamiseksi. Kuolemaisillaan olevat ja voimakasta kärsimystä tai kipua osoittavat eläimet tulee poistaa heti kun niiden tila huomataan ja lopettaa humaanilla tavalla ja niille tulee tehdä ruumiinavaus.

1.4.3.2 *Ruumiinpaino*

Kaikki kanat on punnittava juuri ennen testiaineen ensimmäistä annostelua ja vähintään kerran viikossa sen jälkeen.

1.4.3.3 *Biokemia*

Kuusi satunnaisesti kustakin käsittelyä saavasta koeryhmästä ja vehikkeliä saavasta verrokkiryhmästä valittua kanaa lopetetaan muutaman päivän kuluttua viimeisen annoksen antamisesta ja niiden aivoista ja lannerangasta tehtyjä preparaatteja arvioidaan neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen osalta. Lisäksi voi olla hyödyllistä tehdä preparaatti lonkkahermokudoksesta neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen arvioimiseksi. Tavallisesti kolme lintua sekä verrokki- että kustakin koeryhmästä lopetetaan 24 tunnin kuluttua ja toiset kolme 48 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta laskettuna. Jos tiedot akuutista tutkimuksesta tai muista tutkimuksista (esim. toksikokinetiikka) viittaavat siihen, että eläimet tulisi mieluiten lopettaa joinakin muina ajankohtina viimeisen annostelun jälkeen, tulisi näitä aikoja noudattaa ja perustelut dokumentoida.

Näille näytteille voidaan tehdä myös asetyylikoliiniesteraasi (AChE)-analyysit, jos se katsotaan tarkoituksenmukaiseksi. AChE voi kuitenkin reaktivoitua spontaanisti *in vivo* ja johtaa aineen voimakkuuden aliarviointiin AChE:n estäjänä.

▼B

1.4.3.4 *Silmämääräinen ruumiinavaus*

Jokaisen eläimen (sekä lopetettavaksi suunniteltujen ja kuolemaisillaan olevien) silmämääräiseen ruumiinavaukseen tulee sisältyä aivojen ja selkäytimen ulkonäön havainnointi.

1.4.3.5 *Histopatologinen tutkimus*

Havainnointijaksosta hengissä säilyneiden ja biokemiallisissa tutkimuksessa käyttämättömien eläinten hermokudos tutkitaan mikroskooppisesti. Kudokset on kiinnitettävä perfuusiotekniikoilla *in situ.* Sektiot tulee ottaa pikkuaivoista (keskellä kulkeva pitkittäistaso), ydinjatkeesta, selkäytimestä ja ääreishermoista. Selkäydinsektiot tulee ottaa kaularangan yläosasta, rintarangan keskiosasta ja lanneristirangan alueelta. Säärihermon distaalialueelta ja sen kaksoiskantalihasta (m. gastrocnemicus) huoltavista haaroista ja lonkkahermosta otetaan näyte. Sektiot värjätään sopivilla myeliini- ja aksonispesifisillä aineilla. Ensin tehdään mikroskooppitutkimukset verrokki- ja suuriannoksisen ryhmän eläinten säilytetyille kudoksille. Kun vaikutuksista suuriannoksisessa ryhmässä on näyttöä, tehdään mikroskooppitutkimukset myös keskisuurten ja pienen annoksen ryhmissä.

2. **TULOKSET**

Negatiiviset tulokset tässä menetelmässä valituilla kohdevaikutuksilla (biokemia, histopatologia ja käyttäytymisen havainnointi) eivät normaalisti vaadi viivästyneen neurotoksisuuden lisätestausta. Kohdevaikutuksia koskevat epävarmat tai keskeneräiset tulokset voivat vaatia lisätutkimuksia.

Yksilötiedot on esitettävä. Ne on myös esitettävä yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi eläinten lukumäärä koeryhmittäin testin alussa, leesioita, käyttäytymis- tai biokemiallisia vaikutuksia osoittaneiden eläinten lukumäärä, leesio- tai vaikutustyypit ja niiden vaikeusaste sekä eläinten prosentuaaliset määrät kutakin erityyppistä ja vaikeusasteeltaan erilaista leesiota tai vaikutusta kohti.

Tämän tutkimuksen tuloksia tulee arvioida käyttäytymis-, biokemiallisten ja histopatologisten vaikutusten esiintyvyyden, vaikeusasteen ja korrelaation perusteella ja kussakin koe- ja verrokkiryhmässä havaittujen muiden vaikutusten suhteen.

Numeerisia tuloksia tulee arvioida tarkoituksenmukaisin ja yleisesti hyväksytyin tilastollisin menetelmin. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

3. **RAPORTOINTI**

TESTIRAPORTTI

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

— käytetty kanta,

— eläinten lukumäärä ja ikä,

— lähde, elinolosuhteet jne., ja

— kunkin eläimen paino testin alussa.

▼B

Koeolosuhteet:

— selostus testiaineen valmistamisesta, säilyvyydestä ja homogeenisuudesta, silloin kuin se on tarkoituksenmukaista,

— vehikkelin valintaperusteet,

— selonteko testiaineen annostelusta,

— selonteko ravinnon ja veden laadusta,

— annosvalintojen perustelut,

— annosteltujen annosten erittely, mukaan lukien selonteko vehikkelistä ja annostellun aineen määrästä ja fyysisestä muodosta, ja

— perustelut biokemiallisten määritysten ajankohtien muuttamisesta muuksi kuin 24 ja 48 tuntia viimeisestä annostelusta.

Tulokset:

— ruumiinpaino,

— toksinen vaste annostasoittain, mukaan lukien kuolleisuus,

— haitaton vaikutustaso (NOAEL),

— kliinisten havaintojen luonne, voimakkuus ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta),

— biokemiallisten menetelmien ja löydösten yksityiskohtainen kuvaus,

— ruumiinavauslöydökset,

— kaikkien histopatologisten löydösten yksityiskohtainen kuvaus, ja

— tulosten tilastollinen käsittely silloin kun se on tarkoituksenmukaista.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. **LÄHDELUETTELO**

Tämä menetelmä on analoginen OECD RG 419:n kanssa.

▼B

B.39. **UDS-TESTI NISÄKKÄIDEN MAKSASOLUILLA *IN VIVO***

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäiden maksasoluilla *in vivo* tehtävän UDS-testin (unscheduled DNA Synthesis (UDS) test) tarkoituksena on tunnistaa tutkittavat aineet, jotka aiheuttavat DNA:n korjautumista altistettujen eläinten maksasoluissa (1) (2) (3) (4).

Tällä in *vivo* -testillä voidaan tutkia kemiallisten aineiden genotoksisia vaikutuksia maksassa. Mitattava tulostapahtuma ilmaisee DNA-vaurion ja sen myöhemmän korjautumisen maksasoluissa. Elimistöön imeytyvät kemialliset aineet metaboloituvat yleensä pääasiassa maksassa. Se soveltuu siten hyvin DNA-vaurioiden mittaamiseen *in vivo.*

Jos on saatu viitteitä siitä, että tutkittava aine ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Lopputapahtuma, S-vaiheen ulkopuolinen DNA-synteesi (unscheduled DNA-synthesis), mitataan määrittämällä radioaktiivisesti merkittyjen nukleosidien inkorporoitumista DNA:han solunjakautumissyklin S-vaiheen ulkopuolella. Yleisimmin käytetty menetelmä on tritiumilla merkityn tymidiinin (^{3}H-TdR) inkorporoitumisen määrittäminen autoradiografisesti. *In vivo* UDS-testeissä käytetään pääasiassa rotan maksaa. Myös muita kudoksia kuin maksaa voidaan käyttää, mutta niitä ei kuvata tämän menetelmän yhteydessä.

UDS-vasteen toteaminen riippuu irtileikkautuneiden ja korvautuneiden DNA-segmenttien lukumäärästä vauriokohdassa. UDS-testi on sen vuoksi erityisen arvokas kemiallisten aineiden aiheuttamien ”pitkien DNA-pätkien korjautumisten” (”longpatch repair”) (20–30 emästä) toteamisessa. Testin herkkyys on sen sijaan huomattavasti heikompi ”lyhyiden pätkien korjautumisen” (”shortpatch repair”) (1–3 emästä) toteamisessa. Mutageenisia muutoksia saattaa lisäksi syntyä DNA-vaurioiden korjautumattomuuden, korjautumisvirheiden tai kahdentumisvirheiden seurauksena. UDS-vasteen laajuus ei anna viitteitä korjausprosessien luotettavuudesta. On myös mahdollista, että mutageeni reagoi DNA:n kanssa mutta DNA-vaurio ei korjaudu leikkautumiskorjautumisprosessin kautta. Koska tämä lopputapahtuma mitataan koko genomista, sen potentiaalinen herkkyys kompensoi sitä, ettei UDS-testi tuota spesifistä tietoa tutkittavan aineen mutageenisesta aktiivisuudesta.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Korjautuvat solut: jyvästen nettomäärä tumissa eli NNG-arvo on suurempi kuin etukäteen asetettu arvo, joka on määriteltävä testin suorittavassa laboratoriossa.

NNG-arvo (net nuclear grains): solujen UDS-aktiivisuuden kvantitatiivinen mitta autoradiografialla tehdyissä UDS-testeissä laskettuna siten, että sytoplasmisten jyvästen keskimääräinen lukumäärä tumaa vastaavilla sytoplasma-alueilla (CG) vähennetään tumissa havaittavien jyvästen (NG) lukumäärästä (NG): NNG = NG — CG. NNG-määrät lasketaan yksittäisistä soluista, minkä jälkeen luvut yhdistetään saman viljelmän solujen osalta, rinnakkaisviljelmien solujen osalta jne.

▼B

UDS (Unscheduled DNA Synthesis): DNA:n korjautumissynteesi sen jälkeen, kun kemiallisten aineiden tai fysikaalisten tekijöiden aiheuttaman vaurion alueen sisältävä DNA-jakso on leikkautunut irti ja poistunut kromosomista.

1.3 TESTIN PERIAATE

UDS-testi nisäkkään maksasoluilla *in vivo* osoittaa DNA korjautumissynteesin sen jälkeen, kun kemiallisten aineiden tai fysikaalisten tekijöiden aiheuttaman vaurion alueen sisältävä DNA-jakso on leikkautunut irti ja poistunut kromosomista. Testi perustuu yleensä ^{3}H-TdR:n inkorporoitumiseen solujen DNA:han maksassa, jossa on yleensä vain vähän solusyklin S-vaiheessa olevia soluja. ^{3}H-TdR:n inkorporoituminen määritetään yleensä autoradiografisesti, sillä tämä tekniikka ei ole herkkä S-vaiheessa oleville soluille kuten esimerkiksi nestetuikelaskenta.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelut**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Yleisesti käytetty eläinlaji on rotta, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B yleisjohdannossa mainitut, mutta kosteustavoitteen on oltava 50–60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viisi päivää ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne ehtivät sopeutua laboratorio-olosuhteisiin.

1.4.1.4 *Tutkittava aine / valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli se on mahdollista.

▼B

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen itsenäisesti suoritettavaan testin osaan on otettava mukaan rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrolliaineiden on oltava aineita, joiden tiedetään aiheuttavan UDS-reaktion, kun niitä annetaan pitoisuuksina, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Metabolista aktivaatiota vaativia positiivisia kontrolliaineita on käytettävä annoksina, jotka aiheuttavat kohtalaisen vasteen (4). Annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät heti paljasta lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Näytteidenottoajat	Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Varhaiset näytteidenottoajat (2–4 tuntia)	N-nitrosodimetyyliamiini	62-75-9	200-249-8
Myöhäiset näytteidenottoajat (12–16 tuntia)	N-2-fluorenyyliasetamidi (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Myös muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää. Positiiviset kontrolliaineet voidaan antaa myös muuta reittiä pitkin kuin testattava aine.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Koe-eläinten määrän on oltava riittävä testivasteen luonnollinen biologinen vaihtelu huomioon ottaen. Analysoitavissa olevia eläimiä on oltava vähintään kolme ryhmää kohti. Mikäli merkittävä tietokanta on kerätty jo aikaisemmin, rinnakkaisiin negatiivisiin ja positiivisiin kontrolliryhmiin tarvitaan vain yksi tai kaksi eläintä.

Vain toista sukupuolta, mieluiten uroksia, voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla ja samalla altistustavalla tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavia aineita annetaan yleensä yhtenä altistuksena.

1.5.3 **Annostasot**

Normaalisti käytetään vähintään kahta annostasoa. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samalla annosteluohjelmalla suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Pienemmän annoksen pitäisi yleensä olla 50–25 % suuresta annoksesta.

▼B

Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), saattavat edellyttää muita annoksenmäärityskriteerejä, ja ne pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa annosteluohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää.

Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia maksassa (esim. pyknoottisia tumia).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivän aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus ei ehkä ole välttämätön. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Vatsaontelonsisäistä annostelua ei kuitenkaan suositella, koska maksa saattaisi tällöin altistua tutkittavalle aineelle suoraan eikä verenkierron kautta. Koc-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Maksasolujen preparointi**

Maksasolut preparoidaan tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä yleensä 12–16 tunnin kuluttua annostelusta. Ylimääräinen varhaisempi näytteenottoajankohta (yleensä 2–4 tunnin kuluttua altistuksesta) on yleensä tarpeen, ellei selvää positiivista vastetta havaita 12–16 tunnin kuluttua. Myös muut näytteidenottoajankohdat ovat kuitenkin mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella toksikokineettisten tutkimustulosten perusteella.

Lyhytaikaisviljelmät nisäkkäiden maksasoluista perustetaan yleensä siten, että maksaa perfusoidaan kollagenaasilla *in situ* ja tuoreiden irronneiden maksasolujen annetaan kiinnittyä sopivaan pintaan. Negatiivisista kontrollieläimistä kerättyjen maksasolujen elinkykyisyyden (5) pitäisi olla vähintään 50 prosenttia.

1.5.7 **UDS:n määrittäminen**

Hiljattain eristettyjä nisäkkäiden maksasoluja inkuboidaan yleensä ^{3}H-TdR:ää sisältävässä kasvatusväliaineessa sopivan pituinen aika, esim. 3–8 tuntia. Inkubaatioajan päätyttyä kasvatusväliaine erotetaan soluista, minkä jälkeen soluja voidaan inkuboida kasvatusväliaineessa, joka sisältää ylimääräistä merkitsemätöntä tymidiiniä inkorporoitumattoman radioaktiivisuuden vähentämiseksi. Tämän jälkeen solut huuhdellaan, fiksoidaan ja kuivataan. Pitempiä inkubaatioaikoja käytettäessä käsittely merkitsemättömällä tymidiinillä ei ehkä ole tarpeen. Objektilasit kastetaan autoradiografiemulsioon, valotetaan pimeässä (esim. säilytetään jääkaapissa 7–14 päivää), kehitetään, värjätään ja lasketaan valottuneet hopeajyväset. Jokaisesta eläimestä valmistetaan 2–3 objektilasia.

▼B

1.5.8 **Analyysi**

Objektilasipreparaattien tulisi sisältää riittävästi soluja, joiden morfologia on normaali, jotta luotettava UDS-analyysi voidaan tehdä. Preparaateista tehdään mikroskooppitutkimus selvän sytotoksisuuden merkkien havaitsemiseksi (esim. pyknoosi, radioaktiivisuuden väheneminen).

Objektilasit on koodattava ennen jyvästen laskemista. Normaalisti jokaisesta eläimestä lasketaan 100 solua vähintään kahdesta objektilasista; jos lasketaan alle 100 solua/eläin, tämä on perusteltava. Jyvästen määrää ei lasketa S-vaiheessa olevista tumista, mutta S-vaiheessa olevien solujen suhteellinen osuus voidaan rekisteröidä.

Morfologisesti normaalien solujen tumaan ja sytoplasmaan inkorporoituneen ^{3}H-TdR:n määrä, joka näkyy hopeajyvästen kertymänä, on määritettävä soveltuvilla menetelmillä.

Hopeajyvästen määrä määritetään tumien kohdalta (tumassa esiintyvät jyväset, NG) ja tumaa vastaavilta alueilta sytoplasman kohdalta (sytoplasmiset jyväset, CG). CG-määrät mitataan joko valitsemalla sytoplasmasta kaikkein eniten radioaktiivisesti merkittyä ainetta sisältävä alue tai valitsemalla keskimäärin kaksi tai kolme satunnaisesti valittua tuman vierestä laskettua sytoplasmisten jyvästen määrää. Myös muita laskentamenetelmiä (esim. kokosolulaskentaa) voidaan käyttää, jos ne voidaan perustella (6).

2. **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Jokaisen objektilasin ja jokaisen eläimen tiedot on esitettävä erikseen. Lisäksi kaikkien tietojen yhteenveto on esitettävä taulukkomuodossa. Tumassa esiintyvien jyvästen nettomäärät (NNG) on laskettava jokaisesta solusta, jokaisesta eläimestä ja jokaisesta annoksesta ja ajankohdasta erikseen vähentämällä CG-lukemat NG-lukemista. Jos ”korjautuvat solut” lasketaan, käsitteen ”korjautuvat solut” kriteerit on perusteltava ja niiden on perustuttava negatiivisista kontrolleista aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saatuihin tietoihin. Numeeriset tulokset voidaan arvioida tilastollisin menetelmin. Jos tilastollisia testejä käytetään, ne on valittava ja perusteltava ennen tutkimusta.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Esimerkkejä positiivisten/negatiivisten vasteiden kriteereistä:

positiivinen
- i) NNG-arvot ovat aikaisemmin asetettujen, laboratoriokohtaisiin vertailuarvoihin perustuvien kynnysarvojen yläpuolella; tai
- ii) NNG-arvot ovat merkitsevästi suurempia kuin rinnakkaisessa kontrollissa;

negatiivinen
- i) NNG-arvot ovat laboratoriokohtaisiin vertailuarvoihin perustuvan kynnysarvon tasalla tai sen alapuolella; tai
- ii) NNG-arvot eivät ole merkitsevästi suuremmat kuin rinnakkaisessa kontrollissa.

▼B

Tulosten biologista merkitystä on pohdittava: huomioitavia parametreja ovat eläinten väliset erot, annos-vastesuhde ja sytotoksisuus. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa. Tilastollinen merkitsevyys ei saa kuitenkaan olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen määrästä riippumatta.

Nisäkkäiden maksasoluissa *in vivo* tehdyssä UDS-testissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa nisäkkäiden maksasoluissa *in vivo* DNA-vaurioita, jotka S-vaiheen ulkopuolinen DNA-synteesi (unscheduled DNA synthesis) voi korjata *in vitro*. Negatiivinen tulos osoittaa, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa sellaisia DNA-vaurioita, jotka voidaan todeta tällä testillä.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen on pohdittava.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Koeolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit,

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— annostasojen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— antotavan valintaperusteet,

— menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen tarvittaessa,

▼B

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun testattavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenotto-ohjelmasta,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— maksasolujen preparointi- ja viljelymenetelmä,

— käytetty autoradiografinen tekniikka,

— preparoitujen objektilasien lukumäärä ja laskettujen solujen lukumäärät,

— arviointikriteerit,

— kriteerit, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— tumassa esiintyvien jyvästen määrien, sytoplasmisten jyvästen määrien ja tumassa esiintyvien jyvästen nettomäärien keskiarvot yksittäistä objektilasia, eläintä ja ryhmää kohti,

— mahdollinen annos-vastesuhde,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— rinnakkaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollien tulokset,

— aikaisemmat negatiivisilla (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisilla kontrolleilla saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— ”korjautuvien solujen” lukumäärä, jos määritetty,

— S-vaiheessa olevien solujen lukumäärä, jos määritetty,

— solujen elinkykyisyys.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.,* 156, s. 1–18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.,* 189, s. 123–133.

(3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland, D. J. and Fox, M., (eds) *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommitte on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 52–77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo. Mutation Res.,* 312, s. 263–285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.,* 291, s. 21–27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, s. 553–562.

▼M8

B.40. *IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: IHON SÄHKÖVASTUSMÄÄRITYS -TESTIMENETELMÄ (TER)

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 430 (2015). Ihosyövyttävyydellä tarkoitetaan pysyvän ihovaurion eli orvaskeden läpi verinahkaan ulottuvan näkyvän kuolion ilmaantumista testiaineen annostelun jälkeen [Yhdistyneiden kansakuntien yhdenmukaistetussa kemikaalien luokittelu- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EU) 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti]. Tässä päivitetyssä testimenetelmässä B.40 kuvataan in vitro -menetelmä, jolla voidaan tunnistaa syövyttämättömät ja syövyttävät aineet ja seokset YK:n GHS-järjestelmän (1) ja

2. Ihosyövyttävyyden arvioinnissa on yleensä käytetty koe-eläimiä (testimenetelmä B.4, joka vastaa OECD:n testiohjetta 404, hyväksytty ensimmäisen kerran 1981 ja tarkistettu 1992, 2002 ja 2015) (2). Nykyisen testimenetelmän B.40 lisäksi muita kemikaalien ihosyövyttävyyspotentiaalin testaamiseen validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro* -testimenetelmiä ovat testimenetelmät B.40 a (vastaa OECD:n testiohjetta 431) (3) ja B.65 (vastaa OECD:n testiohjetta 435) (4). Myös näillä menetelmillä voidaan tarvittaessa tunnistaa syövyttävien kemikaalien alakategorioita. Useita validoituja *in vitro* -testimenetelmiä on hyväksytty testimenetelmäksi B.46 (vastaa OECD:n testiohjetta 439) (5), jota voidaan käyttää ihoärsytyksen testaukseen. Ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja sisältävässä OECD:n ohjeasiakirjassa kuvataan useita moduuleita, joihin on ryhmitelty erilaisia tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä annetaan ohjeita siitä, i) miten integroida ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja testauksen ulkopuolella saatuja tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa, ja ii) selostetaan, miten toimitaan, kun lisätestaus on tarpeen (6).

3. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihosyövyttävyyttä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Kyseessä on rotan ihon sähkövastukseen perustuva testimenetelmä. Siinä käytetään ihonäytteitä tunnistamaan syövyttäviä aineita, jotka pystyvät tuhoamaan normaalin marraskeden eheyden ja läpäisynestokyvyn. Vastaava OECD:n testiohje hyväksyttiin alun perin vuonna 2004, ja sitä päivitettiin vuonna 2015 ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjen lähestymistapojen mukaiseksi.

4. Sääntelytarkoituksiin käytettävien in vitro -ihosyövyttävyystestien arvioimiseksi tehtiin validointia edeltäviä tutkimuksia (7), joiden jälkeen tehtiin virallinen validointitutkimus ihosyövyttävyyden arvioinnissa käytettävästä rotan ihon sähkövastusmääritykseen perustuvasta testimenetelmästä (8) (9) (10)

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1, mukaisesti.

▼**M8**

(11). Näiden tutkimusten tulosten perusteella annettiin suositus, jonka mukaan sähkövastusmääritysmenetelmää (joka on nimetty validoiduksi vertailumenetelmäksi) voidaan käyttää sääntelytarkoituksissa *in vivo* -ihosyövyttävyyden arviointiin (12) (13) (14).

5. Ennen kuin sääntelytarkoituksissa voidaan käyttää muuta ihosyövyttävyyden arviointiin ehdotettua samankaltaista tai muutettua *in vitro* -sähkövastusmääritysmenetelmää kuin validoitua vertailumenetelmää, on selvitettävä ehdotetun menetelmän luotettavuus, merkityksellisyys (tarkkuus) ja sen ehdotetun käytön rajoitukset, jotta voidaan varmistua siitä, että se on samanlainen kuin validoitu vertailumenetelmä, suoritusvaatimusten mukaisesti (15). OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä taataan vasta, kun ehdotettu uusi tai päivitetty suoritusvaatimusten mukainen testimenetelmä on tarkistettu ja sisällytetty OECD:n vastaavaan testiohjeeseen.

MÄÄRITELMÄT

6. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Validointitutkimuksessa (10) ja muissa julkaistuissa tutkimuksissa (16) (17) on todettu, että rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmällä pystytään erottelemaan tunnetut ihoa syövyttävät ja syövyttämättömät aineet siten, että 122 ainetta sisältävän tietokannan osalta kokonaisherkkyys on 94 prosenttia (51/54) ja spesifisyys 71 prosenttia (48/68).

8. Tällä testimenetelmällä tarkastellaan ihosyövyttävyyttä *in vitro*. Sen perusteella voidaan tunnistaa syövyttämättömiä ja syövyttäviä testikemikaaleja YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti. Validointitutkimuksissa (8) (9) (10) (11) osoitetun mukaisesti tämän testimenetelmän rajoitus on kuitenkin se, ettei sillä voida luokitella syövyttäviä aineita ja seoksia YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisiin alaluokkiin. Siitä, miten tätä testimenetelmää käytetään, määrätään sovellettavassa sääntelykehyksessä. Tällä testimenetelmällä ei saada asianmukaista tietoa ihoärsytyksestä, mutta testimenetelmä B.46 koskee nimenomaan terveysvaikutusta ihoärsytys *in vitro* (5). Jotta paikalliset ihovaikutukset ihon kerta-altistuksen jälkeen voidaan arvioida kattavasti, on tukeuduttava ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan (6).

9. Tämän testimenetelmän perusteena olevassa validointitutkimuksessa on testattu laaja joukko kemikaaleja, jotka ovat pääasiassa aineita, ja validointitutkimuksen empiirinen tietokanta sisälsi 60 ainetta, jotka kuuluvat hyviin moniin kemikaaliluokkiin (8) (9). Kaikkien saatavilla olevien tietojen perusteella tätä testimenetelmää voidaan soveltaa hyvin moniin kemikaaliluokkiin ja aineiden fysikaalisiin olomuotoihin, myös nesteisiin, puolikiinteisiin ja kiinteisiin aineisiin sekä vahamaisiin aineisiin. Koska tiettyjen testiaineiden fysikaalisten olomuotojen testauksesta ei ole vielä saatavilla sopivia vertailutietoja, on syytä mainita, että validoinnissa arvioitiin melko pieni määrä vahoja ja syövyttäviä kiinteitä aineita. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Jos voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen aineluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin. Sen ohella, että tämä testimenetelmä soveltuu aineiden testaamiseen, sen oletetaan soveltuvan myös seosten testaamiseen. Koska seokset kattavat laajan joukon luokkia ja koostumuksia ja koska seosten testaamisesta on tällä hetkellä saatavilla vain vähän tietoa, niissä tapauksissa, joissa voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen aineluokkien kanssa (esimerkiksi Eskesin ja muiden (2012) ehdottaman strategian mukaisesti (18)), testimenetelmää ei pidä käyttää niihin. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen,

▼M8

on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksissa (8) (9). Vaikka voidaan ajatella, että niitä voidaan testata sähkövastusmääritysmenetelmällä, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei kuitenkaan voida testata.

TESTIN PERIAATE

10. Testikemikaalia levitetään enintään 24 tunnin ajaksi ihonäytteiden orvaskesipinnalle kaksikammioisessa testijärjestelmässä, jossa ihonäytelevyt toimivat kammioiden välisenä erotusseinänä. Ihonäytteet otetaan inhimillisellä tavalla lopetetuista 28–30 päivän ikäisistä rotista. Kemikaalin katsotaan olevan syövyttävä, jos se pystyy tuhoamaan normaalin marraskeden eheyden ja läpäisynestokyvyn, mikä mitataan ihon sähkövastuksen pienenemisenä tietyn raja-arvon alapuolelle (16) (ks. 32 kohta) Rotan ihon sähkövastuksen raja-arvoksi valittiin 5 kΩ. Valinta perustui laajoihin tietoihin useista aineista, joissa suurin osa arvoista selvästi joko ylitti kyseisen arvon (usein > 10 kΩ) tai alitti sen (usein < 3 kΩ) (16). Yleensä testikemikaalit, jotka eivät ole syövyttäviä eläimille mutta jotka voivat olla joko ärsyttäviä tai ärsyttämättömiä, eivät laske ihon sähkövastusta tämän raja-arvon alle. Lisäksi muiden ihonäytteiden tai muiden laitteiden käyttö voi muuttaa raja-arvoa, mikä edellyttää lisävalidointia.

11. Testimenetelmä sisältää väriaineensitomisvaiheen, jotta voidaan vahvistaa positiiviset tulokset tapauksissa, joissa sähkövastusarvo on noin 5 kΩ. Väriaineensitomisvaiheessa voidaan määrittää, johtuuko ionien läpäisykyvyn lisääntyminen marraskeden rakenteen tuhoutumisesta. Rotan ihoa käyttävän sähkövastusmenetelmän on osoitettu kykenevän ennustamaan syövyttävyyttä *in vivo* kanissa, jota käytettiin koe-eläimenä testimenetelmän B.4 mukaisessa testissä (2).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

12. Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tämän rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmän mukaista menetelmää rutiininomaisesti, sen on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla taulukossa 1 suositellut 12 ainetta oikein. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla tai jos se on perusteltua, voidaan käyttää toista ainetta, josta on saatavana asianmukaiset *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutiedot (esimerkiksi vertailukemikaalien luettelosta (16)), kunhan sovelletaan taulukossa 1 kuvattuja samoja valintaperusteita.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet ([1])

Aine	CAS-nro	Kemikaaliluokka ([2])	YK:n GHS / CLP Lk. *in vivo* -tulosten perusteella ([3])	VVM Lk. *in vitro* -tulosten perusteella	Olomuoto	pH ([4])
In vivo syövyttävät aineet						
N,N'-dimetyyli-dipropyleenitriamiini	10563-29-8	orgaaninen emäs	1A	6 × C	N	8,3
1,2-diaminopropaani	78-90-0	orgaaninen emäs	1A	6 × S	N	8,3

▼**M8**

Aine	CAS-nro	Kemikaaliluokka ([2])	YK:n GHS / CLP Lk. *in vivo* -tulosten perusteella ([3])	VVM Lk. *in vitro* -tulosten perusteella	Olomuoto	pH ([4])
In vivo syövyttävät aineet						
Rikkihappo (10 %)	7664-93-9	epäorgaaninen happo	(1A/)1B/1C	5 × S 1 × x ES	N	1,2
Kaliumhydroksidi (10 % aq.)	1310-58-3	epäorgaaninen emäs	(1A/)1B/1C	6 × S	N	13,2
Oktaanihappo (kapryylihappo)	124-07-2	orgaaninen happo	1B/1C	4 × S2 × ES	N	3,6
2-tert-butyylifenoli	88-18-6	Fenoli	1B/1C	4 × S 2 × ES	N	3,9
In vivo syövyttämättömät aineet						
Isostеariinihappo	2724-58-5	Orgaaninen happo	ES	6 × ES	N	3,6
4-amino-1,2,4-triatsoli	584-13-4	Orgaaninen emäs	ES	6 × ES	K	5,5
Fenetyylibromidi	103-63-9	Elektrofiili	ES	6 × ES	N	3,6
4-(metyylitio)-bentsaldehydi	3446-89-7	Elektrofiili	ES	6 × ES	N	6,8
1,9-dekadieeni	1647-16-1	Neutraali orgaaninen aine	ES	6 × ES	N	3,9
Tetrakloorietyleeni	127-18-4	Neutraali orgaaninen aine	ES	6 × ES	N	4,5

Lyhenteet: aq = vesiliuos; CASRN = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; VVM = validoitu vertailumenetelmä; S= syövyttävä ES=syövyttämätön.

([1]) Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet, joista on esitetty ensin syövyttävät ja sitten syövyttämättömät aineet sekä syövyttävyyden alakategoria ja kemiallinen luokka, valittiin ECVAMin tekemässä rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmän validointitutkimuksessa käytetyistä aineista (8) (9). Ellei muuta ole mainittu, aineet testattiin sillä puhtaustasolla, joka niillä oli kaupallisesta lähteestä ostettuina (8). Mahdollisuuksien mukaan valikoimassa oli aineita, jotka i) edustavat syövyttävyysvasteiden vaihteluväliä (ts. syövyttämättömiä sekä heikosti ja voimakkaasti syövyttäviä aineita), joka voidaan mitata tai ennustaa vaihtoehtoisella vertailumenetelmällä, ii) edustavat validointitutkimuksessa käytettyjä kemikaaliluokkia, iii) kuvastavat vaihtoehtoisen vertailumenetelmän suorituskykyominaisuuksia, iv) ovat kemialliselta rakenteeltaan tarkoin määritettyjä, v) antavat varmoja tuloksia *in vivo* -vertailutestimenetelmällä, vi) ovat kaupallisesti saatavilla ja vii) joiden hävityskustannukset eivät ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

([2]) Kemikaaliluokka Barrattin *ym.* mukaan (8).

([3]) YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisia luokkia 1A, 1B ja 1C vastaavat YK:n pakkausryhmät ovat I, II ja III.

([4]) pH-arvot otettiin julkaisuista Fentem *ym.* (9) ja Barratt *ym.* (8).

▼M8

MENETTELY

13. Ihon syövyttävyyden tutkimisessa käytettävälle rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmälle on laadittu vakiotoimintamenettelyt (19). Tämän testimenetelmän mukaisten rotan ihon sähkövastusmääritys -testimenetelmien on oltava seuraavien edellytysten mukaiset:

Eläimet

14. Koe-eläiminä on käytettävä rottia, koska aiemmissa tutkimuksissa (12) niiden ihon on osoitettu olevan herkkä tällä testimenetelmällä tutkittaville aineille ja tämä on ainoa iholähde, joka on virallisesti validoitu (8) (9). Rotan ikä (jolloin ihonäyte otetaan) ja kanta ovat erityisen tärkeitä, jotta voidaan varmistaa, että rottien karvatupet ovat vielä uinuvassa tilassa ennen aikuisen yksilön karvankasvun alkua.

15. Nuorten (noin 22 päivän ikäisten) uros- tai naarasrottien (Wistar tai vastaava kanta) selästä ja kyljistä ajetaan karvat tarkasti pienillä karvaleikkureilla. Sen jälkeen eläimet pestään huolellisesti pyyhkimällä, ja alue, jolta on poistettu karvat, käsitellään antibioottiliuoksella (jossa on esimerkiksi streptomysiiniä, penisilliiniä, kloramfenikolia ja amfoterisiiniä bakteerikasvua tehokkaasti estävinä pitoisuuksina). Eläimet pestään jälleen antibioottiliuoksella kolmantena tai neljäntenä päivänä ensimmäisen pesun jälkeen ja käytetään kokeisiin kolmen päivän sisällä toisesta pesusta, kun marraskesi on toipunut karvojen poistosta.

Ihonäytteiden valmistus

16. Eläimet lopetetaan inhimillisesti 28–30 päivän ikäisinä; ikävaatimus on ehdoton. Kunkin eläimen selkä- ja kylkinahka poistetaan ja nahasta kuoritaan tarkasti ylimääräinen ihonalainen rasva. Ihosta otetaan läpimitaltaan noin 20 mm:n suuruiset näytteet. Ihonäytteet voidaan varastoida ennen niiden käyttöä, jos voidaan osoittaa, että positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla saatavat tiedot vastaavat tuoreilla näytteillä saatuja.

17. Kukin ihonäyte asetetaan polytetrafluoroetyleeniputken (PTFE-putken) toisen pään yli siten, että orvaskesipinta on kosketuksissa putken kanssa. Ihonäyte kiristetään paikalleen kumisella O-renkaalla, ja liika nahka leikataan pois. O-rengas tiivistetään huolellisesti PTFE-putken päähän vaseliinilla. Putki kiinnitetään jousipidikkeellä koeastian sisälle, jossa on $MgSO_4$-liuosta (154 mM) (kuva 1). Ihonäyte on upotettava $MgSO_4$-liuokseen kokonaan. Yhdestä rotan nahasta on mahdollista saada 10–15 ihonäytettä. Kuvassa 2 esitetään putken ja O-renkaan mitat.

18. Ennen testauksen alkua mitataan kahden ihonäytteen sähkövastus kunkin eläimen nahan laadunvarmistusmenettelynä. Kummankin näytteen vastusarvon on oltava yli 10 k,Ω jotta muita nahasta saatuja ihonäytteitä voidaan käyttää testissä. Jos vastusarvo on alle 10 kΩ, kaikki samasta nahasta saadut näytteet on hylättävä.

Testikemikaalin ja kontrolliaineiden annostelu

19. Kussakin testissä (kokeessa) on käytettävä samanaikaisia positiivisia ja negatiivisia kontrolleja, jotta voidaan varmistaa, että testimalli on tarpeeksi tehokas. Kussakin testissä (kokeessa) on käytettävä vain yhdestä eläimestä otettuja ihonäytteitä. Suositellut kontrolliaineet ovat 10 M suolahappo (positiivinen kontrolli) ja tislattu vesi (negatiivinen kontrolli).

▼M8

20. Nestemäiset testikemikaalit (150 μl) applikoidaan tasaisesti putken sisäpuolella olevalle orvaskesipinnalle. Kun testataan kiinteitä aineita, ainetta on pantava näytteen päälle tasaisesti riittävä määrä, jotta se peittää koko orvaskesipinnan. Kiinteän aineen päälle lisätään sitten deionisoitua vettä (150 lμ), ja putkea ravistellaan varovasti. Jotta kiinteä aine olisi mahdollisimman hyvin kosketuksissa ihon kanssa, testikemikaalia voidaan sulattaa tai pehmentää lämmittämällä se $30^{0;}$seen tai se voidaan jauhaa rakeiseksi tai jauhemaiseksi.

21. Kutakin testi- ja kontrollikemikaalia kohti käytetään jokaisessa testissä (kokeessa) kolme ihonäytettä. Testikemikaaleja pidetään ihonäytteissä 24 tuntia 20–23 °C:n lämpötilassa. Testikemikaali poistetaan pesemällä ihonäytettä vesihanan alla enintään huoneenlämpötilassa, kunnes ainetta ei enää irtoa.

Ihon sähkövastuksen mittaukset

22. Ihon impedanssi mitataan ihon sähkövastuksena matalajännitevaihtovirtasillalla (Wheatstone-silta) (18). Sillan yleiset eritelmät ovat: käyttöjännite 1–3 volttia, vaihtovirta 50–1 000 Hz (sini- tai suorakaideaalto) ja mittausalue vähintään 0,1–30 kΩ. Validointitutkimuksessa käytetty silta mittasi induktanssin aina arvoon 2 000 H, kapasitanssin arvoon 2 000 μF ja vastuksen arvoon 2 MΩ taajuuksilla 100 Hz tai 1 kHz sarja-arvoina tai rinnakkaisina arvoina. Syövyttävyystestissä ihon sähkövastusmäärityksen mittaukset kirjataan vastuksena taajuudella 100 Hz ja sarja-arvoina. Ennen sähkövastuksen mittausta ihon pintajännitystä pienennetään lisäämällä putkeen 70-prosenttista etanolia sen verran, että orvaskesi peittyy. Etanoli poistetaan putkesta muutaman sekunnin kuluttua, ja kudos hydratoidaan lisäämällä 3 ml $MgSO_4$-liuosta (154 mM). Mittaussillan elektrodit asetetaan ihonäytteen molemmille puolille vastuksen mittaamiseksi kilo-ohmeina (kΩ) ihonäytettä kohti (kuva 1). Elektrodien mitat ja hauenleukapidikkeen alapuolella olevan elektrodin pituus esitetään kuvassa 2. Sisemmän elektrodin pidike pidetään vastusmittauksen aikana PTFE-putken päällä sen varmistamiseksi, että sama pituus elektrodia on upotettuna $MgSO_4$-liuokseen. Ulompi elektrodi asetetaan koeastian sisälle siten, että se lepää astian pohjalla. Jousipidikkeen ja PTFE-putken pohjan välinen etäisyys pidetään vakiona (kuva 2), koska tämä etäisyys vaikuttaa mitattavaan vastuksen arvoon. Samoin sisemmän elektrodin ja ihonäytteen välisen etäisyyden on oltava vakio ja mahdollisimman pieni (1–2 mm).

23. Jos mitattu vastusarvo on yli 20 kΩ, se voi johtua siitä, että testikemikaalin jäänteet peittävät ihonäytteen orvaskesipinnan. Tätä kerrosta voidaan yrittää poistaa esim. sulkemalla PTFE-putki peukalolla (suojakäsine kädessä) ja ravistelemalla putkea noin 10 sekuntia. $MgSO_4$-liuos heitetään pois ja vastusmittaus toistetaan tuoreen $MgSO_4$-liuoksen kanssa.

24. Testauslaitteiden ominaisuudet ja mitat sekä koemenetelmä voivat vaikuttaa saatuihin ihon sähkövastusarvoihin. Viiden kΩ:n syövyttävyysraja perustuu tässä testimenetelmässä kuvatuilla erityislaitteilla ja menettelyllä saatuihin mittaustuloksiin. Jos testiolosuhteita muutetaan tai jos käytetään erilaisia laitteita, voi olla tarpeen käyttää eri raja- ja kontrolliarvoja. Siksi menetelmä ja vastuksen raja-arvot pitää kalibroida testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita, jotka on valittu validointitutkimuksessa käytettyjen aineiden joukosta (8) (9) tai vastaavista kemikaaliluokista kuin testattavat kemikaalit. Taulukossa 1 on luettelo sopivista pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista.

▼M8

Väriaineen sitomista mittaavat menetelmät

25. Altistus tietyille syövyttämättömille materiaaleille voi vähentää vastusta alle 5 kΩ:n raja-arvon ja mahdollistaa ionien pääsyn marraskeden läpi, jolloin sähkövastus pienenee (9). Esimerkiksi neutraalit orgaaniset aineet ja pinta-aktiiviset aineet (mm. puhdistusaineet, emulgointiaineet ja muut pinta-aktiiviset aineet) voivat poistaa ihon lipidejä ja lisätä ihon läpäisevyyttä ioneille. Jos tällaisilla kemikaaleilla saadut ihon sähkövastusarvot ovat alle tai noin 5 kΩ mutta jos ihonäytteissä ei ole näkyvää vauriota, on määritettävä väriaineen tunkeutuminen kontrollinäytteiden ja käsiteltyjen näytteiden kudokseen sen selvittämiseksi, johtuvatko ihon sähkövastusarvot ihon läpäisevyyden lisääntymisestä vai ihon syöpymästä (7) (9). Kun on kyse syöpymästä, jossa marraskesi on vaurioitunut, ihon pinnalle levitetty sulforodamiini B -väriaine tunkeutuu nopeasti ihoon ja värjää pinnanalaisen kudoksen. Kyseinen väriaine on stabiili useiden eri aineiden kanssa, eikä jäljempänä kuvattu uuttomenettely vaikuta siihen.

Sulforodamiini B -väriaineen levittäminen ja poistaminen

26. Ihon sähkövastusmäärityksen jälkeen magnesiumsulfaatti poistetaan putkesta. Tämän jälkeen tutkitaan tarkasti, onko ihossa selviä vaurioita. Jos selviä suuria vaurioita (esimerkiksi reikiä) ei ole, kunkin ihonäytteen orvaskeden pinnalle levitetään 150 µl tislatulla vedellä tehtyä 10-prosenttista (paino/tilavuus) laimennosta sulforodamiini B -väriaineesta (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS-numero 3520-42-1) kahdeksi tunniksi. Sen jälkeen näitä ihonäytteitä pestään vesihanan alla huoneenlämpötilassa noin 10 sekuntia liiallisen tai sitoutumattomanväriaineen poistamiseksi. Ihonäytteet poistetaan varovasti PTFE-putkista ja pannaan pulloon (esim. 20 ml:n lasinen tuikelaskentapullo), jossa on deionisoitua vettä (8 ml). Pulloja ravistellaan varovasti 5 minuuttia mahdollisen jäljellä olevan sitoutumattoman väriaineen poistamiseksi. Huuhtelu toistetaan, ja sen jälkeen ihonäytteet otetaan pulloista, pannaan toisiin pulloihin, joissa on 5 ml 30-prosenttista (paino/tilavuus) natriumdodekyylisulfaattia (SDS) tislatussa vedessä, ja inkuboidaan yön yli 60 °C:ssa.

27. Inkubaation jälkeen ihonäytteet otetaan pulloista ja heitetään pois. Jäljellä olevaa liuosta sentrifugoidaan 8 minuuttia 21 °C:ssa (suhteellinen keskipakoisvoima ~175 × g). Supernatantista otetaan 1 ml:n näyte, joka laimennetaan 1:5:een (tilavuus/tilavuus) [ts. 1 ml + 4 ml] 30-prosenttisella (paino/tilavuus) SDS:llä tislatussa vedessä. Liuoksen optinen tiheys mitataan aallonpituudella 565 nm.

Väriaineen pitoisuuden laskeminen

28. Sulforodamiini B -väriaineen pitoisuus ihonäytteessä lasketaan optisen tiheyden arvoista (9) (sulforodamiini B:n molaarinen absorptiokerroin aallonpituudella 565 nm = 8,7 × $l0^4$; molekyylipaino = 580). Väriaineen pitoisuus ihonäytteessä määritetään käyttämällä sopivaa kalibrointikäyrää, ja väriaineen keskiarvopitoisuus lasketaan sitten rinnakkaisnäytteistä.

Hyväksymisperusteet

29. Ihon sähkövastusmittausten keskiarvot hyväksytään, jos samaan aikaan mitatut positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden määritysten tulokset ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa testilaboratoriossa. Hyväksyttävät vastusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita esitetään seuraavassa taulukossa:

▼**M8**

Kontrolli	Aine	Vastusalue (kΩ)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo	0,5–1,0
Negatiivinen	Tislattu vesi	10–25

30. Väriaineen sitoutumiskokeen keskiarvotulokset hyväksytään, jos samaan aikaan tehtyjen kontrolliaineiden määritysten tulokset ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa. Suositellut kontrolliaineiden hyväksyttävät väriainepitoisuusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita esitetään seuraavassa taulukossa:

Kontrolli	Aine	Väriaineen pitoisuusalue (μg/näyte)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo	40–100
Negatiivinen	Tislattu vesi	15–35

Tulosten tulkitseminen

31. Sähkövastusmäärityksen raja-arvo, jolla erotetaan syövyttävät testikemikaalit syövyttämättömistä, määritettiin testimenetelmän optimoinnin aikana, testattiin validointia edeltävässä vaiheessa ja vahvistettiin virallisessa validointitutkimuksessa.

32. Rotan ihon sähkövastusmääritykseen perustuvan ihosyövyttävyyden testimenetelmässä käytettävä ennustemalli (9) (19), joka liittyy YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokitusjärjestelmään, kuvataan alla:

Testiaineen katsotaan olevan ihoa syövyttämätön,

i) jos testikemikaalille saatu ihon sähkövastusarvo on suurempi kuin (>) 5 kΩ, tai

ii) jos testikemikaalille saatu ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 5 kΩ ja

— ihonäytteessä ei ole ilmeisiä vaurioita (esimerkiksi reikiä) ja

— ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on pienempi (<) kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (10M HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus (ks. positiivisen kontrollin arvot 30 kohdasta).

Testiaineen katsotaan olevan ihoa syövyttävä,

i) jos testikemikaalille saatu ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 5 kΩ ja ihonäytteissä on selviä vaurioita (esimerkiksi reikiä), tai

ii) jos testikemikaalille saatu ihon sähkövastusarvo (keskiarvo) on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 5 kΩ ja

— ihonäytteessä ei ole selviä vaurioita (esimerkiksi reikiä), mutta

▼M8

— ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on suurempi tai yhtä suuri (≥) kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (10M HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus (ks. positiivisen kontrollin arvot 30 kohdasta).

33. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, yleensä vähintään kolme kudosnäytettä käsittävä testiajo (koe) riittää. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset ja/tai jos sähkövastusarvon keskiarvo on 5 ± 0,5 kΩ, on harkittava toista riippumatonta testiajoa (koetta) ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testiajon (kokeiden) tulokset poikkeavat toisistaan.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

34. Vastusarvot (kΩ) ja tarvittaessa väripitoisuusarvot (μg/näyte) sekä testikemikaalista että positiivisista ja negatiivisista kontrolleista on ilmoitettava taulukossa. Myös tiedot jokaisen testiajon (kokeen) yksittäisistä rinnakkaisnäytteistä ja keskiarvot ± keskihajonta on ilmoitettava. Niin ikään kaikki toistetut kokeet on raportoitava. Ihonäytteissä havaitut vauriot on ilmoitettava jokaisen testikemikaalin osalta.

Testiraportti

35. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrolliaineet:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— Monesta ainesosasta muodostuva aine, UVCB-aineet ja seos: luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrolliaineen käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Koe-eläimet:

— käytetty kanta ja sukupuoli

— eläinten ikä, kun niitä käytetään luovuttajaeläiminä

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— tiedot ihonäytteestä.

▼**M8**

Testiolosuhteet:

— testilaitteiden kalibrointikäyrät

— väriaineensitomistestin kalibrointikäyrät, optisten tiheysarvojen mittaamisessa käytetty kaistanpäästösuodatin ja mittalaitteen (esimerkiksi spektrofotometrin) optisen tiheyden lineaarisuusalue tarvittaessa

— tiedot ihon sähkövastuksen mittauksiin käytetystä testimenettelystä

— tiedot väriaineensitomistestissä käytetystä testimenettelystä (tarvittaessa)

— käytetyt testiannokset, altistusjakson (-jaksojen) kesto ja altistuslämpötila(t)

— tiedot altistusjakson jälkeen käytetystä pesumenetelmästä

— testikemikaalia ja kontrolleja (positiiviset ja negatiiviset kontrollit) kohti käytettyjen rinnakkaisihonäytteiden lukumäärä

— kuvaus testimenettelyn mahdollisista muutoksista

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla esimerkiksi

  i) positiivisten ja negatiivisten kontrollien sähkövastusarvojen (yksikössä kΩ) hyväksyttävyys verrattuna positiivisten ja negatiivisten kontrollien vastusalueisiin

  ii) positiivisten ja negatiivisten kontrollien väriaineen pitoisuusarvojen (yksikössä µg/näyte) hyväksyttävyys verrattuna positiivisten ja negatiivisten kontrollien väriaineen pitoisuusalueisiin

  iii) testitulosten hyväksyttävyys verrattuna rinnakkaisihonäytteiden aikaisempaan vaihteluun

— kuvaus sovelletuista päätöksentekoperusteista / käytetystä ennustemallista.

Tulokset:

— taulukko sähkövastusmäärityksen ja (tarvittaessa) väriaineensitomistestin tiedoista jokaisen testikemikaalin ja kontrollin osalta, jokaisesta testiajosta (kokeesta) ja jokaisesta rinnakkaisihonäytteestä (yksittäiset eläimet ja yksittäiset ihonäytteet), keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet

— kuvaus mahdollisista havaituista vaikutuksista

— tulosten perusteella tehty luokitus ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekoperusteista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet Kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavana osoitteessa [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Tämän liitteen luku B.4, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(3) Tämän liitteen luku B.40 a, *In vitro* -ihmisihomallitesti.

(4) Tämän liitteen luku B.65, *In vitro* -kalvoestetestimenetelmä.

(5) Tämän liitteen luku B.46, *In vitro* -ihoärsyttävyys: rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219–255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471–482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483–524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA* 23, 129–147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97–3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Taloudellisen yhteistyön ja kehityksen järjestö, Pariisi.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507–512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6, 191–194.

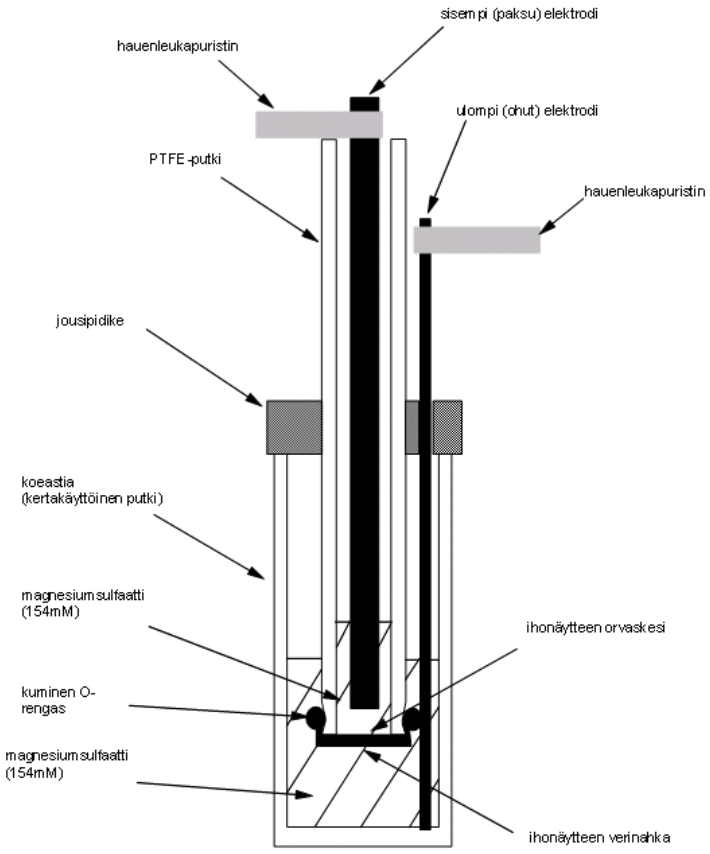
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul. *Toxicol. Pharmacol.* 62, 393–403.

(19) Sähkövastusmääritystestin vakiotoimintamenettelyt (joulukuu 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

Kuva1

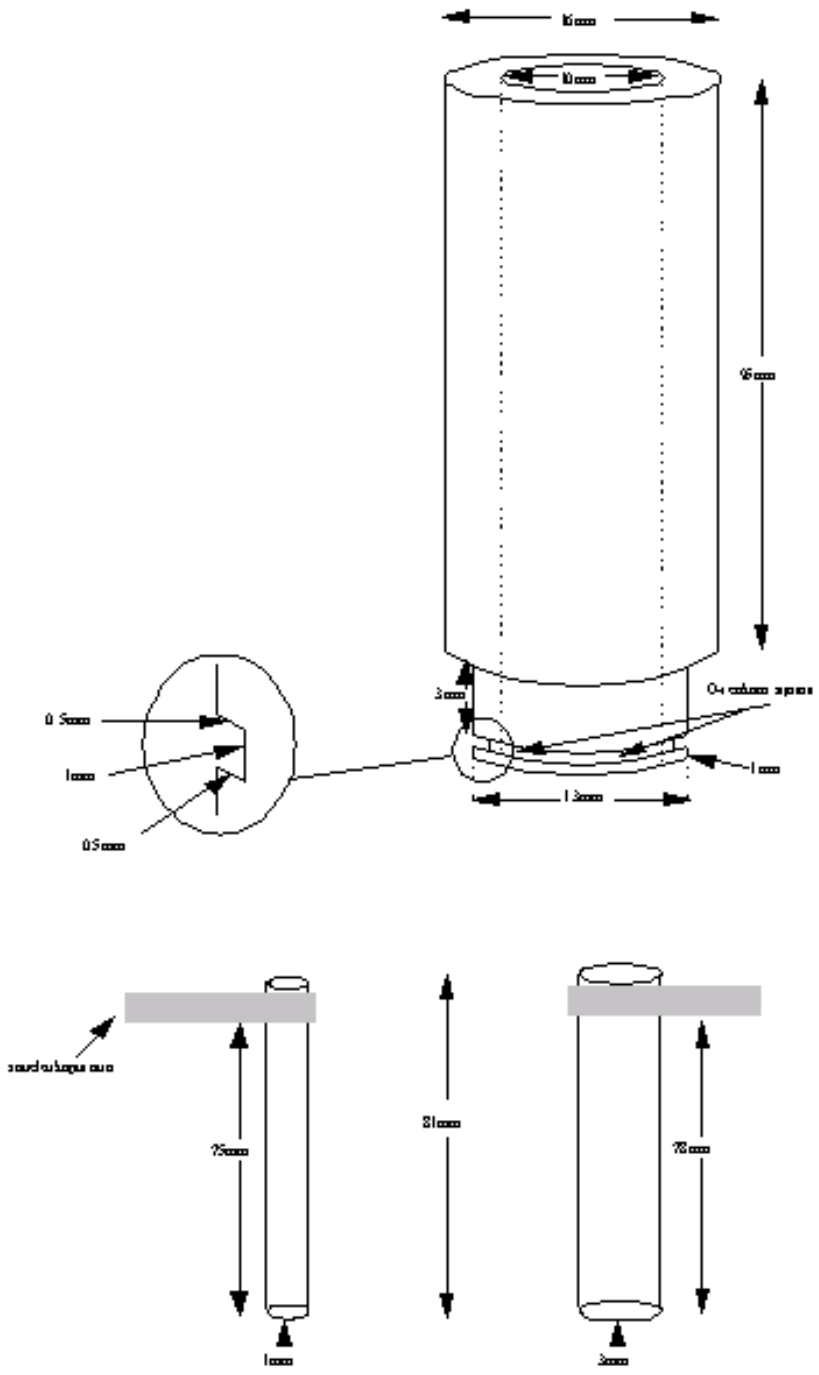
Rotan ihon Sähkövastuksen Määrityslaite



▼**M8**

Kuva 2

Polytetrafluoroetyleeniputken (PTFE-Putken), Koeastioiden ja Elektrodien mitat



Yllä kuvattujen laitteiden kriittiset tekijät:

— PTFE-putken sisähalkaisija

— elektrodien pituus suhteessa PTFE-putkeen ja koeastiaan siten, että ihonäyte ei ole kosketuksissa elektrodeihin ja että vakiomitta elektrodia on kosketuksissa $MgSO_4$-liuoksen kanssa

▼**M8**

— $MgSO_4$-liuosta on oltava koeastiassa sellainen määrä, että nesteellä on tietty syvyys suhteessa nesteen tasoon PTFE-putkessa (kuvassa 1 esitetyllä tavalla)

— ihonäyte on kiinnitettävä PTFE-putkeen tarpeeksi hyvin, jotta sähkövastus ilmentäisi ihon ominaisuuksia oikein.

▼**M8**

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (20).

S: Syövyttävä

Kemikaali: Aine tai seos.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimenetelmille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään joskus toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi. Vastaavuuteen vaikuttaa suuresti positiivisten tulosten esiintyminen tutkittavien testikemikaalien tyypeissä (20).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niihin liittyvät vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment, testauksen ja arvioinnin yhdennetyt lähestymistavat.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu vähintään kahdesta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

ES: Ei syövyttävä.

OD: Optinen tiheys.

PK: Positiivinen kontrolli, näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

▼**M8**

Suoritusvaatimukset: Validoituun testimenetelmään perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Tähän sisältyvät: i) testimenetelmän oleelliset osat, ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat luotettavuuden ja tarkkuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla.

Merkityksellisyys: Kuvaus testimenetelmän ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testimenetelmä tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testimenetelmällä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (20).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (20).

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmällä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (20).

Ihosyövyttävyys *in vivo*: Korjautumattoman ihovaurion eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet sekä 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden yhteydessä on harkittava histopatologista tutkimusta.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmällä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (20).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantoprosessein tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

(Testi)ajo: Yksittäinen testikemikaali, jota testataan samanaikaisesti vähintään kolmella rinnakkaisihonäytteellä.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Ihon sähkövastusmääritystesti (TER): Ihon sähkövastus on ihon sähköisen impedanssin mittayksikkö (kilo-ohmeina). Kyseessä on ihon suojaavan vaikutuksen arviointiin käytettävä yksinkertainen ja luotettava menetelmä, jossa rekisteröidään ihon läpi kulkevat ionit Wheatstone-siltamittauksella.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

▼M8

B.*40a. IN VITRO* IHOSYÖVYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 431 (2016). Ihosyövyttävyydellä tarkoitetaan pysyvän ihovaurion eli orvaskeden läpi verinahkaan ulottuvan näkyvän kuolion ilmaantumista testiaineen annostelun jälkeen [Yhdistyneiden kansakuntien yhdenmukaistetussa kemikaalien luokittelu- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EU) 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti]. Tässä päivitetyssä testimenetelmässä B.40 a kuvataan *in vitro* -menetelmä, jolla voidaan tunnistaa syövyttämättömät ja syövyttävät aineet ja seokset YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti. Sen avulla voidaan myös osittain luokitella syövyttäviä aineita alaluokkiin.

2. Kemikaalien ihosyövyttävyyspotentiaalin arvioinnissa on yleensä käytetty koe-eläimiä (testimenetelmä B.4, vastaa OECD:n testiohjetta 404; hyväksytty ensimmäisen kerran vuonna 1981 ja tarkistettu vuosina 1992, 2002 ja 2015) (2). Tämän testimenetelmän B.40 a lisäksi kaksi muuta kemikaalien ihosyövyttävyyspotentiaalin testaamiseen validoitua ja hyväksyttyä *in vitro* -testimenetelmää ovat testimenetelmät B.40 (vastaa OECD:n testiohjetta 430) (3) ja B.65 (vastaa OECD:n testiohjetta 435) (4). Lisäksi *in vitro* -testimenetelmä B.46 (vastaa OECD:n testiohjetta 439) (5) on hyväksytty ihoärsyttävyyspotentiaalin testaamiseen. Ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja sisältävässä OECD:n ohjeasiakirjassa kuvataan useita moduuleita, joihin on ryhmitelty tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä annetaan ohjeita siitä, i) miten integroida ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja testauksen ulkopuolella saatuja tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa, ja ii) selostetaan, miten toimitaan, kun lisätestaus on tarpeen (6).

3. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihosyövyttävyyttä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Siinä käytetään (ihmisen orvaskeden keratinosyyteistä peräisin olevilla soluilla) rekonstruoitua ihmisen orvaskettä (Reconstructed human Epidermis, RhE), joka jäljittelee läheisesti ihmisihon ylemmän kerroksen eli epidermiksen histologisia, morfologisia, biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia. Vastaava OECD:n testiohje hyväksyttiin ensimmäisen kerran vuonna 2004. Se päivitettiin vuonna 2013 lisäämällä siihen muita RhE-mallia hyödyntäviä testimenetelmiä ja mahdollisuus käyttää menetelmiä syövyttävien kemikaalien alaluokkiin luokittelemisen tukena. Testiohje päivitettiin myös vuonna 2015 lisäämällä siihen viittauksia testauksen ja arvioinnin yhdennettyihin lähestymistapoihin ja ottamalla käyttöön elinkykyisyyden mittaamiseen tarkoitettu vaihtoehtoinen menettely.

4. Tähän testimenetelmään sisältyy neljä validoitua kaupallisesti saatavilla olevaa RhE-mallia. Kahdesta näistä kaupallisesti saatavilla olevasta testimallista, jotka ovat EpiSkin™ Standard Model (SM) ja EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (joista käytetään jäljempänä nimitystä validoidut vertailumenetelmät eli VVM:t), on tehty validointia edeltävät tutkimukset (7) ja sen jälkeen ihosyövyttävyyden arviointia (8) (9) (10) koskeva virallinen validointitutkimus (11) (12). Näiden tutkimusten tulosten perusteella annettiin suositus, jonka mukaan näitä kahta edellä mainittua validoitua vertailumenetelmää voidaan käyttää sääntelytarkoituksissa syövyttävien ja syövyttämättömien aineiden erottamiseen ja EpiSkin™-menetelmää voidaan käyttää

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M8

lisäksi syövyttävien aineiden alaluokkiin luokittelemisessa (13) (14) (15). Kahdella muulla kaupallisesti saatavilla olevalla in vitro -ihosyövyttävyyden RhE-testimallilla on saatu samanlaisia tuloksia kuin EpiDerm™-VVM:llä suoritusvaatimuksiin perustuvan validoinnin mukaan (16) (17) (18). Nämä testit ovat SkinEthic™ RHE ([1]) ja epiCS® (aikaisempi nimi oli EST-1000), ja myös niitä voidaan käyttää sääntelytarkoituksiin syövyttävien ja syövyttämättömien aineiden erottelemisessa (19) (20). RhE-mallin tekijät tekivät vuosina 2012–2014 validoinnin jälkeisiä tutkimuksia, joissa testimenettelyä oli parannettu korjaamalla epäspesifistä MTT:n pelkistyksestä johtuneet häiriöt, joita testikemikaalit aiheuttivat. Tämä paransi sekä syövyttävien ja syövyttämättömien aineiden erottelun tarkkuutta ja helpotti syövyttävien aineiden luokittelua alaluokkiin (21) (22). EpiDerm™ SCT-, SkinEthic™ RHE- ja EpiCS®-testillä tuotetuista validoinnin jälkeisistä tiedoista on tehty myös tilastoanalyyseja, jotta voidaan määrittää muitakin ennustemalleja, jotka parantavat ennustettavuutta alaluokkiin luokittelun osalta (23).

5. Ennen kuin sääntelytarkoituksissa voidaan käyttää muita ihosyövyttävyyden arviointiin ehdotettua samankaltaista tai muutettua *in vitro* -RhE-testimenetelmää kuin validoitua vertailumenetelmiä, on selvitettävä ehdotetun menetelmän luotettavuus, merkityksellisyys (tarkkuus) ja sen ehdotetun käytön rajoitukset, jotta voidaan varmistua siitä, että se on samanlainen kuin validoidut vertailumenetelmät (24), OECD:n ohjeasiakirjassa 34 esitettyjen periaatteiden mukaan määritettyjen suoritusvaatimusten mukaisesti (25). Tietojen vastavuoroinen hyväksyntä taataan vasta, kun ehdotettu uusi tai päivitetty suoritusvaatimusten mukainen testimenetelmä on tarkistettu ja sisällytetty vastaavaan testiohjeeseen. Maat voivat käyttää tässä testiohjeessa olevia testimalleja määrittäessään ihosyövyttävyyden *in vitro* -testimenetelmän testituloksia koskevia vaatimuksiaan, ja samalla ne voivat hyödyntää tietojen vastavuoroista hyväksyntää.

MÄÄRITELMÄT

6. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Tällä testimenetelmällä voidaan tunnistaa syövyttämättömät ja syövyttävät aineet ja seokset YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti. Lisäksi tästä testimenetelmästä on apua luokiteltaessa syövyttäviä aineita ja seoksia valinnaiseen alaluokkaan 1A YK:n GHS-järjestelmän (1) mukaisesti ja yhdistettyihin alaluokkiin 1B ja 1C (21) (22) (23). Tämän testimenetelmän rajoitus on se, ettei sen avulla voida erotella ihosyövyttävyyttä alaluokkiin 1B ja 1C YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti, koska alaluokkaan 1C kuuluvia tunnettuja kemikaaleja, jotka ovat syövyttäviä *in vivo*, on vähän. EpiSkin™-, EpiDerm™ SCT-, SkinEthic™ RHE- ja epiCS®-testimalleilla voidaan luokitella kemikaaleja myös alaluokkiin (ts. 1A vs. 1B ja 1C vs. syövyttämättömät aineet).

8. Tähän testimenetelmään sisältyviä, syövyttämättömien ja syövyttävien aineiden määrittämisessä käytettyjä testimalleja tukevassa validoinnissa on testattu laaja joukko kemikaaleja, jotka edustavat pääasiassa yksittäisiä aineita; validointitutkimuksen empiirisessä tietokannassa oli 60 kemikaalia, jotka kattoivat laajalti eri kemikaaliluokkia (8) (9) (10). Testimenetelmän kehittäjät tekivät testejä, joissa osoitettiin alaluokkiin luokittelua koskevan testin herkkyys, spesifisyys,

([1]) Lyhennettä RhE (= Reconstructed human Epidermis, rekonstruoitu ihmisorvaskesi) käytetään kaikista malleista, jotka perustuvat RhE-teknologiaan. SkinEthic™-malliin yhdistetty RHE-lyhenne tarkoittaa samaa, mutta koska se on osa tämän nimenomaisen testimenetelmän markkinoinnissa käytettävää nimeä, se kirjoitetaan isoin kirjaimin.

▼M8

tarkkuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus, ja OECD tarkasti testien tulokset (21) (22) (23). Kaikkien saatavilla olevien tietojen perusteella tätä testimenetelmää voidaan soveltaa hyvin moniin kemikaaliluokkiin ja aineiden fysikaalisiin olomuotoihin, myös nesteisiin, puolikiinteisiin ja kiinteisiin aineisiin sekä vahamaisiin aineisiin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan jauhettava hienoksi jauheeksi ennen applikointia; näytteen muuta esikäsittelyä ei vaadita. Jos voidaan osoittaa, etteivät tähän testimenetelmään sisältyvät testimallit sovi käytettäväksi tiettyjen testikemikaaliluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin. Sen ohella, että tämä testimenetelmä soveltuu aineiden testaamiseen, sen oletetaan soveltuvan myös seosten testaamiseen. Koska seokset kattavat laajan joukon luokkia ja koostumuksia ja koska seosten testaamisesta on tällä hetkellä saatavilla vain vähän tietoa, niissä tapauksissa, joissa voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen seosluokkien kanssa (esimerkiksi lähdeviitteessä (26) ehdotetun strategian mukaisesti), testimenetelmää ei pidä käyttää niihin. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksissa (8) (9) (10). Vaikka voidaan ajatella, että niitä voidaan testata RhE-tekniikalla, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei kuitenkaan voida testata.

9. Testikemikaalit, jotka absorboivat valoa samalla aallonpituudella kuin MTT-formatsaani, ja testikemikaalit, jotka voivat suoraan pelkistää MTT-vitaaliväriä (MTT-formatsaaniksi), voivat häiritä kudoksen elinkykyisyysmittauksia, ja niiden yhteydessä on käytettävä mukautettuja kontrolleja korjauksiin. Mahdollisesti tarvittavien mukautettujen kontrollien tyyppi vaihtelee sen mukaan, millaista häiriötä testikemikaali tuottaa ja mitä menetelmää MTT-formatsaanin mittaamisessa käytetään (ks. 25–31 kohta).

10. Tällä testimenetelmällä ei saada asianmukaista tietoa ihoärsytyksestä, mutta testimenetelmä B.46 koskee nimenomaan terveysvaikutusta ihoärsytys *in vitro*, ja se perustuu samaan RhE-testijärjestelmään, vaikka siinä käytetään toisenlaista protokollaa (5). Jotta paikalliset ihovaikutukset ihon kerta-altistuksen jälkeen voidaan arvioida kattavasti, on tukeuduttava testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan (6). Näihin lähestymistapoihin kuuluu ihosyövyttävyystestien (tässä kuvattu testimenetelmä) ja ihoärsytystestien suorittaminen *in vitro* ennen testauksen harkitsemista elävillä eläimillä. Ihmisihon käyttöön on sovellettava kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä käytäntöjä ja ehtoja.

TESTIN PERIAATE

11. Testikemikaalia applikoidaan paikallisesti kolmiulotteiseen rekonstruoituun ihmisorvaskesimalliin. Se koostuu ihmisestä saaduista muuntamattomista orvaskeden keratinosyyteistä, jotka on viljelty ihmisen orvaskeden monikerroksiseksi, täysin erilaistuneiden solujen malliksi. Se koostuu järjestyneistä ja selkeistä tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksista ja monikerroksisesta marraskedestä, joka sisältää solujenvälisiä lamellaarisia lipidikerroksia, jotka edustavat myös *in vivo* -kokeissa havaittuja lipidiluokkia.

▼M8

12. RhE-testimenetelmän periaate perustuu oletukseen, jonka mukaan syövyttäviä kemikaaleja ovat ne, jotka pystyvät tunkeutumaan marrasketeen (diffundoitumalla tai eroosion seurauksena) ja ovat myrkyllisiä alemmissa solukerroksissa oleville soluille. Solujen elinkyky mitataan siten, että entsyymit muuntavat vitaaliväri MTT:n [3-(4,5-dimetyylitiatsol-2yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi, tiatsolyylisininen; CAS-numero 298-93-1] siniseksi formatsaanisuolaksi, joka mitataan kvantitatiivisesti, kun se on uutettu kudoksista (27). Syövyttävät kemikaalit tunnistetaan niiden kyvystä alentaa solun elinkykyä määritettyjen kynnysarvojen alle (ks. 35 ja 36 kohta). RhE-malliin perustuvan ihosyövyttävyyden testimenetelmän on osoitettu voivan ennustaa ihoa syövyttäviä vaikutuksia *in vivo* kaneilla, kun niitä on arvioitu testimenetelmän B.4 mukaisesti (2).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

13. Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää mitään näistä neljästä tähän testimenetelmään kuuluvasta validoidusta RhE-testimallista rutiininomaisesti, sen on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla taulukossa 1 suositellut 12 ainetta oikein. Jos menetelmää käytetään alaluokkiin luokittelemiseen, pätevyys on osoitettava myös siinä. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla tai jos se on perusteltua, voidaan käyttää toista ainetta, josta on saatavana asianmukaiset *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutiedot (esimerkiksi vertailukemikaalien luettelosta (24)), kunhan sovelletaan taulukossa 1 kuvattuja samoja valintaperusteita.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet ([1])

Aine	CAS-nro	Kemikaaliluokka ([2])	YK:n GHS-järj. / CLP-as. luokitus. *In vivo* -tulosten perusteella ([3])	VVM Luokka, joka perustuu *in vitro* -tuloksiin ([4])	MTT-pelkistin ([5])	Fyysinen olomuoto
Alaluokka 1A *In vivo* syövyttävät aineet						
Bromietikkahappo	79-08-3	Orgaaninen happo	1A	(3) 1A	—	Ki
Booritrifluorididihydraatti	13319-75-0	Epäorgaaninen happo	1A	(3) 1A	—	N
Fenoli	108-95-2	Fenoli	1A	(3) 1A	—	Ki
Diklooriasetyyli-kloridi	79-36-7	Elektrofiili	1A	(3) 1A	—	N
Alaluokkien 1B ja 1C (*in vivo* syövyttävät aineet) yhdistelmä						
Glyoksyylihappo-monohydraatti	563-96-2	Orgaaninen happo	1B ja 1C	(3) 1B ja 1C	—	Ki
Maitohappo	598-82-3	Orgaaninen happo	1B ja 1C	(3) 1B ja 1C	—	N
Etanoliamiini	141-43-5	Orgaaninen emäs	1B	(3) 1B ja 1C	K	Viskoosinen

▼**M8**

Aine	CAS-nro	Kemikaaliluokka ([2])	YK:n GHS-järj. / CLP-as. luokitus. *In vivo* -tulosten perusteella ([3])	VVM Luokka, joka perustuu *in vitro* -tuloksiin ([4])	MTT-pelkistin ([5])	Fyysinen olomuoto
Alaluokka 1A *In vivo* syövyttävät aineet						
Suolahappo (14,4 %)	7647-01-0	Epäorgaaninen happo	1B ja 1C	(3) 1B ja 1C	—	N
In vivo syövyttämättömät aineet						
Fenetyylibromidi	103-63-9	Elektrofiili	ES	(3) ES	K	N
4-amino-1,2,4-triatsoli	584-13-4	Orgaaninen emäs	ES	(3) ES	—	Ki
4-(metyylitio)-bentsaldehydi	3446-89-7	Elektrofiili	ES	(3) ES	K	N
Lauriinihappo	143-07-7	Orgaaninen happo	ES	(3) ES	—	Ki

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; VVM = validoitu vertailumenetelmä; ES = ei syövyttävä K= kyllä; L=neste; Ki=kiinteä

([1]) Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet, jotka on lajiteltu syövyttäviin vs. syövyttämättömiin aineisiin, sen jälkeen syövyttävien aineiden alaluokkiin ja lopuksi kemikaaliluokan mukaan, valittiin ECVAMin validointitutkimuksissa (EpiSkin™ ja EpiDerm™) käytetyistä aineista (8) (9) (10) ja validoinnin jälkeen tehdyistä tutkimuksista, jotka perustuivat EpiSkin™- (22), EpiDerm™-, SkinEthic™- ja epiCS®-testien kehittäjien saamiin tietoihin (23). Ellei muuta ole mainittu, aineet testattiin sillä puhtaustasolla, joka niillä oli kaupallisesta lähteestä ostettuina (8) (10). Mahdollisuuksien mukaan valikoimassa oli aineita, jotka i) edustavat syövyttävyysvasteiden vaihteluväliä (ts. syövyttämättömiä sekä heikosti ja voimakkaasti syövyttäviä aineita), joka voidaan mitata tai ennustaa vaihtoehtoisella vertailumenetelmällä, ii) edustavat validointitutkimuksissa käytettyjä kemikaaliluokkia, iv) ovat kemialliselta rakenteeltaan tarkoin määritettyjä, iv) tuottavat toistettavissa olevia tuloksia validoidulla vertailumenetelmällä tehdyissä tutkimuksessa, v) antavat varmoja tuloksia *in vivo* -vertailutestimenetelmällä, vi) ovat kaupallisesti saatavilla, ja vii) joiden hävityskustannukset eivät ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

([2]) Kemikaaliluokka Barrattin *ym.* mukaan (8).

([3]) YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisia luokkia 1A, 1B ja 1C vastaavat YK:n pakkausryhmät ovat I, II ja III.

([4]) Tässä taulukossa esitetyt validoiduilla vertailumenetelmillä saadut *in vitro* -ennusteet saatiin EpiSkin™- ja the EpiDerm™-testimalleilla (VVM:t) validoinnin jälkeisessä testauksessa, jonka tekivät testimenetelmän kehittäjät.

([5]) ECVAMin ihosyövyttävyyden validointitutkimuksissa saatuja elinkykyisyysarvoja ei korjattu suoran MTT-pelkistyksen osalta (validointitutkimuksissa ei käytetty kuolleita kontrolleja). Testimenetelmän kehittäjien saamat validoinnin jälkeiset tiedot, jotka on esitetty tässä taulukossa, hankittiin kuitenkin mukautettuja kontrolleja (23) käyttäen.

14. Osana pätevyyden osoittamista käyttäjän on kudosten vastaanoton jälkeen tarkastettava kudosten läpäisevyysominaisuudet RhE-mallin kehittäjän vaatimusten mukaisesti. Tämä on erityisen tärkeää, jos kudoksia kuljetetaan pitkiä välimatkoja tai pitkiä aikoja. Kun testimenetelmä on otettu onnistuneesti käyttöön ja laboratorion pätevyys on osoitettu, tällaista tarkastusta ei tarvitse tehdä säännöllisesti. Jos menetelmää käytetään säännöllisesti, läpäisevyysominaisuudet on kuitenkin jatkossakin syytä arvioida säännöllisin väliajoin.

MENETTELY

15. Seuraavassa on yleinen kuvaus tämän testimenetelmän mukaisessa ihosyövyttävyyden määrittämisessä käytettävien RhE-testimallien osista ja menettelyistä. Tämän testimenetelmän mukaisesti käytettäviksi hyväksytyt tieteellisesti validit RhE-mallit (EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE ja epiCS®) (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33) ovat saatavana kaupallisista lähteistä. Näille neljälle RhE-mallille on laadittu vakiotoimintamenettelyt (34) (35) (36) (37), ja niiden pääasialliset testimenetelmän osat on esitetty lisäyksessä 2. Asianmukaisia vakiotoimintamenettelyjä on syytä noudattaa,

▼M8

kun jotakin näistä menetelmistä käytetään laboratoriossa. Tämän testimenetelmän mukaisiin neljään RhE-testimalliin perustuvien testien on oltava seuraavien edellytysten mukaiset:

RHE-TESTIMENETELMÄN OSAT

Yleiset ehdot

16. Epiteelin valmistamiseen on käytettävä muuntamattomia ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja (tyvisolukerros, okasolukerros ja jyväiskerros). Marraskedessä on oltava useita kerroksia ja olennainen lipidikoostumus, jotta se voi toimia esteenä sytotoksisten vertailukemikaalien, kuten natriumdodekyylisulfaatin (SDS) tai Triton X-100:n, nopealle kulkeutumiselle ihokerrosten läpi. Läpäisynestokyky on osoitettava, ja se voidaan arvioida joko määrittämällä pitoisuus, jossa vertailukemikaali vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) tietyn altistusajan jälkeen, tai määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan solun elinkyvyn vähenemiseen 50 prosentilla (ET_{50}), kun vertailukemikaalia käytetään tiettynä kiinteänä pitoisuutena (ks. 18 kohta). Mallin on oltava sellainen, että marraskeden ympärillä olevan materiaalin pääsy elävään kudokseen estyy, sillä marraskeden ympärillä olevien testikemikaalien pääsy kudokseen heikentää mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. RhE-mallissa ei saa olla kontaminaatiota (bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

Toimintaolosuhteet

Solujen elinkyky

17. Kudoksen elinkyky määritetään MTT-määrityksellä (27). RhE-kudoksen elinkykyiset solut pelkistävät vitaaliväri MTT:n saostuneeksi siniseksi MTT-formatsaaniksi, joka uutetaan kudoksista isopropanolilla (tai muulla vastaavalla liuottimella). Pelkän uuttoliuottimen optisen tiheyden (OD) on oltava riittävän pieni, ts. OD < 0,1. Uutettu MTT-formatsaani voidaan kvantifioida käyttämällä joko vakioabsorbanssimittausta (OD) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenettelyä (38). RhE-mallien käyttäjien on varmistettava, että kukin RhE-mallin erä täyttää negatiiviselle kontrollille asetetut vaatimukset. RhE-mallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo). Tähän testimenetelmään sisältyvien neljän validoidun RhE-testimallin negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue esitetään taulukossa 2. HPLC-/UPLC-spektrofotometrin käyttäjän on käytettävä taulukossa 2 esitettyjä negatiivisen kontrollin OD-vaihteluvälejä negatiivisen kontrollin hyväksymisperusteena. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen kudosten vakaus viljelmässä (niiden on annettava samanlaiset tulokset OD-mittauksesta) altistusjakson ajan on dokumentoitava.

Taulukko 2

Negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue erän laadunvalvonnassa

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™-RhE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

▼M8

Läpäisyn esto

18. Marraskeden ja sen lipidikoostumuksen on oltava riittävä estämään sytotoksisten vertailukemikaalien (esimerkiksi SDS:n tai Triton X-100:n) nopea läpäisy arvioituna IC_{50}:llä tai ET_{50}:llä (taulukko 3). RhE-mallin kehittäjän/myyjän on osoitettava RhE-mallin jokaisen erän läpäisynestokyky, kun se toimittaa kudokset loppukäyttäjälle (ks. 21 kohta).

Morfologia

19. RhE-mallin histologinen tutkimus on tehtävä osoittamalla, että mallissa on ihmisorvaskeden kaltainen monikerrosrakenne, joka koostuu tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksesta sekä marraskedestä ja että sen lipidikoostumus on samankaltainen kuin ihmisorvaskeden lipidikoostumus. RhE-mallin kehittäjän/myyjän on esitettävä RhE-mallin kunkin erän histologinen tutkimus, joka osoittaa, että kudosten morfologia on asianmukainen, kun kehittäjä/myyjä toimittaa kudokset loppukäyttäjälle (ks. 21 kohta).

Toistettavuus

20. Testimenetelmän käyttäjien on osoitettava testimenetelmien toistettavuus pidemmällä aikavälillä positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla. Lisäksi testimenetelmää saa käyttää vain, jos RhE-mallin kehittäjä/toimittaja on antanut tietoja, jotka osoittavat toistettavuuden pidemmällä aikavälillä esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden luettelon (taulukko 1) mukaisilla syövyttävillä ja syövyttämättömillä kemikaaleilla. Jos testimenetelmää käytetään alaluokkiin luokittelemiseen, toistettavuus on osoitettava myös sen osalta.

Laadunvalvonta

21. RhE-mallia saa käyttää vain, jos sen kehittäjä/toimittaja osoittaa, että kukin RhE-mallin erä täyttää määritellyt tuotantokriteerit, joiden joukosta *elinkykyisyyttä* (17 kohta), *läpäisyn estoa* (18 kohta) ja m*orfologiaa* (19 kohta) koskevat perusteet ovat tärkeimmät. Tätä koskevat tiedot on annettava testimenetelmän käyttäjille, jotta he voivat ilmoittaa tiedot testiraportissa. Ainoastaan laadunvalvonnassa hyväksytyillä kudoserillä saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi syövyttävyyden luokittelua varten. RhE-mallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä IC50- tai ET50-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo). Neljän validoidun testimallin hyväksyttävyysalueet esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

Laadunvalvonnan perusteet erän vapauttamiseksi tehtaalta myyntiin

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiSkin™ (SM) (18 tunnin käsittely SDS:llä) (33)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (34)	ET50 = 4,0 tuntia	ET50 = 8,7 tuntia
SkinEthic™-RhE (1 % Triton X-100) (35)	ET50 = 4,0 tuntia	ET50 = 10,0 tuntia
epiCS® (1 % Triton X-100) (36)	ET50 = 2,0 tuntia	ET50 = 7,0 tuntia

▼M8

Testi- ja kontrollikemikaalien annostelu

22. Jokaisesta testikemikaalista ja kontrolleista on käytettävä vähintään kahta rinnakkaista kudosnäytettä kullakin altistuskerralla. Sekä nestemäisiä että kiinteitä kemikaaleja käytettäessä orvaskeden pinnalle on annosteltava testikemikaalia tasaisesti riittävä määrä kuitenkin niin, ettei käytetä rajoittamatonta annosta. Kemikaalia on käytettävä vähintään 70 µl/cm^2 tai 30 µl/cm^2. Käytettävän mallin mukaan orvaskeden pinta on kostutettava deionisoidulla tai tislatulla vedellä ennen kiinteiden kemikaalien annostelua, jotta testikemikaalin ja orvaskeden pinnan välinen kosketus olisi parempi (34) (35) (36) (37). Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Annostelumenetelmän on sovelluttava testikemikaalille (katso esim. kirjallisuusviitteet 34–37). Altistusjakson jälkeen testikemikaali on huuhdeltava huolellisesti orvaskeden pinnalta sopivallavesipitoisella puskuriliuoksella tai 0,9-prosenttisella natriumkloridilla. Sen mukaan, mitä neljästä validoidusta RhE-testimallista käytetään, testikemikaalia kohti käytetään kaksi tai kolme altistusjaksoa (kaikki neljä validoitua RhE-mallia: 3 minuuttia ja 1 tunti; EpiSkin™-menetelmää käytettäessä 4 tunnin mittainen lisäaltistusaika). Sen mukaan, mitä RhE-testimallia käytetään ja millaista altistusjaksoa arvioidaan, altistumisen aikainen inkubointilämpötila saa vaihdella huoneenlämpötilan ja 37 °C:n välillä.

23. Kussakin käsittelyssä on käytettävä samanaikaisia negatiivisia ja positiivisia kontrolleja osoittamaan, että solujen elinkyky (negatiivisella kontrollilla), läpäisyn esto ja altistuksesta seuraava kudoksen herkistyminen (positiivisella kontrollilla) ovat pidemmän määritetyn aikaisemman hyväksyttävyysalueen mukaisia. Suositellut positiiviset kontrollikemikaalit ovat jääetikkahappo tai 8N KOH sen mukaan, millaista RhE-mallia käytetään. On kuitenkin syytä muistaa, että 8N KOH on suora MTT:n pelkistin, jonka käyttö voi edellyttää kontrollien mukauttamista 25 ja 26 kohdassa kuvatun mukaisesti. Suositellut negatiiviset kontrollit ovat 0,9-prosenttinen natriumkloridi tai vesi.

Solujen elinkykymittaukset

24. Tässä menetelmässä on käytettävä kvantitatiivista MTT-määritystä solujen elinkyvyn mittaamiseen (27). Kudosnäyte asetetaan kolmeksi tunniksi sopivan vahvuiseen MTT-liuokseen (esimerkiksi 0,3 tai 1 mg/ml). Saostunut sininen formatsaani uutetaan kudoksesta liuottimella (esimerkiksi isopropanoli tai hapan isopropanoli), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD-arvo 570 nm:ssä käyttäen enintään ± 30 nm:n kaistanpäästösuodatinta tai käyttämällä HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenetelmää (ks. 30 ja 31 kohta) (38).

25. Testikemikaalit voivat häiritä MTT-määritystä joko pelkistämällä MTT:n suoraan siniseksi formatsaaniksi ja/tai väri-interferenssillä, jos testikemikaali absorboi valoa luonnostaan tai käsittelymenettelyjen takia samalla optisella tiheydellä kuin formatsaani (570 ± 30 nm, pääasiassa siniset ja violetit kemikaalit). Esimerkiksi epäspesifin MTT-pelkistinkontrollin (NSMTT) ja epäspesifin värikontrollin (NSC) kaltaisia lisäkontrolleja on käytettävä, jotta näistä testikemikaaleista johtuva mahdollinen häiriö voidaan havaita ja korjata (ks. 26–30 kohta). Tämä on tärkeää etenkin silloin, jos tiettyä testikemikaalia ei saada kokonaan pois kudoksesta huuhtelussa tai jos se tunkeutuu orvaskeden läpi, jolloin sitä on kudoksissa, kun elinkykyisyystesti MTT:llä tehdään. MTT:n suoran pelkistyksen ja väriaineiden aiheuttamien häiriöiden korjaamismenettelyt selostetaan yksityiskohtaisesti testimalleja koskevissa vakiotoimintamenettelyissä (34) (35) (36) (37).

▼**M8**

26. Jotta suorat MTT-pelkistimet voidaan tunnistaa, kukin testikemikaali tulee lisätä tuoreeseen MTT-liuokseen (34) (35) (36) (37). Jos testikemikaalia sisältävä MTT-seos muuttuu siniseksi tai violetiksi, testikemikaalin oletetaan olevan suora MTT:n pelkistin, jolloin on tehtävä toiminnallinen tarkastus kuolleella orvaskedellä riippumatta siitä, käytetäänkö vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenettelyä. Tässä toiminnallisessa lisätarkastuksessa käytetään kuolleita kudoksia, joiden metabolinen toiminta on vähäistä mutta jotka absorboivat testikemikaalia yhtä paljon kuin elinkykyiset kudokset. Kutakin MTT:tä pelkistävää kemikaalia laitetaan jokaisella altistuskerralla vähintään kahdelle sellaiselle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko ihosyövyttävyystestin ajan. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: MTT:n pelkistimelle altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys vähennettynä samalle MTT:n pelkistimelle altistettujen kuolleiden kudosten epäspesifisen MTT-pelkistyksen prosenttiosuutena laskettuna suhteessa negatiiviseen kontrolliin, joka testattiin samanaikaisesti korjattavan testin kanssa (%NSMTT).

27. Jotta voidaan tunnistaa värillisten testikemikaalien tai niiden testikemikaalien, jotka värjäytyvät kosketuksessa veteen tai isopropanoliin, mahdollinen interferenssi ja päättää, tarvitaanko lisäkontrolleja, testikemikaalista on tehtävä spektrianalyysi vedessä (ympäristö altistuksen aikana) ja/tai isopropanolissa (uuttoliuos). Jos vedessä ja/tai isopropanolissa oleva testikemikaali absorboi valoa alueella 570 ± 30 nm, on käytettävä useampia väriainekontrolleja tai vaihtoehtoisesti on käytettävä HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenettelyä, jolloin näitä kontrolleja ei tarvita (ks. 30 ja 31 kohta). Vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä kutakin häiritsevää värillistä testikemikaalia laitetaan jokaisella altistuskerralla vähintään kahdelle elinkykyiselle rinnakkaiskudosnäytteelle, joita käytetään koko ihosyövyttävyystestin ajan mutta jotka inkuboidaan MTT-liuoksen sijasta väliaineessa MTT-inkubointivaiheen aikana, jotta saadaan aikaan epäspesifi värikontrolli (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrollion tehtävä samanaikaisesti värillisellä testikemikaalilla tehtävän testin kanssa kullakin altistuskerralla (jokaisessa testiajossa) elävien kudosten luontaisen biologisen vaihtelun vuoksi. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT-liuoksessa inkuboitujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys vähennettynä häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä väliaineessa inkuboitujen elävien kudosten epäspesifisen ja samanaikaisesti korjattavan testin kanssa testatun värikontrollin prosenttiosuudella ($\%NSC_{living}$).

28. Niille testikemikaaleille, joiden todetaan tuottavan sekä suoraa MTT:n pelkistystä (ks. 26 kohta) ja väri-interferenssiä (ks. 27 kohta), tarvitaan vielä kolmas kontrollisarja edellisissä kohdissa kuvattujen NSMTT- ja NSC_{living}-kontrollien lisäksi vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä. Näin on yleensä MTT-määritystä häiritsevien tummien kemikaalien (esimerkiksi sinisten, violettien, mustien) yhteydessä, koska niiden luontainen väri heikentää niiden kykyä pelkistää MTT:tä suoraan 26 kohdassa kuvatun mukaisesti. Nämä testikemikaalit voivat sitoutua sekä eläviin että kuolleisiin kudoksiin, minkä vuoksi NSMTT-kontrolli saattaa korjata paitsi testikemikaalin mahdollisesti aiheuttaman suoran MTT:n pelkistyksen myös väri-interferenssin, joka johtuu testikemikaalin sitoutumisesta kuolleisiin kudoksiin. Tämä taas voi johtaa väri-interferenssin kaksinkertaiseen korjaamiseen, koska NSC_{living}-kontrollilla korjataan jo testikemikaalin eläviin kudoksiin sitoutumisesta johtuva väri-interferenssi. Jotta vältetään väri-interferenssin mahdollinen kaksinkertainen korjaaminen, tarvitaan kolmas, epäspesifinen väri kuolleissa kudoksissa -kontrolli (NSCkilled). Tässä lisäkontrollissa testikemikaalia laitetaan kullakin altistuskerralla vähintään kahdelle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testin ajan mutta jotka

▼**M8**

inkuboidaan väliaineessa MTT-liuoksen sijasta MTT-inkubointivaiheessa. Yksi NSC_{killed}-kontrolli testikemikaalia kohti riittää tehtyjen itsenäisten testien/testiajojen määrästä riippumatta, mutta se on tehtävä samaan aikaan kuin NSMTT-kontrolli ja samalla kudoserällä, mikäli mahdollista. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: testikemikaalille altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys miinus %NSMTT miinus $\%NSC_{living}$ plus häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä väliaineessa inkuboitujen kuolleiden kudosten epäspesifinen väri laskettuna suhteessa korjattavan testin kanssa samanaikaisesti tehtyyn negatiiviseen kontrolliin ($\%NSC_{killed}$).

29. On tärkeää muistaa, että epäspesifinen MTT:n pelkistys ja epäspesifiset väri-interferenssit voivat lisätä kudosuutteiden lukemia spektrofotometrin lineaarista asteikkoa suuremmaksi. Tämän vuoksi jokaisen laboratorion on määritettävä spektrofotometrinsä lineaarinen asteikko kaupallisesta lähteestä saatavalla MTT-formatsaanilla (CAS-nro 57360-69-7) ennen sääntelytarkoituksiin liittyvien testikemikaalien testaamisen aloittamista. Varsinkin spektrofotometrillä tehtävä vakioabsorbanssimittaus (optinen tiheys) on asianmukainen suorien MTT:n pelkistimien ja väri-interferenssiä aiheuttavien testikemikaalien määrittämisessä, jos testikemikaalilla käsiteltyjen kudosuutteiden optiset tiheydet (ilman suoran MTT:n pelkistyksen ja/tai väri-interferenssin korjaamista) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon mukaiset tai jos testikemikaalilla saadun elinkykyisyyden korjaamattoman prosenttiosuuden perusteella tiedetään, että kemikaali on syövyttävä (ks. 35 ja 36 kohta). Sellaisia testikemikaaleja, joiden tuottamat %NSMTT- ja/tai $\%NSC_{living}$-arvot ovat negatiivisessa kontrollissa > 50 %, koskeviin tuloksiin on kuitenkin syytä suhtautua varauksellisesti.

30. Niiden värillisten testikemikaalien yhteydessä, jotka eivät sovellu vakioabsorbanssimittaukseen (optinen tiheys), koska ne häiritsevät MTT-määritystä liikaa, voidaan vaihtoehtoisesti käyttää HPLC-/UPLC-spektrofotometrimenettelyä MTT-formatsaanin mittaamiseen (ks. 31 kohta) (37). HPLC-/UPLC-spektrofotometrijärjestelmän avulla MTT-formatsaani voidaan erottaa testikemikaalista ennen sen kvantifiointia (38). Tästä syystä NSC_{liVing}- tai NSC_{killed}-kontrolleja ei tarvita koskaan HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa käytettäessä siitä riippumatta, mikä testattava kemikaali on. NSMTT-kontrolleja on kuitenkin käytettävä, jos testikemikaalin epäillään olevan suora MTT:n pelkistin tai jos sen väri vaikeuttaa sen arviointia, miten hyvin se pystyy pelkistämään MTT:tä suoraan (26 kohdassa kuvatun mukaan). Jos MTT-formatsaanin mittaamisessa käytetään HPLC-/UPLC-spektrofotometria, kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin huippualueen prosenttiosuutena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Niiden testikemikaalien osalta, jotka pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan, kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan tällä kaavalla: testikemikaalille altistetuista elävistäkudoksista saatu kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys miinus % NSMTT. On myös syytä muistuttaa siitä, että suoria MTT:n pelkistimiä, jotka voivat aiheuttaa myös väri-interferenssiä ja jotka pysyvät kudoksissa käsittelyn jälkeen ja pelkistävät MTT:tä niin voimakkaasti, että testattujen kudosuutteiden optiset tiheydet (vakiotiheysmittausta käyttäen) tai huippualueet (UPLC-/HPLC-spektrofotometria käyttäen) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon ulkopuolella, ei voida määrittää, vaikka tällaista oletetaan tapahtuvan vain hyvin harvoin.

▼M8

31. HPLC-/UPLC-spektrometriaa voidaan käyttää myös kaikentyyppisten testikemikaalien (värillisten, värittömien, MTT:n pelkistimien ja muiden kuin MTT:n pelkistimien) kanssa MTT-formatsaanin mittaamiseen (38). HPLC-/UPLC-spektrofotometrijärjestelmien moninaisuuden vuoksi näiden järjestelmien asianmukaisuus on osoitettava ennen kuin niitä käytetään kudosuutteiden MTT-formatsaanin kvantifioimisessa. Järjestelmien on täytettävä hyväksymiskriteerit tavanomaisten laatuparametrien osalta Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston bioanalyyttisten menetelmien validointia koskevissa ohjeissa kuvatun mukaisesti (38) (39). Nämä keskeiset parametrit ja niihin liittyvät hyväksymisperusteet esitetään lisäyksessä 4. Kun lisäyksessä 4 määritetyt hyväksymisperusteet täyttyvät, kyseistä HPLC-/UPLC-spektrometriajärjestelmää pidetään asianmukaisena ja sillä voidaan mitata MTT-formatsaania tässä testimenetelmässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

Hyväksymisperusteet

32. Jokaisessa testimenetelmässä, jossa käytetään valideja RhE-malleja, negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen kudosten optisen tiheyden on kuvastettava kudosten laatua taulukossa 2 kuvatun mukaisesti, eikä tämä arvo saa olla aikaisemmin määritettyjä raja-arvoja pienempi. Positiivisella kontrollilla, kuten jääetikkahapolla tai 8N KOH:lla, käsiteltyjen kudosten on kuvastettava kudosten kykyä reagoida syövyttävään kemikaaliin testimallin yhteydessä käytetyissä olosuhteissa (ks. lisäys 2). Testikemikaalilla ja/tai kontrollikemikaaleilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden vaihtelevuuden on oltava hyväksytyissä rajoissa kutakin validia RhE-mallia koskevien vaatimusten mukaisesti (ks. lisäys 2) (esimerkiksi kahden rinnakkaiskudosnäytteen välisen elinkykyisyyden erotus saa olla enintään 30 prosenttia). Jos joko testiajossa käytetyn negatiivisen kontrollin tai positiivisen kontrollin tulos on hyväksyttävän alueen ulkopuolella, testiajoa ei pidetä hyväksyttävänä ja se on toistettava. Jos testikemikaalien vaihtelua koskeva tulos on määritetyn alueen ulkopuolella, sen testaus on toistettava.

Tulosten tulkinta ja ennustemalli

33. Jokaisesta testikemikaalista saaduista OD-arvoista on laskettava solujen prosentuaalinen elinkykyisyys suhteessa negatiiviseen kontrolliin, jonka arvoksi on asetettu 100 prosenttia. HPLC-/UPLC-spektrofotometria käytettäessä kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin huippualueen prosenttiosuutena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Solujen prosentuaalisen elinkykyisyyden raja-arvot, joiden perusteella syövyttävät ja syövyttämättömät testikemikaalit erotellaan toisistaan (tai joiden perusteella erilaiset syövyttävien kemikaalien alaluokat erotellaan), määritetään jäljempänä 35 ja 36 kohdassa jokaisen tähän testimenetelmään kuuluvan testimallin osalta. Näitä raja-arvoja on käytettävä tulosten tulkinnassa.

34. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä vähintään kaksi rinnakkaiskudosnäytettä käsittävässä testiajossa. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset, voidaan harkita toista testiajoa ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testin tulokset poikkeavat toisistaan.

35. Taulukossa 4 kuvataan ihosyövyttävyyttä koskevassa EpiSkin™-testimallissa käytettävä ennustemalli (9) (34) (22), joka liittyy YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokitusjärjestelmään:

▼M8

Taulukko 4

EpiSkin™-ennustemalli

Elinkykyisyys mitattuna altistuksen tiettyjen aikapisteiden jälkeen (t=3, 60 ja 240 minuuttia)	Huomioon otettava ennuste
< 35 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	**Syövyttävä:** • Valinnainen alaluokka 1A (*)
< 35 % 3 minuutin altistuksen jälkeen **JA** < 35 % 60 minuutin altistuksen jälkeen **TAI** < 35 % 60 minuutin altistuksen jälkeen **JA** < 35 % 240 minuutin altistuksen jälkeen	**Syövyttävä:** • Valinnaisten alaluokkien 1B ja 1C yhdistelmä
≥ 35 % 240 minuutin altistuksen jälkeen	**Ei syövyttävä**

(*) RhE-testin käyttökelpoisuutta alaluokkiin luokittelemisen tukemisessa koskevasta arvioinnista saadut tiedot osoittivat, että noin 22 prosenttia alaluokkaan 1A kuuluvista EpiSkin™-testimallin tuloksista voivat olla alaluokan 1B tai 1C aineita/seoksia (ts. yliluokitukset) (ks. lisäys 3).

36. Taulukossa 5 esitetään ihosyövyttävyyttä koskevien EpiDerm™ SCT- (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE- (17) (18) (23) (36) ja epiCS® (16) (23) (37) -testimallien, jotka liittyvät YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokitusjärjestelmään, ennustemallit:

Taulukko 5

EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE ja epiCS®

Elinkykyisyys mitattuna altistuksen tiettyjen aikapisteiden jälkeen (t= 3 ja 60 minuuttia)	Huomioon otettava ennuste
VAIHE 1 EpiDerm™ SCT-, SkinEthic™ RHE- ja epiCS®-testimalleissa	
< 50 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	**Syövyttävä**
≥ 50 % 3 minuutin altistuksen jälkeen **JA** < 15 % 60 minuutin altistuksen jälkeen	**Syövyttävä**
≥ 50 % 3 minuutin altistuksen jälkeen **JA** ≥ 15 % 60 minuutin altistuksen jälkeen	**Ei syövyttävä**
VAIHE 2 EpiDerm™ SCT -testimallissa – vaiheessa 1 syövyttäviksi todetut aineet/seokset	
< 25 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnainen alaluokka 1A*
≥ 25 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnaisten alaluokkien 1B ja 1C yhdistelmä
VAIHE 2 SkinEthic™ RHE -testimallissa – vaiheessa 1 syövyttäviksi todetut aineet/seokset	
< 18 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnainen alaluokka 1A*

▼M8

Elinkykyisyys mitattuna altistuksen tiettyjen aikapisteiden jälkeen (t= 3 ja 60 minuuttia)	Huomioon otettava ennuste
VAIHE 1 EpiDerm™ SCT-, SkinEthic™ RHE- ja epiCS®-testimalleissa	
≥ 18 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnaisten alaluokkien 1B ja 1C yhdistelmä
VAIHE 2 epiCS®-testimallissa – vaiheessa 1 syövyttäviksi todetut aineet/seokset	
< 15 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnainen alaluokka 1A*
≥ 15 % 3 minuutin altistuksen jälkeen	Valinnaisten alaluokkien 1B ja 1C yhdistelmä

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

37. Kunkin testin osalta on esitettävä taulukkona yksittäisiä rinnakkaisia testinäytteitä koskevat tiedot (esimerkiksi kunkin testikemikaalin OD-arvot ja solujen prosentuaalista elinkykyä koskevat tiedot, myös luokittelu) ja tarvittaessa myös tiedot toistetuista kokeista. Lisäksi on esitettävä rinnakkaiskudosnäytteiden elinkykyisyyden keskiarvot ja vaihteluvälit sekä variaatiokertoimet kustakin testistä. Kunkin testikemikaalin osalta on esitettävä havaittu yhteisvaikutus MTT-reagenssin ja suorien MTT:n pelkistimien tai värillisten testikemikaalien kanssa.

Testiraportti

38. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrollikemikaalit:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— Monesta ainesosasta muodostuva aine, UVCB-aine ja seos: luonnehditaan mahdollisimman tarkoin kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrolliaineen käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Käytetty RhE-malli ja protokolla perusteluineen (tarvittaessa)

Testiolosuhteet:

— käytetty RhE-malli (ja eränumero)

▼**M8**

— mittalaitteen (esimerkiksi spektrometrin) kalibrointitiedot, MTT-formatsaanin kvantifioimisessa käytetty aallonpituus ja kaistanpäästö (tarvittaessa) sekä mittalaitteen lineaarisuusasteikko

— MTT-formatsaanin kvantifioimisessa käytetyn menetelmän kuvaus

— HPLC-/UPLC-spektrometrijärjestelmän asianmukaisuuden kuvaus tarvittaessa

— täydelliset RhE-mallin käyttöä tukevat tiedot, myös mallin suoritusarvot. Näitä voivat olla esimerkiksi

  i) elinkykyisyys

  ii) läpäisyn esto

  iii) morfologia

  iv) toistettavuus ja ennustamiskyky

  v) mallin laatukontrollit

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla esimerkiksi laatukontrollitietojen hyväksyttävyys verrattuna aikaisempia eriä koskeviin tietoihin.

— pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla tehtyyn testaukseen perustuva osoitus pätevyydestä tämän testimenetelmän osalta ennen rutiininomaisen käytön aloittamista.

Testimenettely:

— tiedot käytetystä testimenettelystä (myös altistusjakson jälkeen käytetyistä pesumenettelyistä)

— testikemikaalin ja käytettyjen kontrollikemikaalien annokset

— altistusjakson (-jaksojen) kesto ja altistuslämpötila(t)

— tiedot kontrolleista, joita on käytetty suorille MTT:n pelkistimille ja/tai värjääville testikemikaaleille (tarvittaessa)

— testikemikaalia ja kontrolleja kohti käytettyjen rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä (positiivinen kontrolli, negatiivinen kontrolli, NSMTT, NSCliving ja NSCkilled, tarvittaessa) altistuskertaa kohti

— kuvaus sovelletuista päätöksentekoperusteista / käytetystä ennustemallista käytetyn RhE-mallin perusteella

— kuvaus testimenettelyjen (ja pesumenettelyjen) mahdollisista muutoksista.

Testiajo ja testin hyväksymisperusteet:

— positiivisten ja negatiivisten kontrollien keskiarvot ja hyväksymisalue aikaisempien tietojen perusteella

— rinnakkaiskudosnäytteiden hyväksyttävä vaihtelu positiivisten ja negatiivisten kontrollien osalta

▼M8

— rinnakkaiskudosnäytteiden hyväksyttävä vaihtelu testikemikaalin osalta.

Tulokset:

— Taulukkomuotoiset tiedot yksittäisistä testikemikaaleista ja kontrolleista jokaiselta altistusjaksolta, jokaisesta testiajosta ja jokaisesta rinnakkaismittauksesta sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys, kudosten keskimääräinen prosentuaalinen elinkykyisyys, rinnakkaisnäytteiden väliset erot, keskihajonnat ja/tai variaatiokertoimet tarvittaessa.

— Tarvittaessa tulokset kontrolleista, joita käytettiin suorien MTT:n pelkistimien ja/tai värjäävien testikemikaalien yhteydessä, sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, rinnakkaisnäytteiden väliset erot, keskihajonnat ja/tai variaatiokertoimet (tarvittaessa) ja lopullinen oikea kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys

— Testikemikaalista (-kemikaaleista) ja kontrollikemikaaleista saadut tulokset tietyssä testiajossa ja testin hyväksymisperusteisiin nähden.

— Kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

— Tulosten perusteella tehty luokitus ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekoperusteista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) YK (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) Tämän liitteen luku B.4, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(3) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* -ihosyövyttävyys.

(4) Tämän liitteen luku B.65, *In vitro* -kalvoestetestimenetelmä.

(5) Tämän liitteen luku B.46, *In vitro* -ihoärsyttävyys: rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä.

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219–255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxic. In Vitro* 12, 471–482.

▼**M8**

(9) 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 SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol. in Vitro 12:483–524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371–401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129–147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA

(14) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19: 925–929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20: 547–559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 cm^2 Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379–1385.

(19) EC-ECVAM (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

▼**M8**

(21) OECD (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131–145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055–2080.

(24) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(25) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393–403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55–63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro.* Teoksessa: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133–140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889–891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211–225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310–319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163–171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747–756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1 000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741–761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Saatavana osoitteessa [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼M8

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (25).

Solujen elinkykyisyys: Parametri, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta, esimerkiksi solujen mitokondrioiden dehydrogenaasien kykyä pelkistää väriaine MTT (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi eli tiatsolyylisininen), joka korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn mitatun päätetapahtuman ja testimenetelmän mukaan.

Kemikaali: Aine tai seos.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimenetelmille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään joskus toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi. Vastaavuuteen vaikuttaa suuresti positiivisten esiintyminen tutkittavien testikemikaalien tyypeissä (25).

ET_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan, jotta solujen elinkyky vähenee 50 prosenttia annosteltaessa vertailukemikaalia tiettynä määrättynä pitoisuutena; katso myös IC_{50}.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

HPLC: Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment, testauksen ja arvioinnin yhdennetyt lähestymistavat.

IC_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä pitoisuus, jossa vertailukemikaali vähentää solujen elinkykyä 50 prosentilla (IC50) sovitun altistusajan jälkeen; katso myös ET_{50}.

Rajoittamaton annos: Orvasketeen applikoidun testikemikaalin määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan orvaskeden pinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

Seos: Seos tai liuos, joka muodostuu kahdesta tai useammasta keskenään reagoimattomasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

▼**M8**

MTT: 3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi; tiatsolyylisininen tetrasoliumbromidi.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

ES: Ei syövyttävä.

NSC_{killed}-kontrolli: Epäspesifi värikontrolli kuolleissa kudoksissa.

NSC_{living}-kontrolli: Epäspesifi värikontrolli elävissä kudoksissa.

NSMTT: Epäspesifi MTT:n pelkistys.

OD: Optinen tiheys

PK: Positiivinen kontrolli, näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Tähän sisältyvät: i) testimenetelmän oleelliset osat, ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat luotettavuuden ja tarkkuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (25).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (25).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (25).

Testiajo: Testiajo koostuu yhden tai useamman testikemikaalin testaamisesta samanaikaista negatiivista ja positiivista kontrollia käyttäen.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmällä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (25).

▼**M8**

Ihosyövyttävyys *in vivo*: Korjautumattoman ihovaurion eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet, 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden yhteydessä on harkittava histopatologista tutkimusta.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmässä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (25).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UPLC: Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

▼M8

Lisäys 2

IHOSYÖVYTTÄVYYDEN TESTAUKSEEN VALIDOITUJEN RHE-MALLIEN PÄÄOSAT

Testimallin osat	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Mallin pinta-ala	0,3 cm^2	0,63 cm^2	0,5 cm^2	0,6 cm^2
Rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä	Vähintään 2 altistuskertaa kohti	2 tai 3 altistuskertaa kohti	Vähintään 2 altistuskertaa kohti	Vähintään 2 altistuskertaa kohti
Altistusannokset ja niiden applikointi	Nestemäiset ja viskoosit aineet: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm^2) Kiinteät aineet: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm^2) + 100 µl ± 5µl NaCl-liuosta (9 g/l) Vahamaiset/tahmeat aineet: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm^2), nailonverkkosuodatin	Nestemäiset aineet: 50 µl (79,4 µl/cm^2) nailonverkkosuodattimen kanssa tai ilman sitä *Testikemikaalin ja nailonverkkosuodattimen yhteensopivuus ennen testiä* Puolikiinteät aineet: 50 µl (79,4 µl/cm^2) Kiinteät aineet: 25 µl H_2O (tai tarvittaessa enemmän) + 25 mg (39,7 mg/cm^2) Vahamaiset aineet: Litteä ”levymäinen”, halkaisijaltaan n. 8 mm:n pala laitetaan 15 µl:llä vettä kostutetun kudoksen päälle.	Nestemäiset ja viskoosit aineet: 40 µl ± 3µl (80 µl/cm^2), nailonverkkosuodatin *Testikemikaalin ja nailonverkkosuodattimen yhteensopivuus ennen testiä* Kiinteät aineet: 20 µl ± 2µl H_2O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2) Vahamaiset/tahmeat aineet: 20 ± 3 mg (40 mg/cm^2), nailonverkkosuodatin	Nestemäiset aineet: 50 µl (83,3 µl/cm^2), nailonverkkosuodatin *Testikemikaalin ja nailonverkkosuodattimen yhteensopivuus ennen testiä* Puolikiinteät aineet: 50 µl (83,3 µl/cm^2) Kiinteät aineet: 25 mg (41,7 mg/cm^2) + 25 µl H_2O (tarvittaessa enemmän) Vahamaiset aineet: Litteä ”keksimäinen”, halkaisijaltaan n. 8 mm:n pala laitetaan 15 µl:llä vettä kostutetun kudoksen päälle
Suoraa MTT:n pelkistystä koskeva esitesti	50 µl (nestemäinen aine) tai 20 mg (kiinteä aine)+ 2 ml MTT:tä 0,3 mg/ml liuosta, 180 ± 5 min 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit veteen säilötyillä kuolleilla kudoksilla.	50 µl (nestemäinen aine) tai 25 mg (kiinteä aine)+ 1 ml MTT:tä 1 mg/ml liuosta 60 minuutin ajan 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit pakastetuilla kuolleilla kudoksilla.	40 µl (nestemäinen aine) tai 20 mg (kiinteä aine)+ 1 ml MTT:tä 1 mg/ml liuosta 180± 15 min., 37 °C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit pakastetuilla kuolleilla kudoksilla.	50 µl (nestemäinen aine) tai 25 mg (kiinteä aine)+ 1 ml MTT:tä 1 mg/ml liuosta 60 minuutin ajan 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit pakastetuilla kuolleilla kudoksilla.

▼M8

Testimallin osat	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Väri-interferenssin esitesti	10 µl (nestemäinen aine) tai 10 mg (kiinteä aine) + 90 µl H_2O sekoitetaan, 15 min huoneenlämpötilassa → Jos liuos värjäytyy, on tehtävä mukautetut kontrollit elävillä kudoksilla.	50 µl (nestemäinen aine) tai 25 mg (kiinteä aine) + 300 µl H_2O 60 min, 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos värjäytyy, on tehtävä mukautetut kontrollit elävillä kudoksilla.	40 µl (nestemäinen aine) tai 20 mg (kiinteä aine) + 300 µl H_2O sekoitetaan, 60 min huoneenlämpötilassa → Jos testikemikaali värjäytyy, on tehtävä mukautetut kontrollit elävillä kudoksilla.	50 µl (nestemäinen aine) tai 25 mg (kiinteä aine) + 300 µl H_2O 60 min, 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH → Jos liuos värjäytyy, on tehtävä mukautetut kontrollit elävillä kudoksilla.
Altistus-aika ja lämpötila	3 min, 60 min (± 5 min) ja 240 min (± 10 min) Vetokaapissa Huoneenlämpötila (HLT, 18–28°C)	3 min HLT:ssä ja 60 min 37°C:ssa, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min HLT:ssä ja 60 min 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	3 min HLT:ssä ja 60 min 37°C:ssa, 5 % CO_2, 95 % RH
Huuhtelu	25 ml 1x fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS) (2 ml/kpl)	20 kertaa jatkuvalla pehmeällä suihkulla 1x PBS:ää	20 kertaa jatkuvalla pehmeällä suihkulla 1x PBS:ää	20 kertaa jatkuvalla pehmeällä suihkulla 1x PBS:ää
Negatiivinen kontrolli	50 µl NaCl-liuosta (9 g/l) Testataan jokaisella altistuskerralla	50 µl H_2O:ta Testataan jokaisella altistuskerralla	40 µl H_2O:ta Testataan jokaisella altistuskerralla	50 µl H_2O:ta Testataan jokaisella altistuskerralla
Positiivinen kontrolli	50 µl jääetikkahappoa Testataan vain 4 tunnin ajan	50 µl 8N KOH:ta Testataan jokaisella altistuskerralla	40 µl 8N KOH:ta Testataan vain 1 tunnin ajan	50 µl 8N KOH:ta Testataan jokaisella altistuskerralla
MTT-liuos	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT:n inkubointi aika ja lämpötila	180 min (± 15 min), 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min, 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min (± 15 min), 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH	180 min, 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH

▼M8

Testimallin osat	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Uuttoliuos	500 µl happamoitettua isopropanolia (0,04 N HCl isopropanolissa) (eristetty kudos kokonaan upoksissa)	2 ml isopropanolia (uutto insertin ylä- ja alapäästä)	1,5 ml isopropanolia (uutto insertin ylä- ja alapäästä)	2 ml isopropanolia (uutto insertin ylä- ja alapäästä)
Uuttoaika ja lämpötila	Yön yli HLT:ssä, valolta suojattuna	Yön yli ravistamatta HLT:ssä tai 120 min ravistamalla (~120 rpm) HLT:ssä	Yön yli ravistamatta HLT:ssä tai 120 min ravistamalla (~120 rpm) HLT:ssä	Yön yli ravistamatta HLT:ssä tai 120 min ravistamalla (~120 rpm) HLT:ssä
OD-lukemat	570 nm (545–595 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (tai 540 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (540–600 nm) ilman vertailusuodatinta	540–570 nm ilman vertailusuodatinta
Kudoksen laadunvalvonta	18 tunnin käsittely SDS:llä 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,0 mg/ml	Käsittely 1-prosenttisella Triton X-100:lla 4,08 h ≤ ET_{50} ≤ 8,7 h	Käsittely 1-prosenttisella Triton X-100:lla 4,0 h ≤ ET_{50} ≤ 10,0 h	Käsittely 1-prosenttisella Triton X-100:lla 2,0 h ≤ ET_{50} ≤ 7,0 h
Hyväksymisperusteet	1. Negatiivisella kontrollilla (NaCl) käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden OD-lukeman keskiarvon on oltava ≥ 0,6 ja ≤ 1,5 jokaisella altistuskerralla. 2. Positiiviselle kontrollille (jääetikkahappo) neljän tunnin ajaksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkykyisyyden, joka ilmaistaan prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista, on oltava ≤ 20 %. 3. Kun elinkykyisyysalue on 20–100 % ja kun OD-arvot ovat ≥ 0,3, kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkykyisyyden välinen ero saa olla enintään 30 %.	1. Negatiivisella kontrollilla (H_2O) käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden OD-lukeman keskiarvon on oltava ≥ 0,8 ja ≤ 2,8 jokaisella altistuskerralla. 2. Positiiviselle kontrollille (8N KOH) yhden tunnin ajaksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkykyisyyden, joka ilmaistaan prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista, on oltava < 15 %. 3. Kun elinkykyisyysalue on 20–100 prosenttia, rinnakkaiskudosnäytteiden välisen variaatiokertoimen on oltava ≤ 30 %	1. Negatiivisella kontrollilla (H_2O) käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden OD-lukeman keskiarvon on oltava ≥ 0,8 ja ≤ 3,0 jokaisella altistuskerralla. 2. Positiiviselle kontrollille (8N KOH) yhden tunnin (tai tarvittaessa 4 tunnin) ajaksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkykyisyyden, joka ilmaistaan prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista, on oltava < 15 %. 3. Kun elinkykyisyysalue on 20–100 % ja kun OD-arvot ovat ≥ 0,3, kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkykyisyyden välinen ero saa olla enintään 30 %.	1. Negatiivisella kontrollilla (H_2O) käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden OD-lukeman keskiarvon on oltava ≥ 0,8 ja ≤ 2,8 jokaisella altistuskerralla. 2. Positiiviselle kontrollille (8N KOH) yhden tunnin ajaksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkykyisyyden, joka ilmaistaan prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista, on oltava < 20 %. 3. Kun elinkykyisyysalue on 20–100 % ja kun OD-arvot ovat ≥ 0,3, kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkykyisyyden välinen ero saa olla enintään 30 %.

▼**M8**

Lisäys 3

TESTIMALLIEN SUORITUSKYKY ALALUOKKIIN LUOKITTELEMISESSA

Jäljempänä olevassa taulukossa esitetään neljän testimallin suorituskyvyt, jotka on laskettu neljän testin kehittäjien testaaman 80 kemikaalin sarjan perusteella. Laskelmat laati OECD:n sihteeristö, ja asiantuntijaryhmä tarkasti ja hyväksyi ne (21) (23).

EpiSkin™-, EpiDerm™-, SkinEthic™- ja epiCS®-testimalleilla voidaan luokitella kemikaaleja myös alaluokkiin (ts. 1A vs. 1B ja 1C vs. syövyttämättömät aineet).

Neljän testimallin suorituskyvyt, yliluokitus- ja aliluokitusasteet ja tarkkuus (ennustuskyky) perustuvat 80 kemikaalin sarjaan. Kaikki nämä kemikaalit testattiin kahdella tai kolmella testiajolla jokaisen testimallin osalta:

TILASTOT KOKO KEMIKAALISARJASTA SAADUISTA ENNUSTEISTA

(n = 80 kemikaalia, jotka testattiin epiCS®-mallin osalta kahdella riippumattomalla testiajolla tai EpiDerm™ SCT-, EpiSkin™- ja SkinEthic™ RHE -testimallien osalta kolmella riippumattomalla testiajolla; luokituksia on siis joko 159 (*) tai 240)

	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®
Yliluokitukset:				
1B ja 1C, yliluokitus 1A	21,50 %	29,0 %	31,2 %	32,8 %
ES, yliluokitus 1B ja IC	20,7 %	23,4 %	27,0 %	28,4 %
ES, yliluokitus 1A	0,00 %	2,7 %	0,0 %	0,00 %
Yliluokitus korj.	20,7 %	26,1 %	27,0 %	28,4 %
Yliluokituksen kokonaisaste (kaikki luokat)	**17,9 %**	**23,3 %**	**24,5 %**	**25,8 %**
Aliluokitukset:				
1A, aliluokitus 1B ja IC	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5 %
1A, aliluokitus ES	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
1B ja 1C, aliluokitus ES	2,2 %	0,00 %	7,5 %	6,6 %
Aliluokituksen kokonaisaste (kaikki luokat)	**3,3 %**	**2,5 %**	**5,4 %**	**4,4 %**
Oikeat luokitukset:				
Oikein luokiteltu 1A:han	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5 %
Oikein luokiteltu 1B:hen ja 1C:hen	76,3 %	71,0 %	61,3 %	60,7 %
Oikein luokiteltu ES:ksi	79,3 %	73,9 %	73,0 %	71,62 %
Yleinen tarkkuus	**78,8 %**	**74,2 %**	**70 %**	**69,8 %**

ES: Ei syövyttävä

(*) Yksi kemikaali testattiin saatavuusongelmien vuoksi vain kerran EpiCS®-mallilla (23).

▼**M8**

Lisäys 4

Keskeiset parametrit ja hyväksymisperusteet, joiden mukaan HPLC-/UPLC-spektrometriajärjestelmä voidaan hyväksyä RhE-kudoksesta uutetun MTT-formatsaanin mittaamiseen

Parametri	Protokolla peräisin FDA:n ohjeista (37) (38)	Hyväksymisperusteet
Valikoivuus	Analyysi: isopropanoli, eläviä soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute elävistä RhE-kudoksista ilman käsittelyä), kuolleita soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute kuolleista RhE-kudoksista ilman käsittelyä)	$Alue_{interferenssi} \leq 20\ \%\ Alue_{LLOQ}$ ([1]):sta
Täsmäävyys	Laatukontrollit (esim. MTT-formatsaani pitoisuuksina 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanolilla (n=5)	CV ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Tarkkuus	Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	%Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Matriisivaikutus	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=5)	85 % ≤ matriisivaikutus % ≤ 115 %
Kulkeutuminen	Isopropanolin analysointi ULOQ ([2])-standardin mukaan	$Alue_{interferenssi} \leq 20\ \%Alue_{LLOQ}$:sta
Toistettavuus (päivänsisäinen)	3 riippumatonta kalibrointikäyrää (perustuen 6 peräkkäiselle 1/3-laimennokselle MTT-formatsaanista isopropanolissa ULOQ-arvosta alkaen, ts. 200 µg/ml); Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	Kalibrointikäyrät: %Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta Laatukontrollit: %Dev ≤ 15 % ja CV ≤ 15 %
Toistettavuus (päivänsisäinen)	Päivä 1: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 2: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 3: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3)	
MTT-formatsaanin lyhytaikainen stabiilius RhE-kudosuutteessa	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja 24 tunnin kuluttua huoneenlämpötilassa säilytyksestä	%Dev ≤ 15 %
MTT-formatsaanin pitkäaikainen stabiilius RhE-kudosuutteessa (tarvittaessa)	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja muutaman päivän kuluttua tietyssä lämpötilassa (esimerkiksi 4 °C, -20 °C, -80 °C) säilytyksestä	%Dev ≤ 15 %

([1]) LLOQ: Alempi määritysraja, määritetty kattamaan kudoksen elinkykyisyys, kun se on 1–2 prosenttia, esim. 0,8 µg/ml.
([2]) ULOQ: Ylempi määritysraja, määritetty olemaan vähintään kaksi kertaa suurempi kuin suurin odotettu MTT-formatsaanipitoisuus negatiivisten kontrollien isopropanoliuutteissa, esim. 200 µg/ml.

▼B

B.41. ***IN VITRO* 3T3 NRU -VALOMYRKYLLISYYSTESTI**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 432 (2004).

1.1 JOHDANTO

Valomyrkyllisyys on kehon toksinen vaste, joka ilmenee tai kasvaa (todettavissa pienemmillä annoksilla), kun keholle on aplikoitu kyseistä ainetta ja iho on altistettu valolle, tai jonka aiheuttaa ihon säteilytys sen jälkeen, kun ainetta on annettu elimistöön.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestiä käytetään tunnistamaan testiaineen valomyrkyllisyyspotentiaali sen jälkeen, kun valo on eksitoinut sen valolle altistuksen jälkeen. Testillä arvioidaan fotosytotoksisuus kemikaalille altistuneiden solujen elävyyden vähenemisenä valoaltistuksessa verrattuna tilanteeseen, jossa ei ole valoaltistusta. Tällä testillä tunnistetut aineet ovat todennäköisesti valomyrkyllisiä *in vivo* elimistöön annettuna ja ihoon jakautuneina tai aplikoituina iholle paikallisesti.

Useantyyppisten kemikaalien on ilmoitettu olevan valomyrkyllisiä (1) (2) (3) (4). Niiden yhteinen ominaisuus on kyky absorboida energiaa auringonvalon spektrialueella. Valokemian ensimmäisen lain (Grotthaus-Draperin lain) mukaan valoreaktio edellyttää riittävää valokvanttien absorptiota. Tämä merkitsee sitä, että ennen kuin harkitaan biologista testausta, testikemikaalin absorptiospektri UV-valon ja näkyvän valon alueella on määritettävä OECD:n testiohjeen 101 mukaisesti. On esitetty, että jos kemikaalin mooliekstinktio- tai absorptiokerroin on pienempi kuin 10 litraa × mol-1 × cm-1, kemikaalilla ei todennäköisesti ole valoreaktiokykyä eikä sitä todennäköisesti tarvitse testata *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestillä tai millään muulla haitallisia valokemiallisia vaikutuksia määrittävällä biologisella testillä (1) (5). Katso myös liite 1.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin luotettavuus ja relevanssi on arvioitu hiljattain (6) (7) (8) (9). *In vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin osoitettiin kykenevän ennustamaan akuutteja valomyrkyllisyysvaikutuksia eläimissä ja ihmisissä *in vivo*. Testin tarkoituksena ei ole ennustaa muita kemikaalien ja valon yhteisvaikutuksesta aiheutuvia haitallisia vaikutuksia, esim. fotogenotoksisuutta, valoallergiaa ja fotokarsinogeenisuutta. Testi ei pysty myöskään arvioimaan aineen valomyrkyllisyyspotenssia kvantitatiivisesti. Sen tarkoituksena ei myöskään ole arvioida valomyrkyllisyyden epäsuoria mekamismeja, testiaineen metaboliittien vaikutuksia tai sekoitusten vaikutuksia.

Vaikka metaboloivia järjestelmiä yleensä tarvitaan kaikissa *in vitro* -testeissä, joilla ennustetaan genotoksisuutta ja karsinogeenisuutta, tunnetaan toistaiseksi vain harvoja kemikaaleja, jotka edellyttäisivät metabolista aktivaatiota, jotta ne voisivat olla valomyrkyllisiä *in vivo* tai *in vitro*. Siten ei katsota olevan tarpeellista eikä tieteellisesti perusteltua suorittaa tätä testiä metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Säteilyvoimakkuus: pintaan kohdistuvan ultraviolettivalon (UV) tai näkyvän valon (VIS) intensiteetti mitattuna watteina neliömetriä kohti tai watteina neliösenttimetriä kohti (W/m^2 tai mW/cm^2).

Valoannos: pintaan kohdistuvan ultraviolettisäteilyn (UV) tai näkyvän valon säteilyn määrä (= intensiteetti × aika) ilmaistuna jouleina (= W × s) pinta-alayksikköä kohti, esim. J/m^2 tai J/cm^2.

UV-valon aallonpituusalueet: Kansainvälisen valaistustoimikunnan (ICI) suosittelemat määritelmät ovat: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ja UVC (100–280 nm). Muitakin määritelmiä käytetään: UVB- ja UVA-alueen raja asetetaan usein 320 nanometriin ja UVA-alue voidaan jakaa alueisiin UV-A1 ja UV-A2, jolloin raja on noin 340 nanometrissä.

Solujen elävyys: muuttuja, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta (esim. neutraalipunan ottoa solujen lysosomeihin), joka mittaussuureesta ja testimenetelmästä riippuen korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

Suhteellinen solujen elävyys: solujen elävyys ilmaistuna suhteessa liuotinkontrolleihin (negatiivisiin kontrolleihin), jotka käyvät läpi testin muuten (joko +Irr tai -Irr), mutta joita ei ole käsitelty testikemikaalilla.

PIF (valoärsyttävyystekijä): tekijä, joka muodostetaan vertaamalla testikemikaalin kahta yhtä tehokasta solumyrkyllisyyspitoisuutta (IC50) sen jälkeen, kun soluja säteilytetään UVA-/näkyvällä valolla (+Irr), joka ei ole solumyrkyllistä, ja kun soluja ei säteilytetä (-Irr).

$\mathbf{IC_{50}}$: testikemikaalin pitoisuus, jossa solujen elävyys on vähentynyt 50 %

MPE (keskimääräinen valovaikutus): suure, joka saadaan analysoimalla matemaattisesti pitoisuus-vastekuvaajat, jotka on saatu, kun soluja säteilytetään UVA-/näkyvällä valolla (+Irr), joka ei ole solumyrkyllistä, ja kun soluja ei säteilytetä (-Irr).

Valomyrkyllisyys: akuutti toksinen vaste, joka ilmenee sen jälkeen, kun iho on ensimmäisen kerran altistettu tietyille kemikaaleille ja sen jälkeen valolle, tai jonka ihon säteilytys aiheuttaa samalla tavalla sen jälkeen, kun kemikaalia on annettu elimistöön.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystesti perustuu kemikaalin solumyrkyllisyyden vertaamiseen, kun kemikaalia testataan altistettaessa kohdetta sellaiselle simuloidulle auringonvalolle, joka ei ole solumyrkyllinen, ja ilman tällaista valoaltistusta. Solumyrkyllisyys ilmaistaan tässä testissä pitoisuudesta riippuvana neutraalipunan (vitaaliväri) soluunoton vähenemisenä 24 tuntia kemikaalikäsittelyn ja säteilytyksen jälkeen (10). Neutraalipuna on heikosti kationinen väriaine, joka läpäisee solukalvot muulla tavalla kuin diffundoitumalla ja keräytyy solunsisäisiin lysosomeihin. Lysosomien herkän kalvon pinnan muutokset johtavat lysosomien haurastumiseen ja muihin muutoksiin, joista tulee vähitellen peruuttamattomia. Tällaiset vierasaineiden toiminnan aikaansaamat muutokset johtavat neutraalipunan oton ja sitoutumisen vähenemiseen. Tämän perusteella on mahdollista erotella elinkykyiset, vaurioituneet ja kuolleet solut, mikä on perustana tälle testille.

▼B

Balb/c 3T3 -soluja viljellään 24 tuntia yhden solun vahvuisen kerroksen aikaansaamiseksi. Kutakin testikemikaalia kohti inkuboidaan aluksi yhden tunnin ajan kahta 96 kuopan levyä, joissa on kahdeksaa eri pitoisuutta testattavaa kemikaalia Sen jälkeen toinen levyistä altistetaan suurimmalle ei-solumyrkylliselle säteilytysannokselle ja toinen levy pidetään pimeässä. Sitten kummankin levyn käsittelyneste korvataan viljelynesteellä, inkuboidaan toiset 24 tuntia, ja määritetään solujen elävyys neutraalipunan ottona. Solujen elävyys, joka ilmaistaan prosenttiosuutena käsittelemättömistä liuotinkontrolleista, lasketaan kullekin testipitoisuudelle. Valomyrkyllisyyskyvyn ennustamiseksi verrataan pitoisuusvasteita, jotka on saatu säteilytyksen kanssa ja ilman sitä, yleensä IC_{50}-tasolla, ts. siinä pitoisuudessa, joka vähentää solujen elävyyttä 50 prosentilla verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin.

1.4 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelut**

1.4.1.1 *Solut*

Validointitutkimuksessa käytettiin joko ATCC:stä (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) tai ECACC:stä (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK) hankittua pysyvää hiiren fibroblastisolulinjaa Balb/c 3T3, kloonia 31, ja siksi sen hankkimista suositellaan (laadukkaasta solupankista). Muita soluja tai solulinjoja voidaan käyttää, kun testimenettely on sama, jos viljelyolosuhteet mukautetaan solujen erityistarpeisiin. Samanlaisuus on tällöin osoitettava.

Mykoplasmakontaminaatio on tutkittava säännöllisesti, ja soluja saa käyttää vain jos mykoplasmakontaminaatiota ei todeta (11).

On tärkeää, että solujen UV-herkkyys tarkistetaan säännöllisesti tässä menetelmässä selostetun laadunvalvontamenettelyn mukaisesti. Koska solujen UVA-herkkyys voi lisääntyä siirrostamisten myötä, pitäisi käyttää sellaisia Balb/c 3T3 -soluja, joita on siirrostettu mahdollisimman harvoja kertoja, mieluiten alle 100 kertaa. (Katso kohta 1.4.2.2.2 ja liite 2).

1.4.1.2 *Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet*

Sopivaa viljelynestettä ja inkubaatio-olosuhteita olisi käytettävä solujen tavanomaiseen siirrostamiseen ja testin aikana. Esimerkiksi Balb/c 3T3 -soluille käytetään DMEM:iä (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), jossa on 10 % vastasyntyneen vasikan seerumia, 4 mM glutamiinia, penisilliiniä (100 IU) ja streptomysiiniä (100 µg/mL), ja soluja inkuboidaan kaapissa, jonka lämpötila on 37 °C ja CO2-pitoisuus 5–7,5 % riippuen puskurista (katso kohdan 1.4.1.4 toinen alakohta). On erityisen tärkeää, että viljelyolosuhteet ovat sellaiset, että solusykli pysyy samanlaisena kuin se käytetyillä soluilla tai solulinjalla on aiemminkin ollut.

1.4.1.3 *Viljelmien valmistelu*

Pakastetuista varastoviljelmistä otettuja soluja inokuloidaan viljelynesteeseen sopivassa tiheydessä, ja niitä siirrostetaan vähintään kerran ennen kuin ne käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä.

▼B

Valomyrkyllisyystestiä varten soluja inokuloidaan viljelynesteeseen sellaisessa tiheydessä, että viljelmät eivät ole konfluentteja testin päättyessä 48 tunnin kuluttua solujen inokuloinnista, kun solujen elävyys määritetään. Balb/c 3T3 -soluille, joita viljellään 96-kuoppalevyillä, suositellaan solutiheyttä 1×10^4 solua kuoppaa kohti.

Kutakin testikemikaalia varten soluja inokuloidaan täysin samalla tavalla kahdelle erilliselle 96-kuoppalevylle, jotka käyvät läpi samanaikaisesti koko testiohjelman täysin samanlaisissa olosuhteissa, lukuun ottamatta aikaa, jolloin yhtä kuoppalevyä säteilytetään (+Irr) ja toinen pidetään pimeässä (-Irr).

1.4.1.4 *Testiaineen valmistaminen*

Testikemikaalit on valmistettava välittömästi ennen käyttöä, ellei tiedoista ilmene, että ne pysyvät stabiileina varastoitaessa. Kaikki kemikaalien käsittely ja valmistelu suositellaan tehtäväksi sellaisissa valo-olosuhteissa, että vältetään testettavan aineen valoaktivaatio tai hajoaminen ennen säteilytystä.

Testikemikaali pitäisi liuottaa puskuroituun suolaliuokseen, esim. Earlin tasapainotettuun suolaliuokseen (EBSS) tai muihin fysiologisesti tasapainoisiin puskuriliuoksiin, joissa ei saa olla proteiineja tai valoa absorboivia aineita (esim. pH-indikaattorivärejä ja vitamiineja), etteivät ne häiritsisi reaktioita säteilytyksen aikana. Koska soluja pidetään säteilytyksen aikana noin 50 minuuttia CO_2-inkubaattorin ulkopuolella, on vältettävä huolellisesti alkalisaatio. Käytettäessä laimeita puskureita, kuten EBSS:ää, tähän päästään inkuboimalla soluja siten, että CO_2 -pitoisuus on 7,5 %. Jos solut inkuboidaan ainoastaan 5 prosentin CO_2 -pitoisuudella, olisi valittava voimakkaampi puskuri.

Huonosti vesiliukoiset testikemikaalit pitäisi liuottaa sopivaan liuottimeen. Jos käytetään liuotinta, sitä on oltava vakiotilavuudessa kaikissa viljelmissä, ts. negatiivisissa kontrolleissa (liuotinkontrolleissa) ja kaikissa testikemikaalipitoisuuksissa, ja se ei saa olla solumyrkyllistä käytetyssä pitoisuudessa. Testikemikaalipitoisuudet olisi valittava siten, että vältetään liuoksen saostuminen tai sameus.

Dimetyylisulfoksidi (DMSO) ja etanoli (ETOH) ovat suositeltavia liuottimia. Myös muut liuottimet, jotka eivät ole kovin solumyrkyllisiä, voivat olla sopivia. Kaikkien liuottimien erityisominaisuudet (esim. reaktiivisuus testikemikaalin kanssa, valomyrkyllisyysvaikutuksen vaimeneminen, radikaalien sitomisominaisuus ja/tai kemiallinen stabiilius) on arvioitava ennen käyttöä.

Vortex-sekoitusta ja/tai ultraäänihajoitusta ja/tai lämmittämistä sopiviin lämpötiloihin voidaan käyttää liukenemisen helpottamiseksi, kunhan tämä ei vaikutatestikemikaalin stabiiliuteen.

▼B

1.4.1.5 *Säteilytysolosuhteet*

1.4.1.5.1 V a l o l ä h d e

Sopivan valolähteen ja sopivien suodattimien valitseminen on keskeinen asia valomyrkyllisyyden testauksessa. UVA ja näkyvä valo liittyvät yleensä valomyrkyllisiin reaktioihin *in vivo* (3) (12), kun taas UVB on vähemmän tärkeä, mutta soluille erittäin myrkyllinen. Sen solumyrkyllisyys lisääntyy 1 000-kertaiseksi aallonpituudelta 313 nm aallonpituudelle 280 nm (13). Perusteena sopivan valolähteen valitsemiseen pitäisi olla mm. vaatimus, että valolähde emittoi aallonpituuksia, joita testikemikaali absorboi (absorptiospektri), ja että valoannoksen (joka pitää saavuttaa järkevässä ajassa) pitäisi olla riittävä tunnettujen fotosytotoksisten kemikaalien osoittamiseksi. Lisäksi käytetyt aallonpituudet ja annokset eivät saisi olla liian tuhoisia testijärjestelmälle; tällainen vaikutus olisi mm. lämpö (infrapuna-alue).

Simuloitua auringonvaloa pidetään parhaimpana keinotekoisena valolähteenä. Suodatetun auringonvalosimulaattorin valon säteilytehojakauman olisi oltava lähellä auringonvalon säteilytehojakaumaa (14). Sekä ksenonkaarilamppuja että (seostettuja) elohopeahalidikaarilamppuja käytetään auringonvalosimulaattoreina (15). Jälkimmäisillä on se etu, että ne muodostavat vähemmän lämpöä ja ovat halvempia, mutta niiden spektri ei vastaa auringonvalon spektriä yhtä hyvin kuin ksenonkaarilampuissa. Koska kaikki auringonvalosimulaattorit lähettävät huomattavia määriä UVB-valoa, niiden valo pitäisi suodattaa sopivasti erittäin solumyrkyllisten UVB-aallonpituuksien vaimentamiseksi. Koska soluviljelmissä käytettävät muovimateriaalit sisältävät UV-stabilisaattoreja, spektri pitäisi mitata samantyyppisen 96-kuoppalevyn kannen läpi, jollaista käytetään määrityksessä. Huolimatta laitteiston väistämättömistä suodatinvaikutuksista tai toimenpiteistä, joilla spektrin osia vaimennetaan suodattamalla, näin suodatetun valon spektri ei saisi poiketa standardiauringonvalosta (14). Viitteissä (8) ja (16) annetaan esimerkki *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin validointitutkimuksessa käytetyn auringonvalosimulaattorin suodatetun valon spektrijakaumasta. Katso myös liitteen 2 kuva 1.

1.4.1.5.2 D o s i m e t r i a

Valon voimakkuus (säteilyvoimakkuus, radianssi) olisi tarkistettava säännöllisesti ennen jokaista valomyrkyllisyystestiä käyttämällä sopivaa leveäkaistaista UV-mittaria. Voimakkuus olisi mitattava käyttäen samantyyppistä 96-kuoppalevyn kantta kuin itse testissä. UV-mittarin on oltava kalibroitu valolähteen suhteen. Sen suorituskyky pitäisi tarkistaa, mitä varten suositetaan toisen, samantyyppisen ja täysin samalla tavalla kalibroidun vertailu-UV-mittarin käyttöä. On toivottavaa, että tasaisin välein käytettäisiin spektrometriä suodatetun valolähteen säteilyvoimakkuusspektrin mittaamiseen ja leveäkaista-UV-mittarin kalibroinnin tarkistamiseen.

On todettu, että annos 5 J/cm^2 (UVA-alueella mitattuna) ei ollut myrkyllinen Balb/c 3T3 -soluille ja että se pystyi eksitoimaan kemikaaleja siten, että ilmeni valomyrkyllisiä vaikutuksia (6) (17). Esimerkiksi arvo 5 J/cm^2 saavutettiin 50 minuutin aikana säätämällä säteilyvoimakkuus arvoon 1,7 mW/cm^2 (ks. liitteen 2 kuva 2). Jos käytetään muuta solulinjaa tai eri valolähdettä, säteilytysannos voi olla tarpeen kalibroida, jotta voidaan valita annos, joka ei vahingoita soluja, mutta riittää valomyrkyllisten standardiaineiden eksitoimiseksi. Valoaltistusaika lasketaan seuraavasti:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{irradiation dose } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiance } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1\ J = 1\ Wsec)$$

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Testiaineiden pitoisuudet*

Valon kanssa (+ Irr) ja ilman sitä (- Irr) testattavan kemikaalin pitoisuusalue on määritettävä riittävän laajasti pitoisuusalueenmäärittelykokeissa. Voi olla tarpeen määritellä liukoisuus alussa ja 60 minuutin kuluttua (riippuen käsittelyajasta), koska liukoisuus voi muuttua ajan myötä tai altistuksen aikana. Jotta vältettäisiin epäasianmukaisten viljelyolosuhteiden tai hyvin happamien tai alkalisten kemikaalien aiheuttama myrkyllisyys, soluviljelmien, joihin on lisätty testikemikaali, pH:n pitäisi olla välillä 6,5–7,8.

Testiaineen suurimman pitoisuuden pitäisi olla fysiologisten testiolosuhteiden rajoissa eli pitäisi välttää osmoottista ja pH-stressiä. Testikemikaalista riippuen voi olla tarpeen ottaa huomioon myös muita fysikokemiallisia ominaisuuksia, jotka voivat asettaa rajoituksia suurimmalle testipitoisuudelle. Kun on kyse suhteellisen huonoliukoisista aineista, jotka eivät ole myrkyllisiä kyllästymispisteessä tai sitä alemmilla pitoisuuksilla, suurin saavutettavissa oleva pitoisuus olisi testattava. Testikemikaalin saostumista olisi yleisesti vältettävä kaikilla testipitoisuuksilla. Testiaineen suurin pitoisuus ei saisi olla yli 1 000 μg/mL; osmolaarisuus ei saisi olla yli 10mMol. Olisi käytettävä geometrista laimennussarjaa, jossa on kahdeksan testiaineen pitoisuutta ja laimennuskerroin vakio (katso kohta 2.1, toinen alakohta).

Jos (pitoisuusalueenmäärittelykokeiden perusteella) tiedetään, että testikemikaali ei ole myrkyllinen soluille edes suurimmassa pitoisuudessa pimeäkokeessa (-Irr), mutta on erittäin myrkyllinen soluille säteilytettäessä (+ Irr), voi olla tarpeen valita (+ Irr)-kokeeseen eri pitoisuusalue kuin (- Irr)-kokeeseen, jotta mittaustulosten riittävää laatua koskevat vaatimukset täyttyvät.

1.4.2.2 *Kontrollit*

1.4.2.2.1 Solujen säteilyherkkyys ja sen muuttumisen tarkistaminen:

Solujen herkkyys valolähteelle pitäisi tarkistaa säännöllisesti (noin joka viidennen siirrostamisen jälkeen) arvioimalla niiden elävyys sen jälkeen, kun niitä on altistettu suuremmille säteilytysannoksille. Tässä arvioinnissa pitäisi käyttää useita säteilytysannoksia, myös huomattavasti suurempia kuin 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä käytetyt. Annokset voidaan kvantifioida helpoimmin mittaamalla valolähteen UV-valon määrä. Solut inokuloidaan tiheydessä, jota käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä, ja säteilytetään seuraavana päivänä. Solujen elävyys määritellään yhtä päivää myöhemmin neutraalipunan ottona. On osoitettava, että suurin ei-solumyrkyllinen annos (esim. validointitutkimuksessa 5 J/cm^2 [UVA]) oli riittävä vertailukemikaalien luokittelemiseksi (taulukko) oikein.

▼B

1.4.2.2.2 Säteilyherkkyys, testin tarkistaminen:

Testi täyttää laatuvaatimukset, jos säteilytettyjen negatiivisten kontrollien (liuotinkontrollien) elävyys on yli 80 % verrattuna säteilyttämättömiin negatiivisiin kontrolleihin (liuotinkontrolleihin).

1.4.2.2.3 Liuotinkontrollien elävyys:

Liuotinkontrollien neutraalipunauutteesta mitattu absoluuttinen optinen tiheys (OD540 NRU) osoittaa, ovatko kuoppaa kohti inokuloidut 1×10^4 solua lisääntyneet normaalilla nopeudella määritykseen kuuluvien kahden päivän aikana. Testi täyttää hyväksymisvaatimukset, jos käsittelemättömien kontrollien keskimääräinen $OD540_{NRU}$ on $\geq$ 0,4 (noin 20 kertaa liuottimen tausta-absorbanssi).

1.4.2.2.4 Positiivinen kontrolli:

Kussakin *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä on testattava samanaikaisesti jokin tunnetusti valomyrkyllinen kemikaali. Käytettäväksi suositellaan klooripromatsiinia (CPZ). CPZ:n testaukselle *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyyden standardiprotokollassa määriteltiin seuraavat hyväksyntävaatimukset: CPZ, säteilytetty (+ Irr): IC_{50} = 0,1-2,0 g/ml; CPZ, ei säteilytetty (- Irr): IC50 = 7,0 -90,0 µg/ml. Valoärsyttävyystekijän (PIF) pi täisi olla > 6. Positiivisen kontrollin suorituskykyä olisi seurattava pitkän ajan kuluessa.

Klooripromatsiinin sijasta voidaan samanaikaisesti testattavina positiivisina kontrolleina käyttää muita valomyrkyllisiä kemikaaleja, jotka sopivat kyseessä olevalle kemikaaliluokalle tai arvioitavana olevan kemikaalin liukoisuusominaisuuksiin.

1.4.3 **Testimenetelmä (6) (7) (8) (16) (17):**

1.4.3.1 *1. päivä:*

Pipetoidaan 100 µlviljelynestettä 96-mikrotitterikuoppalevyn laitimmaisiin kuoppiin (= nollakokeet). Muihin kuoppiin pipetoidaan 100 µlsolususpensiota, jossa on 1×10^5 solua/ml viljelynesteessä (= 1×10^4 solua/kuoppa). Kullekin yksittäisen testiaineen pitoisuuksien sarjalle sekä liuotin- ja positiivisille kontrolleille on valmistettava kaksi levyä.

Soluja inkuboidaan 24 h (katso kohta 1.4.1.2), kunnes ne muodostavat puoliksi konfluentin yhden solun vahvuisen kerroksen. Tässä ajassa solut toipuvat, tarttuvat levyn pohjaan ja alkavat kasvaa eksponentiaalisesti.

1.4.3.2 *2. päivä:*

Inkubaation jälkeen viljelyneste kaadetaan kuopista pois ja solut pestään huolellisesti 150 µl:lla puskuriliuosta, jota käytettiin inkubaatiossa. Lisätään 100 µL puskuria, jossa on testikemikaalia tai liuotinta (liuotinkontrolli). Kuoppiin lisätään kahdeksaa eri pitoisuutta testikemikaalia. Soluja inkuboidaan testikemikaalin kanssa pimeässä 60 minuuttia (katso kohta 1.4.1.2 ja kohta 1.4.1.4, toinen alakohta).

Kullekin yksittäisen testiaineen pitoisuuksien sarjalle sekä kontrolleille valmistetuista kahdesta levystä valitaan yksi (yleensä sattumanvaraisesti) sytotoksisuuden määritystä varten (- Irr) (kontrollilevy) ja toinen (testilevy) fotosytotoksisuuden määritystä varten (+ Irr).

▼B

Testin (+ Irr)-osaa varten soluja säteilytetään huoneenlämpötilassa 50 minuuttia 96-kuoppalevyn kannen läpi suurimmalla ei-solumyrkyllisellä säteilyannoksella (katso myös liite 2). Säteilyttämättömät levyt (- Irr) pidetään huoneenlämpötilassa pimeässä laatikossa 50 min (= valoaltistusaika).

Testiliuos kaadetaan pois ja solut pestään huolellisesti kahdesti 150 µl:lla puskuriliuosta, jota käytettiin inkubaatiossa, mutta jossa ei ole testiainetta. Puskuri korvataan viljelynesteellä, ja soluja inkuboidaan (katso kohta 1.4.1.2) yli yön (18–22 h).

1.4.3.3 *3. päivä:*

1.4.3.3.1 Mikroskooppitutkimus

Solujen lisääntyminen, morfologia ja yhden solun vahvuisen kerroksen eheys on tutkittava käyttäen faasikontrastimikroskooppia. Solujen muodonmuutokset ja vaikutukset solujen lisääntymiseen on kirjattava.

1.4.3.3.2 Neutraalipunatesti

Solut pestään 150 µl:lla esilämmitettyä puskuriliuosta. Pesuliuos kaadetaan pois ravistamalla levyä varovasti. Kuoppiin lisätään 100 € neutra alipunaa (NR) (3-amino-7-dimetyyliamino-2-metyylifenatsiinihydrokloridi, EINECS-numero 209-035-8; CAS-numero 553-24-2; C.I. 50040) viljelynesteessä ilman seerumia (16) ja soluja inkuboidaan 3 tunnin ajan kohdassa 1.4.1.2 kuvatulla tavalla. Inkubaation jälkeen NR-viljelyneste poistetaan ja solut pestään 150 µl:lla puskuriliuosta. Puskuriliuos kaadetaan pois ja kuopat kuivataan täysin imeyttäen neste paperiin tai sentrifugoimalla.

Lisätään tarkasti 150 µl NR-desorbointiliuosta (juuri valmistettu, 49 osaa vettä + 50 osaa etanolia + 1 osa etikkahappoa).

Mikrotitterilevyä heilutetaan varovasti ravistajassa 10 minuutin ajan, kunnes NR on uuttunut soluista ja muodostanut tasaisen liuoksen.

NR-uutteen optinen tiheys luetaan aallonpituudella 540 nm spektrofotometrissä käyttäen vertailuliuoksena nollanäytteitä. Mittaustulokset tallennetaan sopivassa sähköisessä muodossa myöhempää analysointia varten.

2. MITTAUSTULOKSET

2.1 MITTAUSTULOSTEN LAATU JA MÄÄRÄ

Mittaustulosten avulla pitäisi voida analysoida järkevästi säteilytyksellä ja ilman sitä saadut pitoisuusvasteet sekä mahdollisuuksien mukaan se testikemikaalin pitoisuus, jossa solujen elävyys on vähentynyt 50 prosenttiin (IC50). Jos havaitaan sytotoksisuutta, sekä pitoisuusalue että yksittäiset pitoisuudet on valittava siten, että koetuloksiin voidaan sovittaa kuvaaja.

Selvästi positiivisia tai selvästi negatiivisia tuloksia ei tarvitse tarkistaa toistamalla koetta (katso kohta 2.3, ensimmäinen alakohta). Tällaisissa tapauksissa riittää yksi koe, jota tukee yksi tai useampia annoksen pitoisuusaluetta määrittäviä alustavia kokeita.

▼B

Moniselitteiset tai epäselvät tulokset tai rajatapaukset olisi selvennettävä uudella testillä (katso kohdan 2.4 toinen alakohta). Tällaisissa tapauksissa olisi harkittava koeolosuhteiden muuttamista. Voidaan muuttaa pitoisuusalue tai pitoisuuksien välit, esi-inkubaatioaika ja altistusaika säteilytykselle. Vedessä hajoaville kemikaaleille voi lyhyt altistusaika olla tarkoituksenmukainen.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI

Tulosten arvioimiseksi voidaan laskea valoärsyttävyystekijä (PIF) tai keskimääräinen valovaikutus (MPE).

Valomyrkyllisyyden arvojen laskemiseksi (ks. jäljempänä) on yksittäisiä konsentraatio-vastearvoja aproksimoitava jatkuvalla konsentraatio-vastekuvaajalla (malli). Kuvaaja sovitetaan tuloksiin tavallisesti soveltamalla ei-lineaarista regressiomenetelmää (18). Jotta voidaan arvioida tietojen vaihtelevuuden vaikutus kuvaajaan, suositellaan bootstrap-menetelmää.

Valoärsyttävyystekijä (PIF) lasketaan seuraavasta kaavasta:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Jos IC_{50}:tä (joko valon kanssa tai ilman valoa) ei voida laskea, PIF:iä ei voida määrittää testiaineelle. Keskimääräinen valovaikutus (MPE) perustuu täydellisten pitoisuus-vastekuvaajien vertailuun (19). Se määritellään edustavien valovaikutusarvojen painotetuksi keskiarvoksi.

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Valovaikutus PE_c missä tahansa pitoisuudessa C määritellään vastevaikutuksen RE_c ja annosvaikutuksen DE_c tulona $PE_c = RE_c$ x DE_c. Vastevaikutus RE_c on ilman valoa ja valon kanssa havaittujen vasteiden erotus $RE_c = R_c$ (- Irr) - R_c (+ Irr). Annosvaikutus lasketaan kaavasta

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{\mathrm{C}/\mathrm{C}^* - 1}{\mathrm{C}/\mathrm{C}^* + 1} \right|$$

jossa C* on ekvivalenssipitoisuus eli pitoisuus, jossa + Irr-vaste vastaa - Irr-vastetta pitoisuudessa C. Jos C*:tä ei voida määrittää, koska + Irr-kuvaajan vastearvot ovat järjestelmällisesti suurempia tai pienempiä kuin R_C (- Irr), annosvaikutuksen arvo on 1. Painotuskertoimet (WI) saadaan suurimmasta vastearvosta: w_i = MAX {Ri (+ Irr), Ri (- Irr)}. Pitoisuusvälit Ci valitaan siten, että kuhunkin pitoisuusväliin kuuluu sama määrä pisteitä. MPE:n laskeminen rajoittuu siihen suurimpaan pitoisuusarvoon, jossa ainakin toinen kuvaajista edelleen antaa vähintään 10 prosentin vastearvon. Jos tämä suurin pitoisuus on suurempi kuin + Irr-kokeessa käytetty suurin pitoisuus, + Irr-kuvaajan jäljelle jäävässä osassa vastearvo on 0. Riippuen siitä, onko MPE:n arvo suurempi kuin asianmukaisesti valittu erotteleva raja-arvo (MPE_c=0,15) vai ei, kemikaali luokitellaan valomyrkylliseksi.

▼B

PIF:n ja MPE:n laskemista varten on saatavissa ohjelmistopaketti (20).

2.3 TULOSTEN TULKINTA

Validointitutkimuksen perusteella (8) testiaineen, jonka PIF < 2 tai MPE < 0,1 ennuste on: ”ei valomyrkyllinen”. Kun PIF > 2 ja < 5, tai kun MPE > 0,1 ja < 0,15, ennuste on: ”todennäköisesti valomyrkyllinen”; kun PIF > 5, tai kun MPE > 0,15, ennuste on: ”valomyrkyllinen”.

Laboratorion, joka ottaa käyttöön tämän määrityksen, olisi testattava ensin taulukossa 1 mainitut vertailumateriaalit ennen kuin aloitetaan testinaineiden testaaminen valomyrkyllisyyden arvioimiseksi. PIF- ja MPE-arvojen tulisi olla lähellä taulukossa 1 mainittuja arvoja.

Taulukko 1

Kemiallinen nimi	EINECS nro	CAS nro	PIF	MPE	Absorptio-huippu	Liuotin ([1])
Amiodaroni-HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (olkapää)	ethanoli
Klooripromat-siini-HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33-0,63	309 nm	ethanoli
Norfloksasiini	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34-0,90	316 nm	asetonitriili
Antraseeni	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19-0,81	356 nm	asetonitriili
Protoporfyriini IX, dinatrium	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54-0,74	402 nm	ethanoli
L-histidiini		[7006-35-1]	ei PIF-arvoa	0,05-0,10	211 nm	vesi
Heksakloro-feeni	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00-0,05	299 nm 317nm (olkapää)	ethanoli
Natriumlauryy-lisulfaatti	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00-0,05	Ei absorp-tiota	vesi

([1]) Absorption määritykseen käytetty liuotin.

2.4 TULOSTEN TULKINTA

Jos valomyrkyllisyysvaikutuksia havaitaan vain suurimmilla testipitoisuuksilla (erityisesti vesiliukoisilla testikemikaaleilla), vaaran arvioimiseksi voidaan tarvita lisätestaamista muilla pitoisuuksilla. Lisätietoja voidaan tarvita esimerkiksi kemikaalin imeytymisestä ja kertymisestä ihoon, ja/tai kemikaali on testattava muulla testillä, esimerkiksi ihmisen tai eläimen ihoa käyttävällä *in vitro* -testillä tai ihomallien avulla.

▼B

Jos myrkyllisyyttä ei voida osoittaa (+ Irr ja - Irr) ja jos aineen huonoliukoisuus rajoittaa testattavia pitoisuuksia, voidaan asettaa kyseenalaiseksi, sopiiko testiaine kyseiseen määritykseen, ja on harkittava vahvistavaa määritystä (esim. käyttämällä muuta mallia).

3. **RAPORTOINTI**

TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— tunnistetiedot, yleisnimet ja IUPAC- ja CAS-numero, jos se tiedetään,

— fysikaalinen olomuoto ja puhtaus,

— fysikokemialliset ominaisuudet, jotka vaikuttavat tutkimuksen tekemiseen,

— UV-valon ja näkyvän valon absorptiospektri,

— stabiilius ja valostabiilius, jos tunnetaan.

Liuotin:

— perustelut liuottimen valinnalle,

— testikemikaalin liukoisuus liuottimeen,

— liuottimen pitoisuus prosentteina käsittelynesteessä.

Solut:

— solujen tyyppi ja lähde,

— onko soluissa mykoplasmaa,

— solujen siirrostusjärjestysluku, jos se tiedetään,

— solujen säteilyherkkyys määritettynä sillä säteilytyslaitteella, jota käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä.

Testiolosuhteet (1) — *inkubointi ennen käsittelyä ja sen jälkeen:*

— viljelynesteen tyyppi ja koostumus,

— inkubaatio-olosuhteet (CO_2-pitoisuus, lämpötila, kosteus),

— inkubaatioaika (esikäsittely, jälkikäsittely).

Testiolosuhteet (2) — *käsittely kemikaalilla:*

— perustelut testikemikaalin pitoisuuksien valintaan (sekä säteilytyksen kanssa että ilman sitä),

— jos testikemikaali on huonoliukoinen eikä osoita solumyrkyllisyyttä, perustelut suurimmalle testatulle pitoisuudelle,

— käsittelynesteen tyyppi ja koostumus (puskuroitu suolaliuos),

— kemikaalikäsittelyn kesto.

Testiolosuhteet (3) — *säteilytys:*

— perustelut käytetyn valolähteen valinnalle,

▼B

— valolähteen ja säteilymittarin valmistaja ja tyyppi,

— valolähteen spektrin säteilyominaisuudet,

— käytetyn suodattimen (käytettyjen suodattimien) transmissio- ja absorptio-ominaisuudet,

— säteilymittarin ominaisuudet ja sen kalibrointi yksityiskohtaisesti,

— valolähteen etäisyys testijärjestelmästä,

— UVA-säteilyn voimakkuus kyseisellä etäisyydellä, mW/cm^2,

— UV-altistuksen tai näkyvälle valolle altistuksen kesto,

— UVA-annos (säteilyvoimakkuus × aika), ilmaistuna laatuna J/cm^2,

— soluviljelmien lämpötila säteilytyksen aikana ja samanaikaisesti pimeässä pidettyjen soluviljelmien lämpötila.

Testiolosuhteet (4) — *neutraalipunatesti:*

— neutraalipunaliuoksen koostumus,

— neutraalipunainkubaation kesto,

— inkubaatio-olosuhteet (CO2-pitoisuus, lämpötila, kosteus),

— neutraalipunan uutto-olosuhteet (uuttoaine, kesto),

— aallonpituus, jolla neutraalipunan optinen tiheys luettiin spektrofotometrillä,

— toinen (vertailu-) aallonpituus, jos sellaista käytettiin,

— spektrofotometrin mahdollisen nollaliuoksen sisältö.

Tulokset:

— solujen elävyys kullakin testikemikaalin pitoisuudella ilmaistuna prosentteina rinnakkaisten liuotinkontrollien keskimääräisestä elävyydestä,

— pitoisuus-vastekuvaajat (testikemikaalin pitoisuus vs. suhteellinen solujen elävyys), joka on saatu samanaikaisesti tehdyissä (+ Irr)- ja (- Irr)-kokeissa,

— pitoisuus-vastekuvaajien analyysi; jos mahdollista, lasketaan IC_{50} (+ Irr) ja IC_{50} (- Irr),

— niiden kahden konsentraatio-vastekuvaajan vertailu, jotka on saatu säteilytyksen kanssa ja ilman sitä, joko laskemalla valoärsyttävyystekijä (PIF) tai laskemalla keskimääräinen valovaikutus (MPE),

— testin hyväksyttävyyskriteerit; samanaikainen liuotinkontrolli:

— säteilytettyjen ja säteilyttämättömien solujen absoluuttinen elävyys (neutraalipunauutteen optinen tiheys),

— negatiivista ja liuotinkontrollia koskevat aiemmat tiedot; keskiarvot ja vakiopoikkeamat,

— –testin hyväksyttävyyskriteerit; samanaikainen positiivinen kontrolli:

▼B

— positiivisen kontrollikemikaalin IC_{50} (+ Irr) ja IC_{50} (- Irr) ja PIF/MPE;

— positiivista kontrollia koskevat aiemmat kemialliset tiedot: IC_{50} (+ Irr) ja IC_{50} (- Irr) ja PIF/MPE; keskiarvot ja vakiopoikkeamat.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95–102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In ”Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry” Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI–XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314–348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In ”The science of Photobiology” Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79–110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 ”Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water” Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793–796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7–8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305–327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30^{th}-31^{th} October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15^{th} March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225–237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In ”Dermatotoxicology”, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515–530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825–1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union Directive 76/768/EEC, in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679–708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127–138.

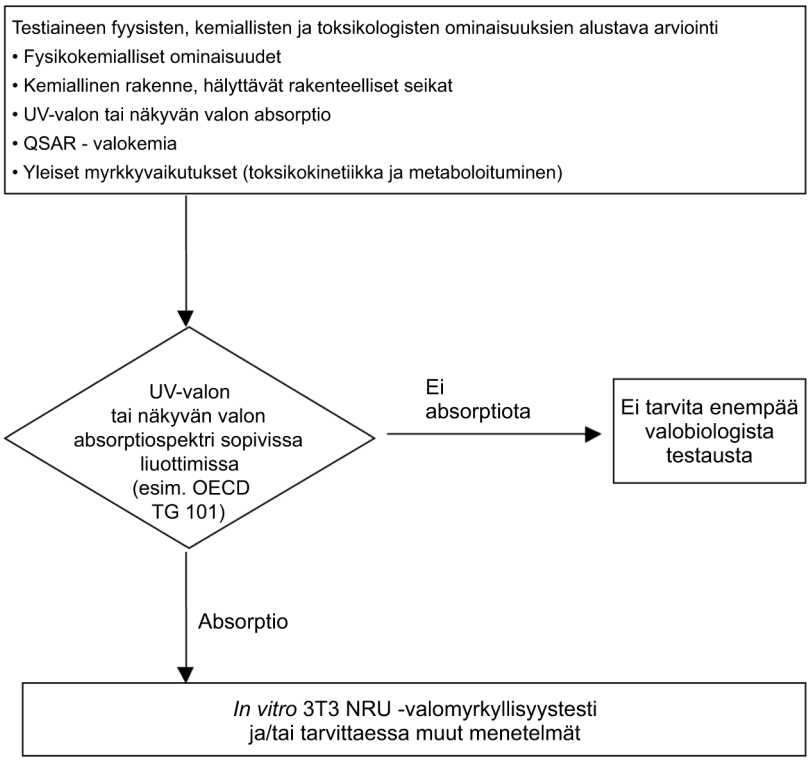
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1, 00.html

▼B

LIITE 1

3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin asema kemikaalien valomyrkyllisyyden vaiheittaisessa määrittämisessä

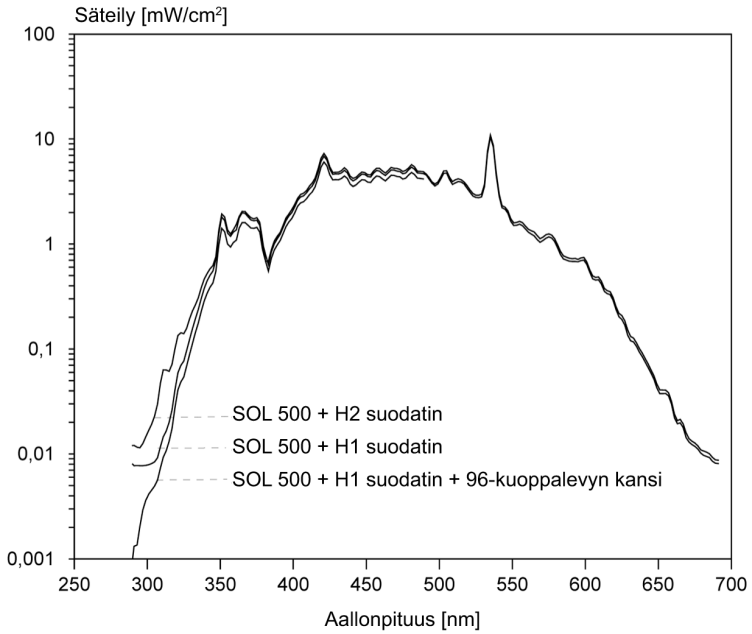


▼B

LIITE 2

Kuva 1

Suodatetun auringonvalosimulaattorin valon spektritehojakauma



(katso kohdan 1.4.1.5 toinen alakohta)

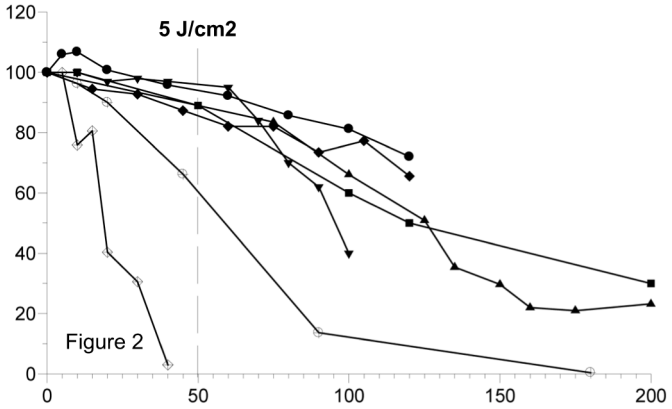
Kuvassa 1 oleva kaavio on esimerkki hyväksyttävästä suodatetun auringonvalosimulaattorin spektrin säteilyvoimakkuusjakaumasta. Kyseessä on (seostettu) metallihalidikaarilamppu, jota käytettiin 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin validointikokeessa (6) (8) (17). Kaaviosta käy ilmi kahden eri suodattimen suodatinvaikutus sekä soluviljelmien 96-kuoppalevyn kannen lisäsuodatinvaikutus. H2-suodatinta käytettiin vain testijärjestelmissä, jota sietävät suurempia määriä UVB-säteilyä (ihomallitesti ja punaisten verisolujen fotohemolyysitesti). 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä käytettiin H1-suodatinta. Kaaviosta käy ilmi, että kuoppalevyn kannen lisäsuodatinvaikutus todetaan pääasiallisesti UVB-alueella. Suodatinvaikutus jättää säteilyspektriin tarpeeksi UVB-säteilyä, jotta voidaan eksitoida kemikaaleja, jotka absorboivat säteilyä tyypillisesti UVB-alueella (esim. amiodaroni) (katso taulukko 1).

▼B

Kuva 2

Balb/c 3T3 -solujen säteilyherkkyys (mitattuna UVA-alueella)

Solujen elävyys (neutraalipunan otto prosentteina pimeässä pidettyjen kontrollien neutraalipunan otosta)



Säteilytyksen kesto(min)

(10 min = 1 joule UVA/cm^2)

(katso kohdan 1.4.1.5.2 toinen alakohta sekä kohdat 1.4.2.2.1 ja 1.4.2.2.2)

Kaavio kuvaa Balb/c 3T3 -solujen herkkyyttä 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin validointikokeessa käytetyn auringonvalosimulaattorin valolle (mitattuna UVA-alueella). Kuvaajasta näkyvät validointia edeltäneessä tutkimuksessa (seitsemässä eri laboratoriossa) saadut tulokset (1). Valkoisilla symboleilla merkityt kaksi kuvaajaa saatiin vanhoilla soluilla (paljon siirrostamisia), jotka oli korvattava uusilla soluilla. Mustilla symboleilla merkityt kuvaajat saatiin soluilla, joiden säteilyherkkyys oli hyväksyttävä.

Näistä tiedoista johdettiin suurimmaksi ei-solumyrkylliseksi säteilytysannokseksi 5 J/cm^2 (pystysuora katkoviiva). Vaakasuora katkoviiva osoittaa lisäksi suurimman hyväksyttävän säteilyvaikutuksen (katso kohta 1.4.2.2.).

▼M3

B.42. **IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ**

JOHDANTO

1. Kemikaalien testausta koskevia OECD:n ohjeita ja niihin perustuvia EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Hiirten ihoherkistyksen määrittämisessä käytettävä alkuperäinen testimenetelmä, paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429; tämän liitteen B.42 luku), on hyväksytty aiemmin (1). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja siihen liittyvien tehtävien arviointi on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Ajan tasalle saatettu LLNA perustuu kokemusten ja tieteellisten tietojen arviointiin (12). Tämä on toinen menetelmä kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseksi eläimillä. Toisessa testimenetelmässä (OECD:n testiohje 406; tämän liitteen B.6 luku) käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (13). LLNA-menetelmä on B.6 menetelmään ja OECD:n testiohjeeseen 406 (13) verrattuna edistyneempi eläinten hyvinvoinnin kannalta. Tässä ajan tasalle saatetussa LLNA-testimenetelmässä esitetään suoritusvaatimuksia (lisäys 1), joiden avulla LLNA-menetelmää toiminnallisesti ja mekaanisesti vastaavien uusien ja/tai mukautettujen testimenetelmien validoinnin tila voidaan arvioida OECD:n ohjeasiakirjan nro 34 (14) periaatteiden mukaisesti.

2. LLNA-menetelmällä tutkitaan ihoherkistyksen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. On syytä huomata, että lievää tai keskimääräistä herkistystä aiheuttavia aineita, joita suositellaan positiivisiksi kontrollikemikaaleiksi marsutestimenetelmissä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13), voidaan käyttää myös LLNA-menetelmässä (6) (8) (15). Myös koe-eläinten vähäisempään käyttöön perustuva LLNA-menetelmän muunnos (rLLNA-menetelmä), jossa eläimiä käytetään jopa 40 prosenttia vähemmän, kuvataan vaihtoehtona tässä testimenetelmässä (16) (17) (18). rLLNA-menetelmää voidaan käyttää, jos ihoherkistyspotentiaalin ennakoitu negatiivinen löydös on sääntelysyistä vahvistettava, edellyttäen että kaikkia muita tässä testimenetelmässä kuvattuja LLNA-menettelyn vaatimuksia noudatetaan. Negatiivisen löydöksen oletuksen on perustuttava kaikkiin 4 kohdassa tarkoitettuihin saatavilla oleviin tietoihin. Ennen rLLNA-menetelmän käyttöä on sille esitettävä selvät perustelut ja tieteelliset perusteet. Jos rLLNA-menetelmällä saadaan odotusten vastaisesti positiivinen tai epäselvä tulos, löydöksen tulkitsemiseksi tai selventämiseksi voidaan tarvita täydentäviä testejä. Tätä rLLNA-menetelmää ei saa käyttää ihoherkistystesteissä käytettävien aineiden vaarallisuuden määrittämiseksi siinä tapauksessa, että vaaditaan annos-vastetietoja, kuten aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ja Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmässä (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) määritettyä alaluokitusta.

MÄÄRITELMÄT

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 2.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA on vaihtoehtoinen menetelmä ihoa herkistävien kemikaalien tunnistamiseksi. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA-menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa marsutestin asemesta (B.6; OECD:n testiohje 406) (13), vaan pikemminkin sitä, että menetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen. Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia tietoja ovat muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden testiaineella

▼M3

tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisten kemikaalien toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA-menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA-menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaalityyppien testaamiseen – katso 1 kohta) ja mitä annosta on käytettävä.

5. LLNA on *in vivo* -menetelmä, joten sitä käytettäessä ei lopeteta koe-eläinten käyttöä kosketusherkistyksen arvioinnissa. Sitä käytettäessä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen tarvittavien eläinten määrää. LLNA-menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti aikaisempia edistyneempi (vähemmän kipua ja kärsimystä). LLNA-menetelmän perustana on kemikaalien aiheuttamien immunologisten tapahtumien tarkastelu ihoherkistyksen induktiovaiheen aikana. Marsutesteistä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13) poiketen LLNA-menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkkyysreaktioiden tuottamista. LLNA-menetelmä ei myöskään edellytä adjuvantin käyttöä, toisin kuin marsuilla tehtävä maksimointitesti (13). Lena-menetelmään siis liittyy vähemmän eläinten kipua ja kärsimystä. Vaikka LLNA-menetelmä onkin B.6 menetelmään ja OECD:n testiohjeeseen 406 verrattuna edistyneempi, on syytä huomata, että siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (13) (väärät negatiiviset löydökset LLNA-menetelmällä joidenkin metallien osalta, väärät positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten kemikaalien, osalta (19) (20) tai testiaineen liukoisuus). Määritystä häiritseviä (21) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13). Pääasiassa torjunta-aineformulaatioita sisältävän suppean validointitietokannan perusteella LLNA-menetelmällä saadaan tämäntyyppisistä testiaineista (22) marsutestiä todennäköisemmin positiivinen tulos. Formulaatioita testattaessa on kuitenkin tarvittaessa otettava vertailuaineeksi tunnettuja tuloksia antavia aineita sen osoittamiseksi, että LLNA-menetelmä toimii asianmukaisesti (katso 16 kohta). Tällaisia tunnettuja rajoituksia lukuun ottamatta LLNA-menetelmällä olisi pystyttävä testaamaan mitä tahansa ainetta, elleivät kyseisten aineiden ominaisuudet vaikuta LLNA-menetelmän tarkkuuteen.

TESTIN PERIAATE

6. LLNA-menetelmän perusperiaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfosyyttien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat alueen, jonne testiaine on annosteltu. Tämä proliferaatio on suhteessa allergeenin annokseen ja potenssiin ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistyksen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä proliferaatiota kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan keskimääräiseen proliferaatioon. Kunkin käsitellyn ryhmän keskimääräisen proliferaation ja sitä vastaavan kantaja-aineella käsitellyn ryhmän keskimääräisen proliferaation suhde (stimulaatioindeksi, SI) määritetään, ja sen on oltava vähintään 3, ennen kuin testiaine voidaan arvioida mahdollisesti ihoherkistystä aiheuttavaksi. Tässä kuvatut menetelmät perustuvat korvalehden dreneeraavien imusolmukkeiden solujen proliferaation mittaamiseen radioaktiivisen *in vivo* -merkkiaineen avulla. Solujen proliferaation arvioimiseksi voidaan kuitenkin käyttää myös muita päätepisteitä edellyttäen, että suoritusvaatimukset täytetään (lisäys 1).

▼M3

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Paras eläinlaji tähän testiin on hiiri. Testissä käytetään nuoria täysikasvuisia CBA/Ca- tai CBA/J-kannan naarashiiriä, jotka eivät ole synnyttäneet eivätkä ole raskaana. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painoerojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA-vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä samoissa häkeissä (23), ellei hiirien pitämiselle erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70 prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, on kuitenkin pyrittävä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamerkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliuosten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana tai ennen annostelua laimennettuina. Vaikealiukoisia kemikaaleja, kuten sellaisia, joita käytetään yleisesti lääkinnällisissä laitteissa, olisi uutettava erityisen voimakkaasti asianmukaisessa liuottimessa, jotta saataisiin testausta varten esiin kaikki uuttuvat ainesosat ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Testin luotettavuuden tarkistus

11. Määritysmenetelmän toimivuus osoitetaan positiivisten kontrollikemikaalien avulla. Niillä on testissä saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen, ja vasteen voimakkuuden on oltava aineelle tyypillinen. Positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä samanaikaisesti suositellaan, koska sillä osoitetaan, että laboratoriolla on riittävä pätevyys kunkin määritysmenetelmän toteuttamiseksi, ja sen avulla voidaan arvioida laboratorioiden sisäistä ja laboratorioiden välistä uusittavuutta ja vertailtavuutta. Myös tietyt sääntelyviranomaiset vaativat positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä jokaisessa määrityksessä, ja käyttäjiä kehotetaankin ottamaan yhteyttä asiasta vastaaviin viranomaisiin ennen LLNA-menetelmän toteuttamista. Tämän takia suositellaan, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään säännönmukaisesti kaikissa määrityksissä, jotta positiivisen kontrollikemikaalin satunnaisesta käytöstä mahdollisesti johtuvien vaatimusten täyttämiseksi ei tarvitsisi

▼M3

tehdä uusia eläinkokeita (katso 9 kohta). Positiivisen kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA-vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan stimulaatioindeksin (SI), joka on suurempi kuin 3, negatiiviseen kontrolliryhmään verrattuna. Positiivisen kontrollikemikaalin annostaso on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi SI > 20 on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanelialdehydi (CAS-numero 101-86-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v) ja 5-prosenttinen merkaptobentsotiatsoli (CAS-numero 149-30-4) *N,N*-dimetyyliformamidissä (katso lisäyksen 1 taulukko 1). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.

12. Vaikka positiivisen kontrolliryhmän käyttöä suositellaan aina, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin testaus vain ajoittain (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA-menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka tekevät LLNA-määritystä vähintään kerran kuukaudessa) ja joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA-menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä kohtuullisen ajan kuluessa (alle yhden vuoden aikana).

13. Samaan aikaan tehtyä positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä aina, kun LLNA-menetelmää muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu), ja tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava päätettäessä, onko uusien määritystietojen kerääminen tarpeen positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.

14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivista kontrollikemikaalia ei määritetä joka kerralla vaan vain silloin tällöin, saattaa negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyys vaarantua, kun ajoittain tehtyjen positiivisen kontrollikemikaalin määritysten välillä ei tehdä positiivisen kontrollikemikaalin määritystä samanaikaisesti. Jos esimerkiksi ajoittaisesta positiivisen kontrollikemikaalin määrityksestä saadaan väärä negatiivinen tulos, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyn ajoittaisen määrityksen ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn ajoittaisen määrityksen tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä testiaineen rinnalla tai vain ajoittain. Lisäksi olisi harkittava, että testiaineen rinnalla käytettävää positiivista kontrolliryhmää varten käytettäisiin vähemmän eläimiä, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että käytettävien hiirten määrää voidaan vähentää (12).

15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit on testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi asetoni:oliiviöljy, 4:1 v/v), joissakin tapauksissa testaus saattaa sääntelysyistä olla tarpeen myös muussa kuin standardikantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa) (24). Jos samanaikaisesti määritettävää positiivista kontrollikemikaalia testataan eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, on sitä varten käytettävä erillistä kantaja-aineella käsiteltyä positiivista kontrollia.

16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia testiaineita voidaan myös käyttää vertailuaineita sen osoittamiseksi, että testimenetelmällä voidaan asianmukaisesti havaita tämäntyyppisten testiaineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi oltava seuraavat ominaisuudet:

— rakenteellinen ja funktionaalinen vastaavuus testattavana olevaan testiaineluokkaan verrattuna

— tunnetut fyysiset/kemialliset ominaisuudet

— sopivuutta tukevia LLNA-menetelmästä saatuja tietoja

— sopivuutta tukevia muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä saatuja tietoja.

▼M3

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota; lisäksi käytetään aina negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (jota käytetään aina tai jota on käytetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–14 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsäännöllisesti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.

18. Annostason ja kantaja-aineen valinnan on perustuttava lähteissä (3) ja (5) esitettyihin suosituksiin. Yleensä valitaan sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. peräkkäisiä konsentraatioita. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) ja rakenteelliset ja fysikaaliskemialliset tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa siten, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta kuitenkin niin, että vältetään koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys (3) (25). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, voi olla tarpeen tehdä alustava kartoitustesti (katso 21–24 kohta).

19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä, ja se on valittava siten, että testiaineen annosteluun sopivan liuoksen/suspension aikaan saannissa varmistetaan suurin mahdollinen liukoisuus ja konsentraatio. Suositeltavia kantaja-aineita ovat asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v), *N,N*-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (19), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävin tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta tai sitä kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemista edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). On siis syytä välttää kantaja-aineina pelkkiä vesiliuoksia.

20. Yksittäisten hiirten imusolmukkeita prosessoimalla voidaan arvioida eläintenvälistä vaihtelua ja vertailla tilastollisesti testiaineella ja kantaja-aineella käsiteltyjen ryhmien tuloksia (katso 35 kohta). Myös positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentämisen arviointi on mahdollista, kun tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (12). Tietyt sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Jotkut sääntelyviranomaiset kuitenkin hyväksyvät useista eläimistä yhdistettyjä tietoja, ja tällaisissa tilanteissa käyttäjät voivat kerätä tietoja joko yksittäisistä eläimistä tai eläinryhmistä.

Varsinaista testiä edeltävä kartoitustesti

21. Jos suurimman testattavan annoksen määrittämiseksi ei ole saatavilla tietoja (katso 18 kohta), on kartoitettava esitestillä, mikä olisi LLNA-menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostaso. Kartoitustesti helpottaa enimmäisannoksen tason valinnassa varsinaista LLNA-tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan enimmäisannoksen tason on vastattava sataa prosenttia nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.

▼M3

22. Kartoitustesti suoritetaan varsinaista LLNA-tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden proliferaatiota ei arvioida ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai applikaatiokohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 6). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (25). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta) ja päivänä 6. Päivänä 6 korvan paksuus voidaan myös määrittää mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humaanisti. Jos eryteema on erittäin voimakas ja/tai korvan paksuus on kasvanut vähintään 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä, paikallinen ihoärsytys pisteytetään arvolla ≥ 3 (26) (27). Suurin varsinaiseen LLNA-tutkimukseen valittava annos on testiä edeltävän konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Käsiteltyjen hiirten korvien paksuuden tilastollisesti merkittävää yli 25 prosentin kasvua (26) (27) kontrollihiiriin verrattuna on käytetty myös LLNA-menetelmän ärsyttävien aineiden määrittämisessä (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Vaikka tilastollisesti merkittävää paksuuden kasvua voi esiintyä silloinkin, kun korvan paksuus on alle 25 prosenttia, sen ei katsota liittyvän erityisesti erittäin voimakkaaseen ärsytykseen (30) (32) (33) (34).

24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat yhdennetyn arvioinnin osana olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (35) (36) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA-menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haukkominen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 6 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti (37).

▼M3

Varsinaisen tutkimuksen aikataulu

25. Määrityksen aikataulu on seuraava:

— *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään ja kirjataan mahdolliset kliiniset havainnot. Kunkin korvan takaosaan applikoidaan 25 µl testiaineen, kantaja-aineen tai positiivisen kontrollikemikaalin (jota käytetään aina tai jota on käytetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.

— *Päivät 2 ja 3:* Toistetaan päivänä 1 toteutettu applikointimenettely.

— *Päivät 4 ja 5:* Ei käsittelyä.

— *Päivä 6:* Kirjataan kunkin eläimen paino. Ruiskutetaan 250 µl steriiliä fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS), joka sisältää 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritiumilla merkittyä (^{3}H)-metyylitymidiiniä, kaikkiin testi- ja kontrolliryhmän hiiriin häntävaltimon kautta. Vaihtoehtoisesti ruiskutetaan 250 µl steriiliä PBS:ää, joka sisältää 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jodideoksiuridiinia ja 10^{-5}-molaarista fluorideoksiuridiinia, kaikkiin hiiriin häntävaltimon kautta. Viiden tunnin (5 h) kuluttua eläimet lopetetaan humaanisti. Kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvalehden imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet upotetaan PBS:ään (vain yhden yksilön näytteet); vaihtoehtoisesti kummankin korvan imusolmukkeet voidaan leikata ja koko koeryhmän imusolmukkeet voidaan upottaa PBS:ään (käsittelyryhmän näytteet yhdistetään). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja leikkaamiseen liittyvät yksityiskohdat ja kaaviot esitetään lähteessä (12). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa tarkemmin niin, että tutkimussuunnitelmaan sisällytetään täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

Solususpensioiden valmistus

26. Yksittäisten eläinten imusolmukeparien soluista tai testiryhmien yhdistetyistä imusolmukesoluista valmistetaan suspensio, jossa kaikki solut ovat irrallaan muista (yksisolususpensio), mekaanisesti hajottamalla solukertymät painamalla ne varovaisesti ruostumattoman terässeulan läpi (silmäkoko 200 µm) tai käyttämällä muuta yksisolususpension valmistamiseksi hyväksyttyä tekniikkaa. Imusolmukesolut pestään kahdesti runsaalla PBS:llä, ja DNA saostetaan 5-prosenttisessa trikloorietikkahapossa 4 °C:n lämpötilassa 18 tunnin ajan (3). Pelletit voidaan joko suspendoida uudelleen 1 ml:aan trikloorietikkahappoa ja siirtää tuikeputkiin, joissa on 10 ml tuikenestettä ^{3}H-laskentaa varten, tai siirtää suoraan gammalaskentaputkiin ^{125}I-laskentaa varten.

Solujen proliferaation (inkorporoituneen radioaktiivisuuden) määritys

27. ^{3}H-metyylitymidiinin inkorporoituminen mitataan β-tuikelaskennalla hajoamisina minuutissa (DPM). ^{125}I-jodideoksiuridiinin inkorporoituminen mitataan ^{125}I-laskennalla ja ilmoitetaan niin ikään DPM-arvona. Inkorporoituminen ilmoitetaan DPM:nä joko eläintä kohti tai testiryhmää kohti.

Vähemmän koe-eläimiä käyttävä LLNA-menetelmä

28. Vaihtoehtoista, vähemmän koe-eläimiä käyttävää rLLNA-menetelmää (16) (17) (18) voidaan soveltaa tietyissä tapauksissa, joissa ihoherkistyspotentiaalin negatiivinen oletus on sääntelysyistä vahvistettava, edellyttäen että kaikkia muita tässä testimenetelmässä kuvattuja LLNA-menettelyn vaatimuksia noudatetaan. rLLNA-menettelyn käyttö on perusteltava selvästi ja tieteellisesti ennen menetelmän käyttöä. Jos tulos on positiivinen tai epäselvä, löydöksen tulkitsemiseksi tai selventämiseksi voidaan tarvita täydentäviä testejä.

▼M3

29. LLNA- ja rLLNA-testimenetelmien ainoana erona on erilainen annosryhmien määrä, minkä vuoksi rLLNA-menetelmä ei anna tietoja annosvasteesta. Näin ollen rLLNA-menettelyä ei pidä käyttää, jos annosvastetta koskevia tietoja tarvitaan. Kuten useisiin annoksiin perustuvassa LLNA-menettelyssä, myös rLLNA-menettelyssä arvioitavan testiaineen konsentraationa on käytettävä suurinta konsentraatiota, joka ei vielä aiheuta hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta ihoärsytystä (katso 18 kohta).

HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

30. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualueen paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmissa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, erittäin voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyttävyydestä, jotta ne voitaisiin lopettaa (37).

Ruumiinpainot

31. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humaanin lopettamisen yhteydessä.

TULOSTEN LASKEMINEN

32. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan stimulaatioindeksinä (SI). Yksilönäytteistä SI-arvo saadaan jakamalla kunkin testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista DPM-arvoista laskettu keskiarvo liuotin/kantaja-aineryhmän vastaavalla tuloksella. Kantaja-aineella käsiteltyjen kontrolliryhmien SI:n keskiarvo on 1. Ryhmänäytteistä SI-arvo saadaan jakamalla kunkin testiryhmän yhdistetty radioaktiivinen inkorporoituminen kantaja-aineryhmän yhdistetyllä inkorporoitumisella, jolloin saadaan SI:n keskiarvo.

33. Tulos katsotaan positiiviseksi, kun SI $\geq$ 3. Päätettäessä, katsotaanko rajatulos positiiviseksi, voidaan myös käyttää annosvasteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuottimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikemikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (4) (5) (6).

34. Jos saatuja tuloksia pitää selventää, huomioon on otettava testiaineen erilaiset ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistystä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas paikallinen ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita huomionarvoisia seikkoja käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (7).

35. Kun radioaktiivisuuden mittaustuloksia kerätään erikseen kustakin hiirestä, voidaan niiden perusteella analysoida tilastollisesti mahdollista annosvastetta ja sen tasoa. Tilastollisessa arvioinnissa voidaan myös arvioida annosvasteen voimakkuutta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu kantaja-ainekontrolliryhmään, kun kontrolli on tehnyt samanaikaisesti). Tilastoanalyyseissä voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamin testiä, joilla arvioidaan annos-vastesuuntauksia, sekä Dunnettin testiä, jolla vertaillaan pareja. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastollisen analyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssien mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määritystulosten muuntamista tai non-parametrista tilastollista analyysia. Joka tapauksessa tutkija voi joutua tekemään SI-laskelmia ja tilastoanalyyseja siten, että mukana on tai ei ole tiettyjä määrityskohtia koskevia tietoja (ns. käyrän ulkopuolella olevat tulokset).

▼M3

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

36. Mittaustulokset on esitettävä taulukkona. Yksilönäytteiden osalta esitetään eläinkohtaiset DPM-arvot, ryhmän eläinkohtaisen DPM-arvon keskiarvo, siihen liittyvä virhe (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI vastaavaan kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna. Ryhmänäytteiden osalta esitetään keskimääräinen DPM / DPM:n mediaani sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaisesti käsiteltyyn kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Testiraportti

37. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrolliaineet

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),

— jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

— tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet

— CBA-hiirten alkuperä,

— eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,

— eläinten määrä ja ikä,

— eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

— tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,

— perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina kartoitustestin tulokset, jos sellainen on tehty),

— käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),

— tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,

— toksisuuden mittausmenetelmät,

— tutkimusten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,

— tiedot menettelystä poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimussuunnitelmaan ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

— yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,

— testauslaboratorion samanaikaisesti tehtyjen ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten kontrollien tulokset,

▼M3

— jos määrityksessä ei ollut samanaikaisesti tehtyä positiivista kontrollia, on annettava viimeisimmän positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivisista kontrollitiedoista, joiden perusteella positiivista kontrollia ei tehty.

Tulokset

— kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe),

— toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna annostelualueen ihoärsytys, jos sellaista esiintyy, erikseen kullekin eläinyksilölle,

— taulukko kunkin hiiren (yksilönäytteet) tai kunkin käsittelyryhmän (ryhmänäytteet) keskimääräisistä DPM- ja SI-arvoista / DPM:n ja SI:n mediaaneista,

— kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisen DPM-arvon keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vasteiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle käytettäessä yksittäisiä eläimiä,

— testiaineella ja kontrolliaineella käsitellyille ryhmille yksilönäytteiden yhteydessä laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläinten välinen vaihtelu,

— annos-vastesuhde,

— tarvittaessa tilastolliset analyysit.

Tulosten pohdinta

— tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastollinen analyysi sekä johtopäätös siitä, onko testiainetta pidettävä ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

(1) OECD (2002). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429. Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Kimber, I. ja Basketter, D. A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food Chem. Toxicol*. 30, s. 165–169.

(3) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*. 93, s. 13–31.

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

(5) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*. 34, s. 999–1002.

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

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

▼M3

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

(9) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 258–273.

(10) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 274–286.

(11) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 249–257.

(12) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf

(13) OECD (1992). *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(14) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(15) Dearman, R. J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D. A. ja Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J. Appl. Toxicol*. 18, s. 281–284.

(16) Kimber, I., Dearman, R. J., Betts, C. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Patlewicz, G. Y. ja Basketter, D. A. (2006). The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis* 54, s. 181–185.

(17) ESAC (2007). Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA). Euroopan komission pääosasto – yhteinen tutkimuskeskus, kuluttajien terveyden ja kuluttajansuojan laitos, Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus, huhtikuu 2007. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf

(18) ICCVAM (2009). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products. NIH-julkaisunumero 09-6439. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/

(19) ICCVAM (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.* 46, s. 1896–1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 55, s. 90–96.

(22) ICCVAM (2009). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions. NIH-julkaisunumero 10-7512. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/

(23) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.* 238, s. 71–89.

(25) OECD (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404. Pariisi, Ranska. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html

(26) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.

(27) ICCVAM (2009). Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf

(28) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug. Chem. *Toxicol.* 21, s. 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 153, s. 83–94.

(30) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.

(31) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol*. 22, s. 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*. 212, s. 60–68.

(33) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.

(34) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*. 115, s. 1023–1028.

(35) OECD (1987). *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402. Pariisi, Ranska. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm

(37) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

Lisäys 1

Suoritusvaatimukset ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen ihoherkistyksen LLNA-testimenetelmien arviointia varten

JOHDANTO

1. Suoritusvaatimusten tarkoituksena on antaa arviointiperusteet, joiden avulla voidaan määrittää, ovatko uudet testimenetelmät – niin yksinoikeudelliset (eli tekijänoikeudelliset, tavaramerkityt tai rekisteröidyt) kuin muut kuin yksinoikeudelliset – riittävän tarkkoja ja luotettavia tiettyjä testaustarkoituksia varten. Näitä validoituihin ja hyväksyttyihin testimenetelmiin perustuvia suoritusvaatimuksia voidaan käyttää muiden samanlaisten menetelmien (niin sanottujen me-too-testien) luotettavuuden ja täsmällisyyden arviointiin, kun kyseiset menetelmät perustuvat samanlaisiin tieteellisiin periaatteisiin ja niillä mitataan tai ennakoidaan samaa biologista tai toksista vaikutusta (14).

2. Ennen menetelmien muuttamisen (eli hyväksytyn testimenetelmän ehdotetun mahdollisen parantamisen) hyväksymistä on arvioitava ehdotettujen muutosten vaikutus testin suorituskykyyn ja se, missä määrin kyseiset muutokset vaikuttavat validointimenettelyn muita osia varten saatavilla oleviin tietoihin. Ehdotettujen muutosten määrästä ja luonteesta, saaduista mittaustuloksista ja kyseisiä muutoksia tukevasta asiakirja-aineistosta riippuen menetelmän muutoksille on tehtävä uudelle testille kuvatun kaltainen validointimenettely tai tarvittaessa luotettavuuden ja merkityksellisyyden rajattu arviointi käyttämällä vakiintuneita suoritusvaatimuksia (14).

3. Tähän testaustarkoitukseen käytettäväksi ehdotettujen samanlaisten tai mukautettujen menetelmien luotettavuus ja tarkkuus olisi määritettävä käyttämällä kemikaaleja, jotka edustavat kattavasti kaikkia LLNA:n pisteytysarvoja. Eläinten tarpeettoman käytön välttämiseksi suositellaan painokkaasti, että mallien kehittäjät kuulevat asiasta vastaavia viranomaisia ennen validointitutkimusten käynnistämistä suoritusvaatimusten ja tässä testimenetelmässä esitettyjen ohjeiden mukaisesti.

4. Nämä suoritusvaatimukset perustuvat Yhdysvaltain US-ICCVAM:in, EU:n EC-ECVAM:in ja Japanin JaCVAM:in yhdenmukaistettuihin suoritusvaatimuksiin (12), joilla arvioidaan LLNA:n samanlaisten tai mukautettujen versioiden pätevyyttä. Suoritusvaatimukset koskevat testimenetelmän olennaisia osia, suositeltuja vertailukemikaaleja ja tarkkuus- ja luotettavuusvaatimuksia, jotka ehdotetun menetelmän olisi saavutettava tai ylitettävä.

I. **Olennaiset testimenetelmän osat**

5. Jotta samanlainen tai mukautettu LLNA-menetelmä vastaisi toiminnallisesti ja mekaanisesti LLNA:ta jotta varmistettaisiin, että sillä mitataan samaa biologista vaikutusta, testausprotokollassa on oltava seuraavat osat:

— Testiainetta on applikoitava paikallisesti hiiren molempiin korviin.

— Lymfosyyttien proliferaatio on mitattava niissä imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat alueelta, johon testiaine on annosteltu.

— Lymfosyyttien proliferaatio on mitattava ihoherkistyksen induktiovaiheessa.

▼M3

— Testiaineiden suurimpana valittuna annoksena on käytettävä suurinta konsentraatiota, joka ei vielä aiheuta hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä. Positiivisten vertailukemikaalien suurimpana annoksena on käytettävä annosta, joka vastaa vähintään vastaavien vertailukemikaalien LLNA EC3 -arvoja (katso taulukko 1) ilman, että se aiheuttaa hiiressä koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

— Jokaiseen tutkimukseen on sisällytettävä samaan aikaan määritetty kantaja-ainekontrolliryhmä ja tarvittaessa myös samaan aikaan määritetty positiivinen kontrollikemikaali.

— Kussakin annosryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä.

— Tietoja voidaan kerätä joko eläinkohtaisesti tai ryhmäkohtaisesti.

Jos kaikkia vaatimuksia ei täytetä, suoritusvaatimuksilla ei voida validoida samanlaista tai mukautettua menetelmää.

II. **Vertailukemikaalien vähimmäisluettelo**

6. Yhdysvaltain US-ICCVAM:in, EU:n EC-ECVAM:in ja Japanin JaCVAM:in yhdenmukaistetuissa suoritusvaatimuksissa (12) on määritetty 18 pakollista vähimmäisvertailukemikaalia ja neljä valinnaista vertailukemikaalia (aineita, joilla saadaan LLNA-menetelmässä aikaan vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia ihmis- ja marsutestien tuloksiin verrattuna (B.6 tai OECD:n testiohje 406) (13) ja joiden avulla voidaan näin ollen osoittaa LLNA-menetelmää vastaava tai parempi suorituskyky), jotka on sisällytetty LLNA-menetelmän suoritusvaatimuksiin. Näiden kemikaalien valinnassa on sovellettu seuraavia perusteita:

— Vertailukemikaalien luettelo edustaa niitä ainetyyppejä, joiden ihoärsytyspotentiaalia yleensä testataan, ja kaikkia niitä vasteita, joita LLNA-menetelmällä voidaan mitata tai ennustaa.

— Aineiden kemiallinen rakenne on määritetty täsmällisesti.

— LLNA-menetelmän tiedot marsutesteistä (B.6; OECD:n testiohje 406) (13) ja mahdolliset tiedot ihmiskokeista ovat saatavilla kunkin aineen osalta.

— Aineet ovat helposti saatavilla kaupallisista lähteistä.

Suositellut vertailukemikaalit luetellaan taulukossa 1. Ehdotetuilla vertailukemikaaleilla tehtävät tutkimukset on arvioitava siinä kantaja-aineessa, joiden kanssa ne luetellaan taulukossa 1. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla, muita edellä mainitut valintaperusteet täyttäviä aineita voidaan käyttää asianmukaisin perusteluin.

▼M3

Taulukko 1

Suositellut vertailukemikaalit LLNA-menetelmän suoritusvaatimuksia varten

Numero	Kemikaalit (1)	CAS-nro	Olomuoto	K-aine (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Todellinen EC3-vaihteluväli	LLNA vs. M	LLNA vs. ihminen
1	5-Kloori-2-metyyli-4-isotiatsolin-3-oni (CMI) / 2-metyyli-4-isotiatsolin-3-oni (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Nest.	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	EL	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Kiint.	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-Fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiint.	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	Kobolttikloridi	7646-79-9	Kiint.	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenoli	97-54-1	Nest.	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-Merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiint.	DMF	1,7	1	0,85–3,4	EL	+/+	+/+
7	Sitraali	5392-40-5	Nest.	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Nest.	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	Eugenoli	97-53-0	Nest.	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	Fenyylibentsoaatti	93-99-2	Kiint.	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	Kanelialkoholi	104-54-1	Kiint.	AOO	21	1	10,5–42	EL	+/+	+/+
12	Imidatsolidinyyliurea	39236-46-9	Kiint.	DMF	24	1	12–48	EL	+/+	+/+
13	Metyylimetakrylaatti	80-62-6	Nest.	AOO	90	1	45–100	–	+/+	+/+
14	Klooribentseeni	108-90-7	Nest.	AOO	25	1	ES	ES	–/–	–/ (*)
15	Isopropanoli	67-63-0	Nest.	AOO	50	1	ES	ES	–/–	–/+

▼M3

Numero	Kemikaalit (1)	CAS-nro	Olomuoto	K-aine (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Todellinen EC3-vaihteluväli	LLNA vs. M	LLNA vs. ihminen
16	Maitohappo	50-21-5	Nest.	DMSO	25	1	ES	ES	–/–	–/ (*)
17	Metyylisalisylaatti	119-36-8	Nest.	AOO	20	9	ES	ES	–/–	–/–
18	Salisyylihappo	69-72-7	Kiint.	AOO	25	1	ES	ES	–/–	–/–
Valinnaiset aineet, joilla osoitetaan suorituskyvyn paraneminen LLNA-menetelmään verrattuna										
19	Natriumlauryylisulfaatti	151-21-3	Kiint.	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	Etyleeniglykolidimetakrylaatti	97-90-5	Nest.	MEK	28	1	14–56	EL	+/–	+/+
21	Ksyleeni	1330-20-7	Nest.	AOO	95,8	1	47,9–100	EL	+/ (**)	+/–
22	Nikkelikloridi	7718-54-9	Kiint.	DMSO	5	2	ES	ES	–/+	–/+

Lyhenteet: AOO = asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v); CAS-nro = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimetyyliformamidi; DMSO = dimetyylisulfoksidi; DNCB = 2,4-dinitroklooribentseeni; EC3 = arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi 3; M = marsutestin tulos (B.6 tai OECD:n testiohje 406) (12); HCA = heksyylikanelialdehydi; Nest. = neste; LLNA = hiirelle tehtävän paikallisen imusolmukemääritysmenetelmän tulos (B.42 tai OECD:n testiohje 429) (1); MEK = metyylietyyliketoni; ES = ei sovelleta, koska stimulaatioindeksi < 3; EL = ei laskettu, koska tiedot on saatu yhdestä tutkimuksesta; Kiint. = kiinteä; K-aine = testissä käytettävä kantaja-aine.

(*) Oletetaan, että ei aiheuta ihoherkistystä ihmisillä, koska kliinisten lapputestien tuloksia ei ole saatavilla, sitä ei ole sisällytetty lapputestipaketin allergeeniksi eikä ihmisten herkistymisestä ole saatavilla tapausselvityksiä.

(**) Marsutestien tietoja ei ole saatavilla.

(1) Kemikaalit on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

(2) Koska erilaiset kantaja-aineet voivat vaikuttaa LLNA-menetelmän suorituskykyyn, kullekin vertailukemikaalille suositeltua kantaja-ainetta on käytettävä (24) (32).

(3) Keskiarvo, jos saatavilla on useampi kuin yksi EC3-arvo. Negatiivisten aineiden (stimulaatioindeksi < 3) osalta esitetään suurin testattu konsentraatio.

(4) Niiden LLNA-tutkimusten määrä, joista tiedot on saatu.

(5) Kaupallisesti saatavilla Kathon CG:nä (CAS-nro 55965-84-9), joka on CMI:n ja MI:n seos (3:1). Kunkin osan suhteelliset konsentraatiot vaihtelevat välillä 1,1–1,25 % (CMI) ja 0,3–0,45 % (MI). Inaktiivisina osina ovat magnesiumsuolat (21,5–24 %) ja kuparinitraatti (0,15–0,17 %), ja muu osa valmisteesta (74–77 %) on vettä. Kathon CG on helposti saatavilla Sigma-Aldrich-yrityksen ja Rohm and Haas -yrityksen (nykyisin Dow Chemical Corporation) välityksellä.

▼M3

III. **Määritellyt luotettavuus- ja tarkkuusvaatimukset**

7. Samanlaisen tai mukautetun LLNA-menetelmän tarkkuuden on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin LLNA-suoritusvaatimuksissa määritelty tarkkuus, kun sitä arvioidaan käyttämällä 18:aa säädettyä vähimmäisvertailukemikaalia. Uudella tai mukautetulla menetelmällä on voitava suorittaa oikea luokittelu, joka perustuu kyllä/ei-päätökseen. Uudella tai mukautetulla menetelmällä ei kuitenkaan välttämättä voida luokitella asianmukaisesti kaikkia säädettyjä vähimmäisvertailukemikaaleja. Jos esimerkiksi yksi heikkoa herkistystä aiheuttavista aiheista luokitellaan väärin, vastaava suorituskyky voidaan osoittaa esittämällä virheellisen luokittelun perustelut ja muut tarvittavat tiedot (esimerkiksi testitulokset, joilla saadaan oikea sellaisten muiden aineiden luokittelu, joiden fyysiset, kemialliset ja herkistävät ominaisuudet vastaavat väärin luokitellun vertailukemikaalin ominaisuuksia). Tällaisessa tilanteessa uuden tai mukautetun LLNA-testimenetelmän validoinnin tila arvioidaan tapauskohtaisesti.

Laboratorionsisäinen uusittavuus

8. Laboratorionsisäisen uusittavuuden määrittämiseksi uutta tai mukautettua LLNA-menetelmää on arvioitava käyttämällä herkistävää ainetta, jonka ominaisuudet on LLNA-menetelmässä määritetty hyvin. Sen vuoksi LLNA-menetelmän suoritusvaatimukset perustuvat heksyylikanelialdehydillä (HCA) toistuvasti tehtyjen testien tulosten vaihteluun. Laboratorionsisäisen luotettavuuden arvioimiseksi HCA:n kynnyskonsentraatioarviot (ECt) on määritettävä neljässä eri testissä niin, että testit tehdään vähintään viikon välein. Laboratorionsisäinen uusittavuus hyväksytään, jos laboratorion kussakin HCA-testissä ECt:ksi saadaan 5–20 %, mikä vastaa LLNA-menetelmässä 0,5–2,0 kertaa HCA:lle määritettyä keskimääräistä EC3:a (10 %) (katso taulukko 1).

Laboratorioidenvälinen uusittavuus

9. Uuden tai mukautetun LLNA-menetelmän laboratorioidenvälistä uusittavuutta on arvioitava käyttämällä kahta herkistävää ainetta, joiden ominaisuudet on LLNA-menetelmässä määritetty hyvin. LLNA-menetelmän suoritusvaatimukset perustuvat HCA:lla ja 2,4-dinitroklooribentseenillä (DNCB) eri laboratorioissa tehtyjen testien tulosten vaihteluun. ECt on määritettävä riippumattomasti yhden sellaisen tutkimuksen perusteella, joka tehdään vähintään kolmessa eri laboratoriossa. Laboratorioidenvälinen uusittavuus hyväksytään, jos kussakin laboratoriossa ECt:ksi saadaan HCA-testissä 5–20 % ja DNCB-testissä 0,025–0,1 %, mikä vastaa LLNA-menetelmässä 0,5–2,0 kertaa HCA:lle määritettyä keskimääräistä EC3:a (10 %) ja DNCB:lle määritettyä EC3:a (0,05 %) (katso taulukko 1).

▼**M3**

Lisäys 2

Määritelmät

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus mittaa testimenetelmän suorituskykyä, ja se on yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (14).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana; ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavana olevalla ainetyypillä; iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) sopivuutta tukevia tietoja tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellun vasteen vaihteluvälillä.

Kynnyskonsentraatioarvio (ECt): Testiaineen arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi, joka osoittaa positiivisen vasteen.

Kynnyskonsentraatio-3 (EC3): Testiaineen arvioitu konsentraatio, jolla saadaan aikaan stimulaatioindeksi 3.

Väärä negatiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen.

Väärä positiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen.

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratorioidenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin erilaiset valtuutetut laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samoja testiaineita. Laboratorioidenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyssä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (14).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (14).

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testimenetelmälle, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmää. Tällainen menetelmä voitaisiin myös validoida. Tarkoittaa samaa kuin ”samanlainen” testimenetelmä (14).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation satunnaistetuista arvoista.

Suoritusvaatimukset: Validoituun testimenetelmään perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Suoritusvaatimuksiin sisältyvät i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailuaineiden vähimmäisluettelon avulla (14).

Yksinoikeudellinen testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka valmistamista ja jakelua rajoitetaan patenteilla, tekijänoikeuksilla, tavaramerkeillä ynnä muilla.

▼**M3**

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitomenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Vertailukemikaalit: Validointimenettelyyn valitut kemikaalit, joiden vasteet *in vitro* -vertailutestijärjestelmässä tai *in vivo* kyseisessä lajissa ovat tiedossa. Näiden kemikaalien on vastattava niitä kemikaaliluokkia, joiden yhteydessä kyseistä testimenetelmää todennäköisesti käytetään, ja niiden on edustettava kaikkia niitä vasteita, joita testimenetelmän kohteena olevilta kemikaaleilta voidaan odottaa (voimakkaista lieviin ja negatiivisiin). Validointimenettelyn eri vaiheita sekä eri testimenetelmiä ja testitarkoituksia varten voidaan vaatia erilaisia vertailukemikaaleja (14).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja aineen vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa kyseisen aineen biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (konkordanssi) (14).

Luotettavuus: Testimenetelmän uusittavuus samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pitkällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus (14).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samaan aikaan kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (14).

▼B

B.43. **NEUROTOKSISUUSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 424 (1997).

Tämän testimenetelmän tarkoituksena on tuottaa tiedot, joilla voidaan varmistaa kemikaalien mahdollinen neurotoksisuus täysikasvuisilla eläimillä tai kuvata se tarkemmin. Testi voidaan joko yhdistää toistuvan annostelun toksisuustutkimusten nykyisiin testimenetelmiin tai suorittaa erillisenä tutkimuksena. Tällä testimenetelmällä tehtävien tutkimusten suunnittelussa on suositeltavaa käyttää apuna OECD:n ohjeasiakirjaa neurotoksisuuden testistrategioista ja -menetelmistä (Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1)). Tämä on erityisen tärkeää suunniteltaessa muutoksia menetelmän rutiinikäyttöön suositeltuihin havaintoihin ja testin suoritukseen. Ohjeasiakirjan tarkoituksena on helpottaa muiden testien valintaa tiettyissä oloissa.

Tällä menetelmällä ei arvioida sikiönkehitykseen liittyvää neurotoksisuutta.

1.1 JOHDANTO

Arvioitaessa kemikaalien toksisia ominaisuuksia on tärkeää ottaa huomioon mahdolliset neurotoksiset vaikutukset. Toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden testimenetelmään sisältyy jo havaintojen tekoa mahdollisen neurotoksisuuden seulomiseksi. Tämän testimenetelmän avulla voidaan suunnitella tutkimus, jolla saadaan lisätietoja toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden tutkimuksissa havaituista neurotoksisista vaikutuksista tai varmistetaan nämä vaikutukset. Tiettyjen kemikaaliluokkien mahdollinen neurotoksisuus voi kuitenkin antaa viitteitä siitä, että niiden arviointi on tarkoituksenmukaisempaa tällä menetelmällä, kun mahdollista neurotoksisuutta ei ole aiemmin osoitettu toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden tutkimuksissa. Huomioon otettavia seikkoja ovat esimerkiksi

— havainnot hermostollisista oireista tai neuropatologisista vaurioista muissa toksisuustutkimuksissa kuin toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden tutkimuksissa tai

— rakenteellinen sukulaisuus tai muut tiedot, jotka yhdistävät kyseiset kemikaalit tunnettuihin neurotoksisiin aineisiin.

Tämän testimenetelmän käyttäminen voi olla tarkoituksenmukaista muissakin tapauksissa. Yksityiskohtaisempia tietoja viitteessä (1).

Menetelmä on kehitetty sellaiseksi, että se voidaan räätälöidä erityistarpeisiin, jotta voidaan varmistaa kemikaalin spesifinen histopatologinen ja käyttäytymiseen vaikuttava neurotoksisuus sekä kuvata neurotoksiset vasteet ja kvantifioida ne.

▼B

Aiemmin neurotoksisuus rinnastettiin neuropatiaan, johon liittyi neuropatologisia vaurioita tai hermoston toimintahäiriöitä kuten kohtauksia, halvaus tai vapinaa. Vaikka neuropatia onkin tärkeä neurotoksisuuden ilmenemismuoto, nykyään on selvää, että hermostoon kohdistuvaan toksisuuteen liittyy monia muitakin oireita (esimerkiksi motorisen koordinaation puute, aistitoiminnan vajaukset, oppimis- ja muistihäiriöt), jotka eivät ilmene neuropatiaan liittyvissä tai muun tyyppisissä tutkimuksissa.

Tämän neurotoksisuuden testimenetelmän tarkoituksena on saada selville tärkeimmät hermostoperäiset käyttäytymiseen kohdistuvat ja neuropatologiset vaikutukset täysikasvuisilla jyrsijöillä. Vaikka morfologisia muutoksia ei esiintyisi, vaikutukset käyttäytymiseen voivat ilmentää elimistöön kohdistuvaa haitallista vaikutusta. Kaikki käyttäytymismuutokset eivät kuitenkaan ole nimenomaan hermostoperäisiä. Siksi kaikkia havaittuja muutoksia on arvioitava vastaavien histopatologisten, hematologisten tai biokemiallisten sekä muun tyyppiseen systeemiseen toksisuuteen liittyvien tietojen perusteella. Tässä menetelmässä neurotoksisten vasteiden kuvaamiseksi ja kvantifioimiseksi tehtäviin testeihin kuuluu erityisiä histopatologisia ja käyttäytymiseen liittyviä testejä. Niiden lisätukena voidaan käyttää sähköfysiologisia ja/tai biokemiallisia tutkimuksia (1)(2)(3)(4).

Neurotoksiset aineet voivat vaikuttaa monin tavoin useisiin kohteisiin hermostossa. Koska yhdelläkään koesarjalla ei voida täysin arvioida kaikkien aineiden mahdollista neurotoksisuutta, saatetaan tarvita muita *in vivo* tai *in vitro* -testejä, jotka on erityisesti tarkoitettu havaitun tai ennakoidun neurotoksisuustyypin tutkimiseen.

Soveltamalla yhdessä neurotoksisuuden testistrategioita ja -menetelmiä koskevan OECD:n ohjeasiakirjan (1) ohjeita ja tätä testimenetelmää voidaan myös suunnitella tutkimuksia, joiden tarkoituksena on kuvata tarkemmin annosvasteen kvantifiointia ja lisätä sen herkkyyttä. Näin voidaan paremmin arvioida haitaton vaikutustaso (no-observed-adverse effect level, NOAEL) tai osoittaa kemikaalin tiedetyt tai epäillyt haittavaikutukset. Voidaan esimerkiksi suunnitella tutkimuksia, joilla tunnistetaan ja arvioidaan neurotoksisuusmekanismeja tai täydennetään tietoja, joita on jo saatu käyttämällä tavanomaisia hermostoperäisiin käyttäytymisoireisiin kohdistuvia ja neuropatologisia havainnointimenetelmiä. Tällaisissa tutkimuksissa ei tarvitse yrittää hankkia tietoja, jotka saataisiin jo tässä menetelmässä suositelluilla tavanomaisilla kokeilla, mikäli nämä tiedot ovat jo saatavilla eikä niitä pidetä välttämättöminä tutkimustulosten tulkinnan kannalta.

Käytettäessä tätä neurotoksisuustutkimusta yksin tai yhdessä jonkin muun tutkimuksen kanssa saadaan tietoja, joiden avulla voidaan

— todeta, onko testattu kemikaali vahingoittanut hermostoa pysyvästi, vai ovatko vauriot palautuvia

— kuvata kemikaalialtistumiseen liittyviä hermostonmuutoksia ja ymmärtää niiden taustalla olevia mekanismeja

▼B

— määritellä annos-vaste- ja aika-vaste-suhteet haitattoman vaikutustason arvioimiseksi (jota voidaan käyttää kemikaalin turvallisuuskriteerien määrittelemisessä).

Tässä testimenetelmässä testiaine annostellaan suun kautta. Muut antotiet (esimerkiksi ihon kautta tai inhalaationa) voivat olla sopivampia ja edellyttää suorituksen yksityiskohtien muuttamista. Antotavan valintaan vaikuttavat ihmisen altistusominaisuudet ja saatavilla olevat toksikologiset tai kineettiset tiedot.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Haittavaikutus: sellainen käsittelyyn liittyvä poikkeama perustasosta, joka vähentää organismin kykyä pysyä hengissä, lisääntyä tai sopeutua ympäristöön.

Annos: annettavan testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painoyksikköinä (g, mg) tai testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esimerkiksi mg/kg) tai vakiopitoisuuksina ravinnossa (ppm).

Annostus: yleistermi, joka käsittää annoksen, annostusvälit ja annostelun keston.

Neurotoksisuus: kemikaalille tai biologiselle tai fysikaaliselle aineelle altistumisesta aiheutuva haitallinen muutos hermoston rakenteessa tai toiminnassa.

Neurotoksinen aine: kemikaali tai biologinen tai fysikaalinen aine, joka voi aiheuttaa neurotoksisuutta.

NOAEL: (lyhenne sanoista no-observed-adverse effect level). Korkein annostaso, jolla ei havaita käsittelyyn liittyviä haitallisia löydöksiä.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa kemikaalia annostellaan suun kautta erilaisina annoksina useille koe-eläinryhmille, jotka ovat laboratoriokokeissa käytettäviä jyrsijöitä. Tavallisesti käytetään toistuvaa annostusta. Annosteluohjelma voi kestää 28 päivää, 90 päivää (subkrooninen) tai yhden vuoden tai pidempään (krooninen). Tässä testimenetelmässä esitettyjä menettelyjä voidaan käyttää myös akuutin neurotoksisuuden tutkimuksessa. Eläimiä testataan käyttäytymiseen ja/tai hermostoon liittyvien poikkeavuuksien selvittämiseksi tai niiden kuvaamiseksi. Jokaisen havainnointijakson aikana arvioidaan monentyyppisiä käyttäytymisilmiöitä, johon neurotoksiset aineet voivat vaikuttaa. Testin lopussa osalle eläimistä (kaikista ryhmistä, kummastakin sukupuolesta) tehdään perfuusio *in situ,* ja aivoista, selkäytimestä ja ääreishermostosta preparoidaan leikkeitä, jotka tutkitaan.

Kun tutkimus suoritetaan erillisenä tutkimuksena neurotoksisuuden seulomiseksi tai neurotoksisten vaikutusten kuvaamiseksi, voidaan kustakin ryhmästä ne eläimet, joita ei käytetä perfuusioon tai myöhempiin histopatologisiin tutkimuksiin (katso taulukko 1), käyttää erityisiin hermostoperäisiin käyttäytymisoireisiin liittyviin, neuropatologisiin, neurokemiallisiin tai sähköfysiologisiin tutkimuksiin. Näillä tutkimuksilla täydennetään tämän menetelmän perustutkimuksa (1). Täydentävät tutkimukset voivat olla erityisen hyödyllisiä, kun empiiriset havainnot tai ennakoidut vaikutukset osoittavat kemikaalin neurotoksisuuden olevan tietyn tyyppistä, tai että sillä on erityinen kohde. Vaihtoehtoisesti jäljelle jääneet eläimet voidaan käyttää arviointeihin, joita edellytetään jyrsijöillä tehtävien toistuvan annostelun toksisuustutkimusten tutkimusmenetelmissä.

▼B

Kun tämän testimenetelmän menettelyt yhdistetään muiden testimenetelmien menettelyihin, on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta molempien tutkimusten havainnointiin liittyvät vaatimukset voidaan täyttää.

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, tosin muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää, mikäli se on perusteltua. Testiin on käytettävä nuoria, täysikasvuisia ja terveitä eläimiä, jotka edustavat yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä kantavia. Annostelu aloitetaan yleensä mahdollisimman pian vieroituksen jälkeen, mieluiten eläinten ollessa kuuden viikon ikäisiä, ja joka tapauksessa ennen kuin ne ovat yhdeksän viikon ikäisiä. Kun tämä tutkimus yhdistetään muihin tutkimuksiin, ikävaatimusta saatetaan joutua mukauttamaan. Käytettyjen eläinten paino saa tutkimuksen alussa vaihdella korkeintaan + 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta. Kun lyhytaikaista toistuvan annostelun tutkimusta seuraa pitkäaikaistutkimus, on molemmissa tutkimuksissa käytettävä samasta kannasta ja samasta lähteestä olevia eläimiä.

1.4.2 **Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (+ 3 °C). Vaikka riittävät vaatimukset suhteellisen kosteuden suhteen ovat vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Pitäisi välttää äkkinäisiä kovia ääniä. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratoriorehua, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Rehun valintaan voi vaikuttaa se, miten testiaine voidaan sekoittaa rehuun tällä menetelmällä annosteltaessa. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä.

1.4.3 **Eläinten valmistelu**

Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Häkit tulee järjestää siten, että niiden sijoittamisesta mahdollisesti aiheutuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet merkitään yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

1.4.4 **Antotie ja annosten valmistelu**

Tutkimusmenetelmässä edellytetään nimenomaan testiaineen annostelua suun kautta. Suun kautta annostelu voi tapahtua letkuruokinnalla, rehun tai juomaveden mukana tai kapseleina. Muita antotapoja (esimerkiksi ihon kautta tai inhalaationa) voidaan käyttää, mutta suoritustapaa saatetaan joutua muuttamaan. Antotavan valintaan vaikuttavat ihmisen altistusominaisuudet sekä saatavilla olevat toksikologiset ja kineettiset tiedot. Antotien valintaperusteet sekä siitä tämän testimenetelmän suoritukseen aiheutuvat muutokset on ilmoitettava.

▼B

Testiaine liuotetaan tai suspensoidaan tarvittaessa sopivaan kantaja-aineeseen. Suositusten mukaan ensin tulee käyttää vesipohjaista liuosta/suspensiota, sitten öljypohjaista (esimerkiksi maissiöljy) liuosta/suspensiota ja vasta sitten mahdollisesti muuhun kantaja-aineeseen pohjautuvaa liuosta/suspensiota. Kantaja-aineen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Lisäksi on kiinnitettävä huomiota seuraaviin kantaja-aineen ominaisuuksiin: kantaja-aineen vaikutukset testiaineen imeytymiseen, jakautumiseen, metaboloitumiseen ja elimistössä säilymiseen. Edellä mainitut tekijät voivat vaikuttaa testiaineen toksisiin ominaisuuksiin. Lisäksi on otettava huomioon kantaja-aineen vaikutus eläinten ravinnon ja veden kulutukseen sekä niiden ravitsemustilaan.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Eläinten määrä ja sukupuoli**

Kun tutkimus suoritetaan erillisenä tutkimuksena, on kunkin annoksen testaamiseen sekä verrokkiryhmään, jolla arvioidaan yksityiskohtaisia kliinisiä ja toiminnallisia havaintoja, käytettävä vähintään 20 eläintä (10 naarasta ja 10 urosta). Ainakin viidelle urokselle ja viidelle naaraalle näistä kymmenestä uroksesta ja kymmenestä naaraasta on tehtävä perfuusio *in situ,* ja niitä on käytettävä yksityiskohtaisiin neurohistopatologisiin tutkimuksiin tutkimuksen lopussa. Silloin, kun tietystä annosryhmästä havainnoidaan vain muutamia eläimiä neurotoksisten vaikutusten osoittamiseksi, nämä eläimet olisi mahdollisesti otettava perfuusioon valittujen eläinten joukkoon. Kun tutkimus suoritetaan yhdessä toistuvan annostelun toksisuustutkimuksen kanssa, on käytettävä riittävästi eläimiä molempien tutkimusten tavoitteiden saavuttamiseksi. Taulukossa 1 on esitetty eläinten vähimmäismäärät ryhmää kohti useissa tutkimusyhdistelmissä. Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken tutkimuksen tai suunnitellaan toipuvista eläimistä koostuvia ryhmiä toksisten vaikutusten palautuvuuden, jatkuvuuden ja ilmenemisen viivästymisen havainnoimiseksi testin jälkeen tai harkitaan täydentävien havaintojen tekemistä, eläinten määrää on lisättävä. Näin varmistetaan, että saatavilla on tarvittava määrä eläimiä havainnointia ja histopatologisia tutkimuksia varten.

1.5.2 **Testiryhmä ja verrokkiryhmä**

Yleensä käytetään vähintään kolmea annosryhmää ja yhtä verrokkiryhmää. Jos vaikutuksia ei muiden tietojen arvioinnin perusteella ole odotettavissa toistetulla vuorokausiannoksella 1 000 mg/kg, voidaan tehdä raja-annostesti. Jos sopivia tietoja ei ole saatavilla, voidaan tehdä annosalueen haarukointitesti käytettävien annosten määrittämisen helpottamiseksi. Testiaineen annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testiaineen annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

1.5.3 **Luotettavuuden tarkistus**

Tutkimuksen suorittavan laboratorion on esitettävä tiedot, joista ilmenevät sen kyky suorittaa tutkimus sekä käytettyjen menetelmien herkkyys. Näistä tiedoista tulisi ilmetä kyky osoittaa ja kvantifioida muutokset päätepisteissä, joiden havainnointia suositellaan. Näitä ovat autonomiset oireet, aistien reaktiivisuus, tarttumaotteen voimakkuus ja motorinen aktiivisuus. Viitteissä 2–9 on tietoja eri tyyppisiä neurotoksisia vasteita aiheuttavista kemikaaleista, joita voidaan käyttää positiivisina kontrolliaineina. Aiemmin saatuja tietoja voidaan käyttää, jos koemenetelmien oleelliset osatekijät pysyvät ennallaan. Aiempien tietojen ajoittaista päivitystä suositellaan. Menetelmien herkkyyden säilymistä osoittavia uusia tietoja on tuotettava, kun testin suorittava laboratorio muuttaa jonkin testin toimenpiteiden suorittamisen kannalta olennaisen tekijän.

▼B

1.5.4 **Annoksen valinta**

Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki testattavasta yhdisteestä tai sen sukulaisaineista saatavilla olevat aiemmin saadut toksisuus- ja kinetiikkatiedot. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa neurotoksisia vaikutuksia tai selviä systeemisen toksisuuden vaikutuksia. Tämän jälkeen annostasot valitaan asteittain alenevasti mahdollisen annosvasteen osoittamiseksi ja haitattoman vaikutustason (NOAEL) osoittamiseksi alhaisimmalla annostasolla. Periaatteessa annostasot tulee määrätä siten, että ensisijaiset hermostoon kohdistuvat toksiset vaikutukset voidaan erottaa systeemiseen toksisuuteen liittyvistä vaikutuksista. Kaksi tai kolme eri suuruista annosta on yleensä ihanteellisin määrä, ja usein on suositeltavaa käyttää neljättä testiryhmää erittäin pitkien annosvälien sijaan (esimerkiksi kerroin yli 10). Jos ihmisen altistumisesta on olemassa järkevä arvio, se on otettava huomioon.

1.5.5 **Raja-annostesti**

Jos tutkimus yhdellä annostasolla (vähintään 1 000 mg/kg/vrk) ei tässä kuvatulla suoritustavalla aiheuta havaittavia neurotoksisia vaikutuksia ja jos toksisuus ei ole todennäköistä rakenteellisesti samanlaisista yhdisteistä saatujen tietojen perusteella, täydellinen tutkimus kolmella annostasolla ei välttämättä ole tarpeen. Odotettavissa olevan ihmisen altistuksen perusteella raja-annostestissä on mahdollisesti käytettävä korkeampaa annostasoa suun kautta annettuna. Muiden antotapojen kuten inhalaation tai ihoapplikaation osalta korkein saavutettavissa oleva altistumistaso määräytyy yleensä testiaineen fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella. Akuutin oraalisen tutkimuksen tekemiseksi raja-annostestin annoksen tulee olla vähintään 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Annostelu**

Eläimille annetaan testiainetta päivittäin seitsemänä päivänä viikossa vähintään 28 päivän ajan. Viisipäiväisen annosteluohjelman käyttö tai lyhyempi altistusaika on perusteltava. Letkuruokinnassa testiaine on annettava yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Kerralla annettavan nesteen enimmäismäärä riippuu koe-eläinten koosta. Määrä ei saa olla yli 1 ml sataa painogrammaa kohti. Vesiliuoksia voidaan kuitenkin antaa 2 ml:aan asti sataa painogrammaa kohti. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat korkeammilla pitoisuuksilla, testiainemäärän vaihtelu olisi minimoitava säätämällä pitoisuuksia vakiotilavuuden takaamiseksi kaikilla annostasoilla.

Jos aineita annetaan eläimille rehuun tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, etteivät testiainemäärät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Kun testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna, sen määrä mitataan joko vakiopitoisuutena rehussa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettuna vakioannostasona. Käytetty tapa pitää mainita. Jos testiaine annetaan letkulla, annos tulee antaa joka päivä samaan aikaan, ja annosta on mukautettava tarvittaessa siten, että annostaso pysyy samana eläimen painoon nähden. Kun toistuvan annostelun tutkimuksen jälkeen tehdään pitkäaikaistutkimus, eläimille on annettava samanlaista ravintoa molemmissa tutkimuksissa. Jos kerta-annos ei akuutissa tutkimuksessa ole mahdollinen, annos voidaan antaa pienemmissä osissa vuorokauden kuluessa.

▼B

1.6 HAVAINNOINTI

1.6.1 **Havainnoinnin ja testien määrä**

Toistuvan annostelun tutkimuksissa havainnointijakson tulee kattaa annostelujakso. Akuuteissa tutkimuksissa havaintoja on tehtävä käsittelyn jälkeen 14 päivän aikana. Satelliittiryhmien eläimiä, joita ei altisteta käsittelyn jälkeisen jakson aikana, on myös havainnoitava tällä jaksolla.

Havaintoja on tehtävä riittävän usein, jotta kaikki käyttäytymiseen liittyvät ja/tai hermostolliset poikkeavuudet voitaisiin havaita. Havainnot on mieluiten tehtävä samoihin aikoihin joka päivä ja ottaen huomioon, milloin odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten. Kliinisten havaintojen ja toiminnallisten kokeiden aikataulu (taajuus) on esitetty yhteenvetona taulukossa 2. Jos aikaisemmista tutkimuksista saadut kineettiset tai muut tiedot osoittavat, että havainnoinnin, testien tai havainnoinnin jälkeisten jaksojen ajankohtaa on muutettava, on laadittava uusi aikataulu tiedonsaannin maksimoimiseksi. Aikatauluun tehtävät muutokset on perusteltava.

1.6.1.1 *Havainnot yleisestä terveydentilasta ja kuolleisuudesta/sairastavuudesta*

Kaikkien eläinten terveydentilaa on havainnoitava tarkoin vähintään kerran päivässä, ja niiden sairastavuutta tai kuolleisuutta vähintään kahdesti päivässä.

1.6.1.2 *Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot*

Kaikista tätä tarkoitusta varten valituista eläimistä on tehtävä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja (katso taulukko 1) kerran ennen ensimmäistä altistuskertaa (samaa koe-eläintä koskevia vertailuja varten) ja eri väliajoin sen jälkeen tutkimuksen kestosta riippuen (katso taulukko 2). Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot toipuvien eläinten satelliittiryhmistä on tehtävä toipumisjakson lopussa. Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot on tehtävä eläimen oman häkin ulkopuolella vakioalueella. Havainnot on kirjattava tarkasti käyttämällä pisteytysjärjestelmiä, joihin sisältyvät kriteerit tai pisteytysasteikot jokaista havainnointiin kuuluvaa mittausta varten. Testilaboratorion on määriteltävä käytetyt kriteerit ja asteikot tarkasti. On pyrittävä varmistamaan, että testiolosuhteet (jotka eivät liity järjestelmällisesti käsittelyyn) vaihtelevat mahdollisimman vähän, ja että havainnoinnin suorittavat eläinten käsittelystä tietämättömät koulutetut havainnoijat.

On suositeltavaa, että havainnointi toteutetaan suunnitelmallisesti siten, että tarkoin määriteltyjä kriteereitä (mukaan lukien normaalit ”vaihtelun rajat”) sovelletaan järjestelmällisesti kuhunkin eläimeen jokaisen havainnointiajankohdan aikana. ”Normaalit vaihtelun rajat” on dokumentoitava tarkoituksenmukaisesti. Kaikki havaitut oireet on kirjattava. Myös havaittujen oireiden voimakkuus on kirjattava mahdollisuuksien mukaan. Kliinisiä havaintoja on tehtävä muun muassa ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, mahdollisten eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeavuudet hengityksessä ja/tai ilman haukkominen, kaikki virtsaamiseen tai ulostamiseen liittyvät epätavalliset oireet sekä virtsan värjäytyminen) muutoksista.

▼B

Myös kaikki kehon asentoon, aktiivisuustasoon (esimerkiksi vakioalueen vähentynyt tai lisääntynyt tutkiminen) ja liikekoordinaatioon liittyvät epätavalliset vasteet on kirjattava. Muutokset käynnissä (esimerkiksi vaappuminen ja ataksia), asennossa (esimerkiksi selän köyristäminen) ja käsittelyyn, paikkaan tai muihin ympäristön ärsykkeisiin liittyvässä reaktiivisuudessa sekä klooniset tai tooniset liikkeet, kouristukset tai vapina, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, epätavalliset pään liikkeet, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi pureminen tai ylenmääräinen nuoleminen, itsensä silpominen, takaperin käveleminen, ääntely) tai aggressiivisuus on kirjattava.

1.6.1.3 *Toiminnalliset kokeet*

Yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen tavoin myös toiminnallisia kokeita on tehtävä kerran ennen altistusta ja useasti sen jälkeen kaikilla tätä tarkoitusta varten valituilla eläimillä (katso taulukko 1). Myös toiminnallisten kokeiden lukumäärä riippuu tutkimuksen kestosta (katso taulukko 2). Taulukossa 2 esitettyjen havainnointijaksojen lisäksi toipuvien eläinten muodostamista satelliittiryhmistä on tehtävä toiminnallisia havaintoja mahdollisimman lähellä eläinten lopettamisajankohtaa. Toiminnallisissa kokeissa testataan aistien reaktiivisuutta erilaisille ärsykkeille (esimerkiksi kuulo, näkö ja asentotunto (5)(6)(7)), arvioidaan tarttumaotteen voimakkuutta (S) ja motorista toimintaa (9). Motorista toimintaa on mitattava automaattilaitteella, jolla voidaan selvittää sekä toiminnan väheneminen että lisääntyminen. Jos käytetään jotakin muuta määriteltyä järjestelmää, sen on oltava kvantitatiivinen, ja sen herkkyys ja luotettavuus on osoitettava. Kaikki laitteet on testattava sen varmistamiseksi, että laitteet ovat luotettavia koko tutkimuksen ajan ja ja antavat toistettavia tuloksia. Lisätietoja sopivista suoritustavoista on esitetty viitteissä. Jos ei ole saatavissa tietoja, jotka viittaisivat mahdollisiin neurotoksisiin vaikutuksiin (esimerkiksi rakenne-aktiivisuus-tiedot, epidemiologiset tiedot, muut toksikologiset tutkimukset), on harkittava aistitoiminnan ja motorisen toiminnan sekä oppimisen ja muistin testaamiseen erityistestien tekemistä mahdollisten vaikutusten tutkimiseksi tarkemmin. Lisätietoja erityistesteistä ja niiden käytöstä on esitetty viitteessä (1).

Eläimet, joissa ilmenee toksisuuden oireita siinä määrin, että se häiritsisi merkittävästi toiminnallisten kokeiden suorittamista, voidaan poistaa kyseisestä kokeesta. Eläinten poistaminen toiminnallisesta kokeesta on perusteltava.

1.6.2 **Ruumiinpaino ja ravinnon/veden kulutus**

Korkeintaan 90 päivää kestävissä tutkimuksissa eläimet on punnittava vähintään kerran viikossa, ja ravinnon kulutus (veden kulutus, jos testiaine annetaan veteen sekoitettuna) on mitattava vähintään viikoittain. Pitkäaikaistutkimuksissa kaikki eläimet on punnittava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran neljässä viikossa. Ravinnon kulutus (veden kulutus, jos testiaine annetaan veteen sekoitettuna) on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen noin kolmen kuukauden välein, elleivät muutokset terveydentilassa tai ruumiinpainossa muuta edellytä.

▼B

1.6.3 **Silmätutkimukset**

Yli 28 päivää kestävissä tutkimuksissa on tehtävä silmätutkimus oftalmoskoopilla tai vastaavalla sopivalla välineellä ennen testiaineen annostelua ja tutkimuksen päättyessä mieluiten kaikille eläimille, mutta ainakin korkean annostason ryhmän ja verrokkiryhmän eläimille. Jos silmistä löydetään muutoksia tai jos se on kliinisten oireiden vuoksi tarpeen, kaikki eläimet on tutkittava. Pitkäaikaistutkimuksissa silmätutkimus on tehtävä myös 13. viikolla. Silmätutkimuksia ei tarvitse tehdä, jos tiedot ovat jo saatavissa muista saman pituisista ja samalla annostasolla tehdyistä tutkimuksista.

1.6.4 **Hematologia ja kliininen biokemia**

Kun neurotoksisuustutkimus tehdään toistuvan annostelun systeemisen toksisuuden tutkimuksen yhteydessä, verikokeet ja kliiniset biokemialliset määritykset on tehtävä systeemisen toksisuuden tutkimusmenetelmässä esitetyllä tavalla. Näytteiden kerääminen on tehtävä siten, että mahdolliset vaikutukset hermostoperäiseen käyttäytymiseen minimoidaan.

1.6.5 **Histopatologia**

Neuropatologinen tutkimus on suunniteltava täydentämään ja laajentamaan tutkimuksen *in vivo* -vaiheen aikana tehtyjä havaintoja. Näytteet vähintään viiden eläimen kudoksista sukupuolta ja ryhmää kohti (katso taulukko 1 ja seuraava kappale) on kiinnitettävä *in situ* käyttämällä yleisesti hyväksyttyjä perfuusio- ja kiinnitystekniikoita (katso viite 3, luku 5 ja viite 4, luku 50). Kaikki havaittavat suuret muutokset on kirjattava. Kun tutkimus suoritetaan yksittäisenä neurotoksisuuden seulontatutkimuksena tai neurotoksisten vaikutusten kuvaamiseksi, jäljelle jääneet eläimet voidaan käyttää joko erityisiin hermostoperäiseen käyttäytymiseen liittyviin (10) (11), neuropatologisiin (10) (11) (12) (13), neurokemiallisiin (10) (11) (14) (15) tai sähköfysiologisiin (10) (11) (16) (17) tutkimuksiin, jotka voivat täydentää tässä kuvattuja toimenpiteitä ja tutkimuksia. Nämä eläimet voidaan myös käyttää histopatologisiin tutkimuksiin. Täydentävät toimenpiteet ovat erityisen hyödyllisiä, kun empiiriset havainnot tai odotetut vaikutukset viittaavat tietyn tyyppiseen tai tiettyyn kohteeseen vaikuttavaan neurotoksisuuteen (2) (3). Vaihtoehtoisesti jäljelle jääneet eläimet voidaan käyttää toistuvan annostelun testimenetelmässä kuvattuihin tavanomaisiin patologisiin arviointeihin.

Kaikki parafiiniin valetut kudosnäytteet on värjättävä yleisellä värjäysmenetelmällä kuten hematoksyliini-eosiini-menetelmällä (H&E), ja ne on tutkittava mikroskooppisesti. Jos havaitaan tai epäillään merkkejä ääreishermoston neuropatiasta, on tutkittava muoviin valettuja ääreishermoston kudosnäytteitä. Myös kliiniset oireet voivat antaa aihetta uusien kohteiden tutkimiseen tai erityisten värjäysmenetelmien käyttämiseen. Viitteissä (3) ja (4) on annettu ohjeita lisätutkimuksen kohteista. Myös sopivat erikoisvärit voivat olla hyödyllisiä tietyn tyyppisten patologisten muutosten osoittamiseksi (18).

▼B

Keskus- ja ääreishermostosta otettuja edustavia leikkeitä on tutkittava histologisesti (katso viite 3, luku 5 ja viite 4, luku 50). Yleensä on tutkittava seuraavat alueet: etuaivot, isojen aivojen keskiosa mukaan luettuna aivoturson läpi menevä leike, keskiaivot, pikkuaivot, aivosilta, ydinjatke, silmä näköhermo ja verkkokalvo mukaan luettuna, selkäydin kaularangan ja lannerangan kohdalta, takajuuren hermosolmu, taka- ja etujuuren hermosäikeet, proksimaalinen lonkkahermo, proksimaalinen säärihermo (polven kohdalta) ja säärihermon puoleiset pohjelihaksen haarat. Selkäytimestä ja ääreishermostosta on tehtävä sekä poikittais- että pitkittäisleikkeet. Hermoston verisuonistoon on kiinnitettävä huomiota. Lisäksi on tutkittava luurankolihaksesta, erityisesti pohjelihaksesta otettu näyte. Erityistä huomiota on kiinnitettävä keskus- ja ääreishermoston alueisiin, joiden solu- ja säierakenteeseen sekä -tyyppiin neurotoksisen aineen tiedetään vaikuttavan erityisen haitallisesti.

Viitteissä (3) ja (4) on annettu ohjeita neuropatologisista muutoksista, joita toksisille aineille altistuminen yleisesti aiheuttaa. Kudosnäytteet on suositeltavaa tutkia vaiheittain siten, että korkean annostason ryhmästä otettuja leikkeitä verrataan aluksi verrokkiryhmästä otettuihin leikkeisiin. Jos näiden ryhmien näytteissä ei havaita neuropatologisia muutoksia, myöhempää analyysia ei tarvita. Jos korkean annoksen ryhmässä havaitaan neuropatologisia muutoksia, on keskisuuren ja pienen annoksen ryhmän kustakin mahdollisesti vahingoittuneesta kudoksesta otettava näytteet, jotka on koodattava ja tutkittava järjestyksessä.

Jos kvalitatiivisessa tutkimuksessa löydetään näyttöä neuropatologisista muutoksista, on tehtävä lisätutkimus niille hermoston alueille, joissa näitä muutoksia esiintyy. Kaikkien annosryhmien mahdollisesti vahingoittuneista alueista on otettava leikkeitä, jotka on koodattava ja tutkittava satunnaisotannalla niiden koodia tietämättä. Kaikkien vaurioiden määrä ja vaikeusaste on kirjattava. Kun kaikki alueet kaikista annosryhmistä on arvioitu, voidaan koodi paljastaa ja tehdä tilastollinen analyysi annosvasteiden suhteen arvioimiseksi. Kunkin vaurion eri vaikeusasteista on kuvailtava esimerkkejä.

Neuropatologiset löydökset on arvioitava yhdessä käyttäytymiseen liittyvien havaintojen ja mittausten sekä muista testiaineella tehdyistä edeltävistä ja samanaikaisista systeemisen toksisuuden tutkimuksista saatujen tietojen kanssa.

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tulokset. Kaikki tulokset tulee esittää myös yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin testi- ja verrokkiryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä kokeen alussa, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä sekä niiden kuolinajankohta, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen toksisten vaikutusten kuvaus mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto, tyyppi ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten määrä mukaan lukien vaurioiden tyyppi ja vaikeusaste.

▼B

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Tutkimuksessa on arvioitava hermostoperäiseen käyttäytymiseen kohdistuvien ja neuropatologisten vaikutusten esiintyvyys, vaikeusaste ja korrelaatio (myös neurokemialliset tai sähköfysiologiset vaikutukset, jos on tehty täydentäviä tutkimuksia) sekä muut havaitut haittavaikutukset. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 LOPPURAPORTTI

Loppuraportissa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto (isomeria, puhtausaste ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet mukaan luettuina)

— tunnistetiedot.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji- ja kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— lähde, yllöpito-olosuhteet, totuttamisvaihe, ravinto jne.,

— kunkin eläimen paino kokeen alussa.

Koeolosuhteet:

— yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/rehuvalmisteesta, valmisteessa olleesta pitoisuudesta, valmisteen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— annosteltujen annosten erittely, mukaan luettuna yksityiskohtaiset tiedot kantaja-aineesta ja annostellun aineen määrästä ja fysikaalisesta muodosta

— yksityiskohtaiset tiedot testiaineen annostelusta

— annostasojen valintaperusteet

— altistustavan ja altistuksen keston valintaperusteet

— rehussa/juomavedessä olevan testiaineen määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

Havainnointi ja testausmenetelmät:

— yksityiskohtaiset tiedot kunkin ryhmän eläinten jakamisesta alaryhmiin perfuusiota varten

— yksityiskohtaiset tiedot pisteytysjärjestelmistä, mukaan luettuna valintaperusteet ja kunkin mittauksen pisteytysasteikot yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen yhteydessä

▼B

— yksityiskohtaiset tiedot toiminnallisista kokeista, joissa testataan aistien reaktiivisuutta erilaisille ärsykkeille (esimerkiksi kuulo, näkö ja asentotunto), arvioidaan tarttumaotteen voimakkuutta ja motorista aktiivisuutta (mukaan luettuna yksityiskohtaiset tiedot aktiivisuuden tutkimiseksi käytettävistä automaattilaitteista) sekä muista käytetyistä menetelmistä

— yksityiskohtaiset tiedot silmätutkimuksista sekä tarvittaessa verikokeista ja kliinisistä biokemiallisista kokeista ja niihin liittyvistä lähtötasoarvoista

— yksityiskohtaiset tiedot erityisistä hermostoperäiseen käyttäytymiseen liittyvistä, neuropatologisista, neurokemiallisista ja sähköfysiologisista menetelmistä.

Tulokset:

— ruumiinpaino/ruumiinpainon muutokset mukaan lukien ruumiinpaino lopetettaessa

— ravinnon ja veden kulutus tarvittaessa

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, toksisuusoireet tai kuolleisuus mukaan lukien

— yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (alkamishetki ja jatkokehitys) palautuvuudesta riippumatta

— yksityiskohtainen kuvaus kaikkien toiminnallisten kokeiden tuloksista

— ruumiinavauslöydökset

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista hermostoperäiseen käyttäytymiseen liittyvistä, neuropatologisista ja neurokemiallisista tai sähköfysiologisista löydöksistä, mikäli saatavissa

— tiedot imeytymisestä ja metaboliasta, mikäli saatavissa

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten tarkastelu:

— annos-vaste-tulokset

— muiden toksisten vaikutusten yhteys testatun kemikaalin mahdollisesta neurotoksisuudesta tehtyihin johtopäätöksiin

— haitaton vaikutustaso (NOAEL).

Johtopäätökset:

— erityistä lausuntoa testatun kemikaalin yleisestä neurotoksisuudesta suositellaan.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, valmisteilla.

2. Test Guidline for a Developmental Neurotoxicitu Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Valmisteilla.

3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999–1003.

6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691–704.

7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267–283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233–236.

9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for NeurotoxicologicalAssessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599–609.

10. Tilson, H.A., and Mitchell, CL. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689–695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343–352.

14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445–452.

15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368–378.

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299–335.

17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, pp. 726–742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Taulukko 1

Eläinten vähimmäismäärä ryhmää kohti kun neurotoksisuustutkimus tehdään erikseen tai muiden tutkimusten yhteydessä

	NEUROTOKSISUUSTUTKIMUKSEN TYYPPI:			
	Erillinen tutkimus	28-päiväisen tutkimuksen yhteydessä	90-päiväisen tutkimuksen yhteydessä	Kroonisen toksisuustutkimuksen yhteydessä
Eläinten kokonaismäärä ryhmää kohti	10 urosta ja 10 naarasta	10 urosta ja 10 naarasta	15 urosta ja 15 naarasta	25 urosta ja 25 naarasta
Toiminnallisiin kokeisiin ja yksityiskohtaiseen kliiniseen havainnointiin valittujen eläinten lukumäärä	10 urosta ja 10 naarasta	10 urosta ja 10 naarasta	10 urosta ja 10 naarasta	10 urosta ja 10 naarasta
In situ -perfuusioon ja neurohistopatologisiin tutkimuksiin valittujen eläinten lukumäärä	5 urosta ja 5 naarasta	5 urosta ja 5 naarasta	5 urosta ja 5 naarasta	5 urosta ja 5 naarasta
Toistuvan annostelun/subkroonisen/kroo-nisen toksisuuden havainnointiin, hematologian, kliinisen biokemian ja histopatologian kokeisiin jne. valittujen eläinten lukumäärä vastaavien *ohjeasiakirjojen* mukaisesti		5 urosta ja 5 naarasta	10 urosta † ja 10 naarasta †	20 urosta † ja 20 naarasta †
Täydentävät havainnot tarvittaessa	5 urosta ja 5 naarasta			

† Tähän ryhmään kuuluu viisi eläintä, jotka on valittu toiminnallisiin kokeisiin ja yksityiskohtaiseen kliiniseen havainnointiin osana neurotoksisuustutkimusta

▼B

Taulukko 2

Kliinisten havaintojen ja toiminnallisten kokeiden taajuus

Havaintotyyppi		Tutkimuksen kesto			
		Akuutti	28-päiväinen	90-päiväinen	Krooninen
Kaikille eläimille	Yleinen terveydentila	päivittäin	päivittäin	päivittäin	päivittäin
	Kuolleisuus/sairas- tavuus	kahdesti päivässä	kahdesti päivässä	kahdesti päivässä	kahdesti päivässä
Toiminnallisiin havaintoihin valituille eläimille	Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — 8 tunnin kuluessa annostelusta ajankohtana, jolloin vaikutuksia on arvioitu esiintyvän eniten — 7. ja 14. päivänä annostelun jälkeen	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — sen jälkeen viikoittain	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kerran ensimmäisen tai toisen altistusviikon aikana — sen jälkeen kuukausittain r	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kerran ensimmäisen altistuskuukauden lopussa — sen jälkeen joka kolmas kuukausi
	Toiminnalliset kokeet	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — 8 tunnin kuluessa annostelusta ajankohtana, jolloin vaikutuksia on arvioitu esiintyvän eniten — 7. ja 14. päivänä annostelun jälkeen	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kokeen neljännen viikon aikana mahdollisimman lähellä altistamisen päättymistä	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kerran ensimmäisen tai toisen altistusviikon aikana — sen jälkeen kuukausittain	— ennen ensimmäistä altistuskertaa — kerran ensimmäisen altistuskuukauden — sen jälkeen joka kolmas kuukausi

▼B

B.44. **IHON KAUTTA IMEYTYMINEN: *IN VIVO* -MENETELMÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 427 (2004)

1.1 JOHDANTO

Altistuminen tapahtuu monille kemikaaleille *ihon kautta.* Suurimmassa osassa laboratorioelämillä tehtävistä toksikologista kokeista käytetään kuitenkin suun kautta annostelua. Tässä testiohjeessa esitelty *in vivo* -ihoabsorptiotesti mahdollistaa ekstrapoloinnin suuannostelua käyttävien kokeiden tulosaineiston perusteella, kun arvioidaan kemikaalien turvallisuutta ihoaltistuksen jälkeen.

Aineen on läpäistävä runsaasti ihon solukerroksia ennen kuin se päätyy verenkiertoon. Nopeuden kannalta ratkaiseva kerros on useimpien aineiden osalta marraskesi, joka koostuu kuolleista soluista. Aineen pääsy ihon läpi riippuu sen rasvaliukoisuudesta ja orvaskeden ulomman kerroksen paksuudesta sekä myös esimerkiksi molekyylipainosta ja aineen pitoisuudesta. Rottien ja kanien iho on yleensä läpäisevämpi kuin ihmisten, kun taas marsujen ja apinoiden ihon läpäisevyys vastaa enemmän ihmisen ihon läpäisevyyttä.

Menetelmät, joilla mitataan ihon kautta imeytymistä, voidaan jakaa kahteen luokkaan: *in vivo* -menetelmiin ja *in vitro* -menetelmiin. *In vivo* -menetelmällä voidaan saada luotettavaa tietoa useilla koe-eläinlajeilla. Sittemmin on kehitetty *in vitro* -menetelmiä. Niissä tutkitaan testiaineen kulkeutumista ihmisestä tai eläimestä otetun ohennetun ihonäytteen tai kokoihonäytteen läpi nesteisiin. *In vitro* -menetelmä kuvataan erillisessä testiohjeessa (1). OECD:n asiakirjasta ”Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies” (2) on apua valittaessa sopivinta menetelmää kulloiseenkin erityistilanteeseen. Teos tarjoaa lisätietoa sekä *in vivo* -menetelmien että *in vitro* -menetelmien soveltuvuudesta.

Tässä testiohjeessa kuvatulla *in vivo* -menetelmällä määritetään testiaineen penetraatio ihon läpi verenkiertoon. Menetelmä on ollut laajassa käytössä useiden vuosien ajan (3) (4) (5) (6) (7). Vaikka *in vitro* -ihoabsorptiotestit voivat monissa tapauksissa olla sopivia, on tilanteita, joissa vain *in vivo* -kokeella saadaan tarvittavat tiedot.

In vivo -menetelmän etuna on, että siinä käytetään fysiologisesti ja metabolisesti ehyttä järjestelmää sekä useille myrkyllisyystesteille yhteistä lajia. Lisäksi *in vivo* -menetelmää voidaan mukauttaa siten, että siinä voidaan käyttää myös muita lajeja. Haittana on, että siinä käytetään eläviä eläimiä ja radioaktiivia merkkiaineita, jotta taattaisiin tulosten luotettavuus. *In vivo* -testissä on myös vaikea määrittää varhainen imeytymisvaihe. Lisäksi testiä varten suositeltavan koe-eläimen (rotan) ja ihmisen ihon läpäisevyysominaisuudet poikkeavat toisistaan. Eläimen iho on yleensä läpäisevämpi, minkä vuoksi eläimillä tehdyissä kokeissa voidaan yliarvioida ihmisen ihoabsorptio (6) (8) (9). Syövyttäviä emäksiä tai muita syövyttäviä aineita ei pitäisi testata elävillä elämillä.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT

Imeytymätön annos: se testiaineen määrä, joka pestään iholta altistuksen jälkeen ja joka on jäänyt ei-okklusiivisen suojan pinnalle, mukaan lukien se testiaineen määrä, jonka voidaan osoittaa haihtuneen iholta altistuksen aikana

Imeytynyt annos *(in vivo)* se testiaineen määrä, joka on virtsassa, koe-eläinhäkin pesuvedessä, ulosteessa, uloshengitysilmassa (jos mitattu), veressä, kudoksissa (jos kerätty) sekä eläimen ruumiissa sen jälkeen, kun aplikointialueen iho on poistettu.

Mahdollisesti imeytyvä annos: se testiaineen määrä, joka on iholla tai ihossa sen jälkeen, kun iho on pesty.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine, joka suositellaan leimattavaksi radioaktiivisella merkkiaineella, aplikoidaan eläinten iholle, jolta on leikattu karvat. Testiaine annostellaan yleisesti käytössä olevan valmisteen muodossa, ja annostelussa käytetään yhtä tai useampaa sopivaa annostasoa. Testiaineen annetaan olla kosketuksissa ihon kanssa tietyn ajan sopivan suojan alla (ei-okklusiivinen, puoliokklusiivinen tai okklusiivinen), jotta eläin ei voi niellä testiainetta. Altistusajan lopussa suoja poistetaan ja iho puhdistetaan sopivalla puhdistusaineella. Suoja ja puhdistuksessa käytetyt materiaalit kerätään talteen analyysiä varten, ja ihon päälle pannaan uusi suoja. Eläimet ovat ennen altistusta, altistuksen aikana ja altistuksen jälkeen kukin erillisessä aineenvaihduntahäkissä, jossa eritteet ja uloshengitysilma kerätään koko ajalta talteen analyysiä varten. Uloshengitysilman kerääminen ei ole välttämätöntä, jos on riittävää näyttöä siitä, että haihtuvia radioaktiivisia metaboliitteja muodostuu vain vähän tai ei lainkaan. Kussakin tutkimuksessa käytetään normaalisti useita eläinryhmiä, jotka altistetaan testiaineelle. Yksi ryhmä lopetetaan altistusajan lopussa. Muut ryhmät lopetetaan määräaikavälein sen jälkeen (2). Näytteenottoajan lopussa lopetetaan jäljellä olevat eläimet, veri kerätään talteen analyysiä varten, altistusalueen iho poistetaan analyysiä varten ja tutkitaan, onko eläimen kehossa erittymätöntä materiaalia. Näytteistä tehdään määritykset sopivin menetelmin ja ihoabsorption aste arvioidaan (6) (8) (9).

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Koe-eläinten valinta**

Yleisimmin käytetty laji on rotta, mutta voidaan käyttää myös muita karvattomia kantoja ja lajeja, joiden ihoabsorption nopeus vastaa enemmän ihmisen ihon abosorptionopeutta (3) (6) (7) (8) (9). Testissä pitäisi käyttää nuoria täysikasvuisia elämiä, jotka ovat samaa sukupuolta (oletusarvoisesti uroksia) ja peräisin yleisesti käytetyistä laboratoriokannoista. Testin alussa koe-eläinten paino saa vaihdella enintään ± 20 % keskipainosta. Esimerkiksi 200–250 g painavat urosrotat ovat sopivia (erityisesti painoasteikon yläosassa).

▼B

1.4.2 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Kunkin testiaineen ja kunkin lopetusajankohdan osalta on käytettävä vähintään neljä samaa sukupuolta edustavan eläimen ryhmää. Kukin eläinryhmä lopetetaan eri ajankohtina, esimerkiksi altistusajan lopussa (tyypillisesti 6 tai 24 tuntia) ja sen jälkeen määräajankohtina (esim. 48 ja 72 tunnin kuluttua). Jos on näyttöä merkittävistä eroista uros- ja naarasyksilöiden ihomyrkyllisyydessä, on valittava herkempi sukupuoli. Jos tällaista näyttöä ei ole, voidaan valita kumpi tahansa sukupuoli.

1.4.3 **Häkit ja ruokinta**

Koe-eläinhuoneen lämpötilan on oltava 22 °C (± 3 °C). Suhteellisen kosteuden on oltava vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen siivouksen aikana. Suhteellinen kosteus pitäisi kuitenkin pyrkiä pitämään välillä 50–60 %. Valolähteenä on keinovalo, jaksoittaisuus 12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeyttä. Ravintona voidaan käyttää tavanomaista laboratoriorehua, jota pitäisi olla jatkuvasti eläinten saatavilla samoin kuin juomavettä. Testin ja mielellään myös laboratorio-olosuhteisiin totutuksen aikana eläimet ovat aineenvaihduntahäkeissä (yksi kussakin). Koska ruoan ja veden läikkyminen vaikuttaisi tuloksiin, sen todennäköisyys on minimoitava.

1.4.4 **Eläinten preparointi**

Eläimet merkitään, jotta ne voidaan tunnistaa yksilökohtaisesti, ja pidetään häkeissä vähintään viisi päivää ennen testin alkua, jotta ne voidaan totuttaa laboratorio-olosuhteisiin.

Totutusajan lopussa ja noin 24 tuntia ennen testiaineen annostelua kultakin eläimeltä leikataan karvat osalta hartioiden ja selän alueen ihoa. Vahingoittuneen ihon läpäisevyysominaisuudet poikkeavat ehyen ihon läpäisevyysominaisuuksista, minkä vuoksi on vältettävä ihon raapiintuminen tai hiertyminen. Karvojen leikkaamisen jälkeen ja noin 24 tuntia ennen testiaineen aplikointia (ks. kohta 1.4.7) ihonäytteen pinta pyyhitään asetonilla talin poistamiseksi. Muuta pesua saippualla ja vedellä ei suositella, koska saippuajäämät voivat edistää testiaineen imeytymistä. Pinta-alan on oltava tarpeeksi suuri (mielellään aikakin 10 cm^2), jotta voidaan luotettavasti määrittää testikemikaalin imeytynyt määrä ihoneliösenttimetriä kohti. Kymmenen neliösentimetrin näyte saadaan rotista, joiden paino on 200–250 g. Preparoinnin jälkeen eläimet pannaan takaisin aineenvaihduntahäkkeihin.

1.4.5 **Testiaine**

Testiaine on aine, jonka penetraatio-ominaisuuksia testissä tutkitaan. Testiaine suositellaan leimattavaksi radioaktiivisella merkkiaineella.

1.4.6 **Testin valmistelu**

Testiainevalmisteen (esim. testiaineen sisältävä laimentamaton tai laimennettu materiaali tai formulaatio, joka aplikoidaan iholle) on oltava sama kuin valmiste, jolle ihmiset tai muut kohdelajit voivat altistua, tai kyseisen valmisteen realistinen korvike. Käytössä olevasta valmisteesta poikkeaminen on perusteltava. Tarvittaessa testiaine on liuotettava tai suspendoitava sopivaan kantaja-aineeseen. Jos kantaja-aineena käytetään muuta kuin vettä, sen imeytymisominaisuudet ja mahdollinen reagointi testiaineen kanssa on tunnettava.

▼B

1.4.7 **Aplikointi iholle**

Ihon pinnalle määritetään aplikointialue (tietty pinta-ala). Tunnettu määrä testiainetta aplikoidaan tasaisesti tälle alueelle. Määrän olisi jäljiteltävä altistumista ihmisissä, minkä vuoksi se on tyypillisesti 1–5 mg/cm^2, kun testiaine on kiinteä, ja enintään 10 µl/cm^2, kun testiaine on nestemäinen. Jos käytetään muuta määrää, tämä pitäisi perustella ennakoiduilla käyttöolosuhteilla, tutkimuksen tavoitteilla ja testiaineen fysikaalisilla ominaisuuksilla. Aplikoinnin jälkeen on estettävä se, että eläin puhdistaa alueen. Kuvassa 1 on esimerkki tyypillisestä laitteesta. Tavallisesti aplikointialue peitetään ei-okklusiivisella suojalla (esim. läpäisevällä nailonharsolla). Jos on kyse rajoittamattomasta annoksesta, aplikointialue on peitettävä okklusiivisella suojalla. Jos puolihaihtuvien testiaineiden haihtuminen vähentää testiaineen saantonopeutta liikaa (ks. myös kohta 1.4.10, ensimmäinen alakohta), haihtunut aine on kerättävä laitteen peittävään hiilisuodattimeen (ks. kuva 1). On tärkeää huolehtia siitä, että mikään väline ei vahingoita ihoa eikä absorboi testiainetta tai reagoi sen kanssa. Eläimet palautetaan aineenvaihduntahäkkeihin eritteiden keräämiseksi.

1.4.8 **Altistus- ja näytteenottoaika**

Altistusaika on aika, joka kuluu testiaineen aplikoinnista sen poistamiseen (ihon pesemiseen). Altistusaika (tyypillisesti 6 tai 24 tuntia) valitaan sen mukaan, mikä on ennakoitu altistusaika ihmisissä. Altistusajan jälkeen eläimiä pidetään aineenvaihduntahäkeissä niiden lopettamisajankohtaan asti. Koko testin ajan on tarkistettava määrävälein, onko eläimissä merkkejä toksisuudesta tai esiintyykö epänormaaleja reaktioita. Altistusajan lopussa on tarkistettava, onko käsitellyssä ihossa näkyviä merkkejä ärsytyksestä.

Aineenvaihduntahäkkien on oltava sellaisia, että virtsa ja ulosteet voidaan kerätä kumpikin erikseen koko testin ajan. Lisäksi ^{14}C-hiilidioksidi ja haihtuvat ^{14}C-hiiliyhdisteet on voitava kerätä. Nämä on analysoitava, jos niiden määrä on > 5 %. Virtsa, ulosteet ja haihtuvien aineiden keräämiseen tarkoitettu neste (esim. ^{14}C-hiilidioksidi ja haihtuvat ^{14}C-yhdisteet) on kerättävä kukin erikseen kustakin ryhmästä kunakin näytteenottoajankohtana. Jos on riittävää näyttöä, että haihtuvia radioaktiivisia metaboliitteja muodostuu vain vähän tai ei lainkaan, voidaan käyttää avoimia häkkejä.

Eritteet kerätään altistuaikana 24 tunnin ajalta ensimmäisen ihokontaktin jälkeen ja tämän jälkeen päivittäin testin loppuun asti. Yleensä riittää, että eritteet kerätään kolme kertaa, mutta testiaineen ennakoidun käyttötarkoituksen tai käytettävissä olevien kineettisten tietojen perusteella ajankohtia voidaan lisätä tai niitä voidaan muuttaa.

Altistusajan lopussa suoja poistetaan kustakin eläimestä ja pannaan talteen erillistä analyysiä varten. Kaikkien eläinten käsitelty iho pestään vähintään kolme kertaa puhdistusaineella käyttäen sopivia tuppoja. Muiden ruumiinosien kontaminoituminen on huolellisesti vältettävä. Puhdistusaineen pitäisi olla normaalien hygieniakäytäntöjen mukainen (esim. vesi-saippualiuos). Lopuksi iho kuivataan. Kaikki tupot ja pesuvedet pannaan talteen analyysiä varten. Ennen eläinten siirtämistä häkkeihin asetetaan paikalleen uusi suoja suojaamaan käsiteltyä aluetta niissä eläimissä, joiden ryhmät lopetetaan vasta myöhemmin.

▼B

1.4.9 **Lopetus**

Kunkin ryhmän eläimet lopetetaan määräajankohtana ja veri kerätään talteen analyysiä varten. Suoja tai peite poistetaan analyysiä varten. Aplikointialueen iho ja vastaava alue ihoa, jolta on leikattu karvat mutta jota ei ole altistettu testiaineelle, poistetaan kustakin eläimestä erillistä analyysiä varten. Aplikointialueen iho voidaan jaottaa erottamalla marraskesi sen alla olevasta orvaskedestä, jotta saataisiin tarkemmat tiedot testikemikaalin jakautumisesta. Tämän jakautumisen määrittäminen tietyltä ajalta altistusajan jälkeen tarjoaa tietoa siitä, miten testikemikaali läpäisee marraskeden. Ihon jaotuksen helpottamiseksi (ihon viimeisen pesun ja eläimen lopettamisen jälkeen) kukin suoja poistetaan. Aplikointialue (ja rengasmainen alue ympäröivää ihoa) leikataan rotasta ja kiinnitetään levylle. Pala teippiä painetaan varovasti ihon pinnalle ja irrotetaan sitten niin että osa marraskettä tulee mukaan. Menettely toistetaan uusilla teipinpaloilla, kunnes teippi ei enää kiinnity ihon pintaan (kun koko marraskesi on poistettu). Kunkin eläimen kaikki teipinpalat pannaan samaan astiaan, johon lisätään liuotinta, joka pystyy liuottamaan marraskeden täydellisesti. Mahdolliset kohdekudokset voidaan poistaa erillistä analyysiä varten ennen kuin jäljellä olevan eläimen ruumis analysoidaan (ruumiiseen imeytynyt annos). Yksittäiset eläinten ruumiit pannaan talteen analyysiä varten. Yleensä riittää kokonaissisällön analyysi. Kohde-elimet voidaan kuitenkin ottaa erilleen erillistä analyysiä varten (jos muut tutkimukset antavat tähän aihetta). Virtsarakossa eläinten lopettamishetkellä oleva virtsa lisätään aikaisemmin kerättyyn virtsamäärään. Kun aineenvaihduntahäkeistä on kerätty eritteet eläinten lopettamisen yhteydessä, häkit ja niiden keräyslaitteet pestään sopivalla liuottimella. Myös muut mahdollisesti kontaminoituneet välineet on analysoitava.

1.4.10 **Analyysi**

Kaikissa kokeissa on päästävä riittävään saantoon (keskiarvon on oltava 100 ± 10 % radioaktiivisuudesta). Poikkeamat tästä on perusteltava. Kussakin näytteessä oleva määrä analysoidaan asianmukaisesti validoiduilla menetelmillä.

Kunkin aplikoinnin osalta on määritettävä rinnakkaisnäytteiden hajonta.

2. **TULOKSET**

Kunkin eläimen osalta on tehtävä testikemikaalista ja/tai metaboliiteista kunakin näytteenottoajankohtana seuraavat mittaukset. Yksittäisten tulosten lisäksi on ilmoitettava kootut tulokset näytteenottoajankohdittain keskiarvoina.

— suojan pinnalle jäänyt määrä,

— määrä, joka voidaan irrottaa iholta,

— ihossa tai iholla oleva määrä, jota ei voida pestä siitä,

▼B

— näytteenä otetussa veressä oleva määrä,

— eritteissä ja uloshengitysilmassa oleva määrä (jos määritetty),

— kuolleen eläimen ruumiissa ja erillistä analyysiä varten poistetuissa elimissä oleva määrä.

Eritteissä, uloshengitysilmassa, veressä ja kuolleen eläimen kehossa olevan testiaineen ja/tai metaboliittien määrän perusteella voidaan määrittää kunakin ajankohtana imeytynyt kokonaismäärä. Lisäksi voidaan laskea altistusaikana imeytynyt testikemikaalin määrä ihoneliösenttimetriä kohti.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on esitettävä, miten testiohjeessa asetetut vaatimukset on täytetty (mm. käytetyn testijärjestelmän perustelut). Siinä on oltava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— tunnistetiedot (esim. CAS-numero, jos se tiedetään; toimituslähde; puhtaus (radiokemiallinen puhtaus); tunnetut epäpuhtaudet; erän numero),

— fysikaalinen muoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esim. pH, haihtuvuus, liukoisuus, stabiilius, molekyylipaino ja log P_{ow}).

Testiainevalmiste:

— formulaatio ja käytön perustelut,

— valmiste, aplikoitu annos, aineen pitoisuus valmisteessa, kantaja-aine, stabiilius ja homogeenisyys.

Koe-eläin:

— käytetty laji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— eläinten hankintapaikka, häkit, rehut jne.,

— yksittäisten eläinten paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

— testiaineen annostelu (aplikointialue, määritysmenetelmät, okkluusio vai ei, volyymi, uutto, osoitusmenetelmä),

— ravinnon ja veden laatu.

Tulokset:

— mahdolliset merkit toksisuudesta,

— absorptiotulokset taulukkomuodossa (imeytymisnopeutena sekä määränä tai prosenttiosuutena).

▼B

— testin kokonaissaannot,

— tulosten tulkinta, vertailu mahdollisiin käytettävissä oleviin tietoihin, jotka koskevat testiyhdisteen imeytymistä ihon läpi.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829–835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

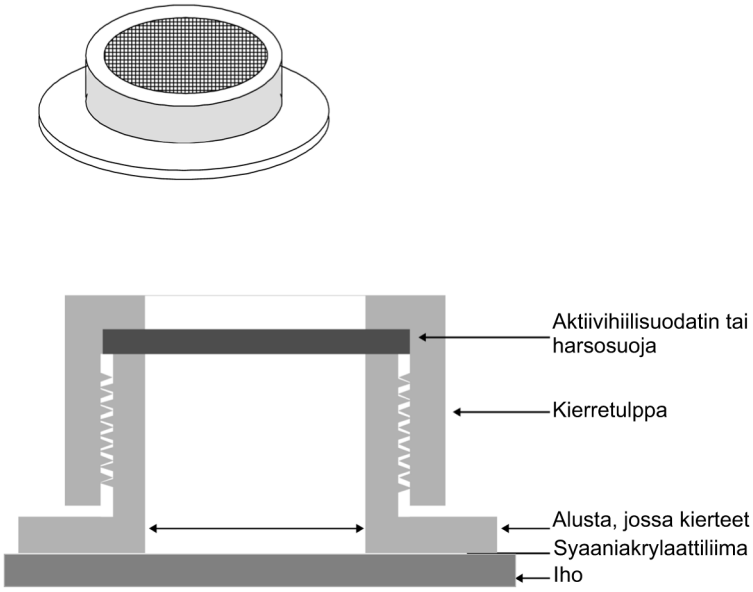
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. *Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

Kuva 1

Esimerkki tyypillisestä laitteesta, jota käytetään suojaamaan aplikointialue *in vivo* -ihoabsorptiotestissä



▼B

B.45. **IHON KAUTTA IMEYTYMINEN: *IN VITRO* -MENETELMÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 428 (2004)

1.1. JOHDANTO

Tämän testimenetelmän tarkoituksena on tarjota tietoa poisleikatulle ihonäytteelle aplikoidun testiaineen imeytymisestä. Se voidaan suorittaa yhdessä testimenetelmän ”Ihon kautta imeytyminen: *In vivo* -menetelmä” (1) kanssa tai erikseen. Tähän testimenetelmään perustuvien kokeiden suunnittelussa suositellaan käytettäväksi apuna OECD:n asiakirjaa ”Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies” (2). OECD:n asiakirjasta on apua valittaessa sopivaa *in vitro*-menetelmää erityisolosuhteisiin, jotta voidaan varmistaa testimenetelmällä saatavien tulosten luotettavuus.

Menetelmät, joilla määritetään aineen imeytymistä ja vapautumista elimistöön ihon kautta, voidaan jakaa kahteen luokkaan: *in vivo* -menetelmiin ja *in vitro* -menetelmiin. Ihoabsorption *in vivo* -määritysmenetelmät ovat vakiintuneita ja tarjoavat farmakokineettistä tietoa useiden eri eläinlajien osalta. *In vivo* -menetelmä kuvataan erillisessä testiohjeessa (1). Myös *in vitro* -menetelmiä on käytetty useiden vuosien ajan ihoabsorption määrittämiseen. Vaikka tämän testiohjeen kattamista *in vitro* -menetelmistä ei ole tehty virallisia validointitutkimuksia, OECD:n asiantuntijat katsoivat vuonna 1999, että *in vitro* -menetelmän tueksi oli riittävä määrä eveluoituja tutkimustuloksia (3). OECD:n asiakirjassa annetaan tämän tueksi lisätietoja (mm. runsaasti *in vitro* -menetelmien ja *in vivo* -menetelmien suoraa vertailutietoa) (2). Aiheesta on tehty useita erityisteoksia, jotka tarjoavat yksityiskohtaista taustatietoja *in vitro* -menetelmän käytön tueksi (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). *In vitro* -menetelmillä mitataan kemikaalien diffundoitumista ihoon ja ihon läpi nesteisiin. Niissä voidaan käyttää ei-elävää ihoa, kun määritetään vain diffundoituminen, tai tuoretta aineenvaihdunnallisesti aktiivia ihoa, jos määritetään samalla sekä diffundoituminen että ihon aineenvaihdunta. Näille menetelmille on erityistä käyttöä luokiteltaessa erityyppisiä kemikaaleja sen mukaan, miten ne voidaan vapauttaa erilaisista formulaatioista ihoon tai ihon läpi. Ne ovat myös hyödyllisiä malleja arvioitaessa ihon läpi imeytymistä ihmisissä.

In vitro -menetelmää ei voida soveltaa kaikissa tilanteissa eikä kaikkiin kemikaaleihin. *In vitro* -testimenetelmää voi olla mahdollista soveltaa ihopenetraation alustavaan laadulliseen arviointiin. Joissain tapauksissa tämä voi vaatia tuekseen *in vivo* -testejä. OECD:n asiakirja (2) antaa lisätietoja tilanteista, joihin *in vitro* -menetelmä soveltuu. Muuta lisätietoa päätöksen tueksi: kirjallisuusviite (3).

Tässä testiohjeessa esitetään yleiset periaatteet testiaineen ihoabsorption määrittämiseksi käyttämällä ihopalaa näytteenä. Siinä voidaan käyttää useiden nisäkäslajien (myös ihmisen) ihoa. Ihon läpäisevyysominaisuudet säilyvät sen jälkeen, kun iho on leikattu kehosta, koska diffundoitumisen pääasiallinen este on ihon kuollut pintakerros eli marraskesi; kemikaalien aktiivista kuljetusta ihon läpi ei ole voitu todeta. Ihon on todettu kykenevän metabolisoimaan joitakin kemikaaleja imeytymisen aikana (6), mutta tämä ei rajoita varsinaisen annoksen imeytymisnopeutta. Se voi kuitenkin vaikuttaa verenkiertoon pääsevän aineen luonteeseen.

▼B

1.2. MÄÄRITELMÄT

Imeytymätön annos: se testiaineen määrä, joka pestään iholta altistuksen jälkeen ja joka on jäänyt ei-okklusiivisen suojan pinnalle, mukaan lukien se testiaineen määrä, jonka voidaan osoittaa haihtuneen iholta altistuksen aikana

Imeytynyt annos *(in vitro):* se testiaineen määrä, joka päätyy vastaanottonesteeseen tai verenkiertoon tietyn ajan kuluessa

Mahdollisesti imeytyvä annos *(in vitro):* se testiaineen määrä, joka on iholla tai ihossa sen jälkeen, kun iho on pesty.

1.3. TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine, joka voi olla radioaktiivisella merkkiaineella leimattu, aplikoidaan diffuusiokammion eri osastojen väliin asetetun ihonäytteen pinnalle. Kemikaalia pidetään iholla tietyn ajan tietyissä olosuhteissa, minkä jälkeen se poistetaan sopivalla puhdistusmenetelmällä. Vastaanottonesteestä otetaan koko testin ajan määräajankohdin näytteet sen tarkistamiseksi, onko vastaanottonesteessä testikemikaalia ja/tai sen metaboliitteja.

Käytettäessä aineenvaihdunnallisesti aktiiveja järjestelmiä testikemikaalin metaboliitit voidaan analysoida sopivin menetelmin. Testin lopussa testikemikaalin ja (tapauksesta riippuen) sen metaboliittien jakautuminen kvantifioidaan.

Testiaineen imeytyminen tietyn ajan kuluessa määritetään analysoimalla vastaanottoneste ja käsitelty iho. Vaadittavat olosuhteet kuvataan tässä testiohjeessa ja OECD:n asiakirjassa (2). Ihossa edelleen oleva testiaine on katsottava imeytyneeksi, ellei voida osoittaa, että imeytyminen voidaan määrittää vain vastaanottonestettä analysoimalla. Analysoimalla muut testijärjestelmän komponentit (iholta pesty materiaali ja ihokerroksissa edelleen oleva materiaali) voidaan saada lisätietoja, joiden perusteella voidaan määrittää muun muassa testiaineen eri komponentteihin jakautuminen ja saantoprosentti (kokonaismäärät).

Jotta voidaan osoittaa testijärjestelmän suorituskyky ja luotettavuus laboratoriossa, käytettävissä on oltava sopivilla vertailukemikaaleilla hankitut tulokset, joiden on oltava sopusoinnussa käytettyä menetelmää koskevan julkaistun kirjallisuuden kanssa. Tämä vaatimus voidaan täyttää testaamalla sopiva vertailuaine (mielellään testiainetta muistuttava rasvaliukoinen aine) samanaikaisesti testiaineen kanssa tai tarjoamalla riittävät aiemmat tiedot useista vertailuaineista, joiden rasvaliukoisuus poikkeaa toisistaan (esim. kafeiini, bentsoehappo ja testosteroni).

1.4. TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Diffuusiokammio**

Diffuusiokammio muodostuu lähettäjä- ja vastaanotto-osastosta, joiden väliin ihonäyte asetetaan (tyypillinen diffuusiokammio esitetään kuvassa 1). Ihopalan reunat on kiinnitettävä tiiviisti kammioon, ja kammion pitäisi mahdollistaa helppo näytteidenotto. Ihonäytteen alapinnan kanssa kosketuksissa olevan vastaanottoliuoksen pitäisi voida sekoittua hyvin. Diffuusiokammion ja sen sisällön lämpötilan on oltava säädettävissä. Sekä staattista että läpivirtausjärjestelmää käyttäviä diffuusiokammioita voidaan käyttää. Tavallisesti lähettäjäosastossa ei käytetä okkluusiota, kun ihonäytettä altistetaan rajalliselle määrälle testiainetta. Lähettäjäosastossa voidaan kuitenkin käyttää okkluusiota, jos altistusannosta ei ole rajoitettu, sekä myös tietyissä rajallisilla annoksilla tehtävissä kokeissa.

▼B

1.4.2. **Vastaanottoneste**

Fysiologisesti yhteensopivan vastaanottoliuoksen käyttö on suositeltavaa, mutta myös muunlaisia vastaanottoliuksia voidaan käyttää, kunhan tämä perustellaan. Vastaanottonesteen tarkka koostumus on ilmoitettava. On osoitettava, että testikemikaalilla on riittävä liukenevuus vastaanottonesteessä, jotta tämä ei toimi esteenä imeytymiselle. Lisäksi vastaanottoneste ei saa vaikuttaa ihonäytteen funktionaaliseen eheyteen. Läpivirtausjärjestelmässä virtausnopeus ei saa haitata testiaineen diffundoitumista vastaanottonesteeseen. Staattisessa kammiojärjestelmässä nestettä on jatkuvasti sekoitettava ja siitä on otettava näytteitä säännöllisesti. Jos tutkitaan metaboliaa, ihonäytteen on pysyttävä elävänä koko testin ajan.

1.4.3 **Ihonäytteet**

Testissä käytetään ihmisestä tai eläimestä otettua ihoa. Ihmisihon käyttöön on sovellettava kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä käytäntöjä ja ehtoja. On suositeltavaa käyttää elävää ihoa, mutta myös kuollutta ihoa voidaan käyttää, kunhan osoitetaan ihon funktionaalinen eheys. Hyväksyttäviä ovat joko (entsyymi, lämpö- tai kemiallisilla menetelmillä erotetut) orvaskesikalvot tai ihohöylällä (dermatomilla) irrotetut ohennetut ihonäytteet (split thickness skin) (paksuus tyypillisesti 200–400 μm). Myös kokoihonäytteitä (full thickness skin) voidaan käyttää, mutta liiallista ihonäytteen paksuutta (n. > 1 mm) pitäisi välttää, ellei sitä erityisesti edellytetä testikemikaalin määrittämiseksi ihokerroksissa. Laji, anatominen näytteenottopaikka ja käytetty menetelmä on perusteltava. Hyväksyttävät testitulokset tarvitaan vähintään neljästä rinnakkaisesta näytteestä testiä kohti.

1.4.4 **Ihonäytteen eheys**

On tärkeää, että ihonäyte valmistetaan oikein. Epäasianmukainen käsittely voi vahingoittaa marraskettä, minkä vuoksi ihonäytteen eheys on varmistettava. Jos tutkimuskohteena on ihon metabolia, vastaleikattu ihonäyte pitäisi käyttää testissä mahdollisimman pian ja olosuhteissa, joiden tiedetään tukevan metabolista toimintaa. Yleissääntönä on, että vastaleikattu iho käytetään 24 tunnin kuluessa, mutta hyväksyttävä varastointiaika voi vaihdella riippuen aineenvaihduntaan osallistuvasta entsyymijärjestelmästä ja varastointilämpötilasta (13). Jos ihonäytteet on varastoitu ennen käyttöä, on osoitettava, että ihon läpäisyä estävät ominaisuudet ovat testiajankohtana ennallaan.

1.4.5 **Testiaine**

Testiaine on aine, jonka penetraatio-ominaisuuksia testissä tutkitaan. Testiaine suositellaan leimattavaksi radioaktiivisella merkkiaineella.

1.4.6 **Testin valmistelu**

Testiainevalmisteen (esim. testiaineen sisältävä laimentamaton tai laimennettu materiaali tai formulaatio, joka aplikoidaan iholle) olisi mielellään oltava sama kuin valmiste, jolle ihmiset tai muut kohdelajit voivat altistua, tai kyseisen valmisteen realistinen korvike. Käytössä olevasta valmisteesta poikkeaminen on perusteltava.

▼B

1.4.7 **Testiaineen pitoisuudet ja formulaatiot**

Normaalisti käytetään useampaa kuin yhtä testiaineen pitoisuutta siten, että pitoisuudet kattavat potentiaalisen altistuksen yläpään arvot (ihmisissä). Samoin on harkittava useiden tyypillisten formulaatioiden testaamista.

1.4.8 **Aplikointi iholle**

Ihmisen altistuessa kemikaaleille annokset ovat normaalioloissa rajallisia. Siksi altistumista jäljittelevässä annostelussa testiainetta aplikoidaan iholle tavallisesti 1-5 mg/cm^2, kun testiaine on kiinteä, ja enintään 10 $\mu l/cm^2$, kun testiaine on nestemäinen. Aplikoitavan määrän perusteluina ovat ennakoidut käyttöolosuhteet, tutkimuksen tavoitteet ja testivalmisteen fysikaaliset ominaisuudet. Esimerkiksi testiaineen aplikointi voi olla rajoittamatonta tapauksissa, joissa valmistetta aplikoidaan suuria määriä pinta-alayksikköä kohti.

1.4.9 **Lämpötila**

Lämpötila vaikuttaa kemikaalien passiiviseen diffuusioon (ja näin ollen niiden imeytymiseen ihon läpi). Diffuusiokammion ja ihonäytteen lämpötila on pidettävä vakiona lähellä ihon normaalilämpötilaa 32 ± 1 °C. Erilaiset diffuusiokammiot edellyttävät erilaisia vesihauteen ja blokkikuumentimen lämpötiloja, jotta varmistetaan, että vastaanottofaasi tai ihonäyte on fysiologisessa vakiotilassaan. Suhteellisen kosteuden arvoksi suositellaan 30–70 %.

1.4.10 **Altistusaika ja näytteenotto**

Ihoa voidaan altistaa testiaineelle koko testin ajan tai lyhyempiä aikoja (esim. jonkin tietyntyyppisen altistuksen jäljittelemiseksi). Iholta pestään ylimääräinen testiaine sopivalla puhdistusaineella, ja huuhteluvesi kerätään talteen analyysiä varten. Menetelmä, jolla testiaine poistetaan, riippuu ennakoiduista käyttöolosuhteista, ja se on perusteltava. Näytteenottoaika on tavallisesti 24 tuntia, jotta absorptioprofiili voitaisiin karakterisoida riittävästi. Koska ihon eheys voi alkaa heikentyä 24 tunnin kuluttua, näytteenottoaika ei tavallisesti saisi ylittää 24 tuntia. Jotkin aineet edellyttävät pitempää näytteenottoaikaa (24 tuntia), mutta nopeasti imeytyville se ei ehkä ole tarpeen. Vastaanottonesteestä on otettava näytteitä tarpeeksi tiheästi, jotta testiaineen absorptioprofiili voidaan esittää graafisesti.

1.4.11 **Loppumenettelyt**

Kaikki testijärjestelmän komponentit on analysoitava ja saanto määritettävä. Komponetteihin kuuluvat lähettäjäosasto, ihonäytteen pinnan huuhteluvesi, ihonäyte ja vastaanottoneste/osasto. Joissain tapauksissa iho voidaan erillistä analyysiä varten jaottaa ihon altistuneeseen osaan, kammion reunan alla olevaan osaan, marrasketeen, orvasketeen ja verinahkaan.

1.4.11 **Analyysi**

Kaikissa kokeissa on saavutettava riittävä saanto (keskiarvon on oltava 100 ± 10 % radioaktiivisuudesta; poikkeaminen tästä on perusteltava). Vastaanottonesteessä, ihonäytteessä sekä ihon pinnan ja laitteiden huuhteluvedessä oleva testiaine on analysoita sopivalla menetelmällä.

▼B

2. **TULOKSET**

Tuloksina esitetään vastaanottonesteen analyysi, testiaineen jakauma testijärjestelmässä ja absorptioprofiili ajan funktiona. Kun aplikoitu annos on rajallinen, iholta pesty määrä, ihossa (ihon eri kerroksissa, jos analysoitu erikseen) ja vastaanottonesteessä oleva määrä (imeytymisnopeus sekä määrä tai prosenttiosuus aplikoidusta annoksesta) on määritettävä. Ihon läpi imeytyminen voidaan joskus ilmaista käyttämällä pelkästään vastaanottonesteen analyysistä saatuja tuloksia. Jos testiainetta on kuitenkin edelleen ihossa testin lopussa, se saattaa olla tarpeen sisällyttää imeytyneeseen kokonaismäärään (ks. kirjallisuusviite [3], kohta 66). Jos on käytetty rajoittamatonta annosta, testitulosten perusteella voi olla mahdollista määrittää läpäisyvakio (K_p). Viimeksi mainitussa tapauksessa imeytymisprosentti ei ole merkityksellinen.

3. **RAPORTOINTI**

3.1. TESTISELOSTE

Testiselosteessa on esitettävä, miten testiohjeessa asetetut vaatimukset on täytetty (mm. käytetyn testijärjestelmän perustelut). Siinä on oltava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (ainakin molekyylipaino ja log P_{ow}), puhtaus (radiokemiallinen puhtaus)

— tunnistetiedot (esim. erän numero)

— liukoisuus vastaanottonesteeseen.

Testiainevalmiste:

— formulaatio ja käytön perustelut

— homogeenisyys.

Koeolosuhteet:

— ihonäytteen lähde ja anatominen näytteenottopaikka, käytetty valmistusmenetelmä, varastointiolosuhteet ennen käyttöä, mahdollinen esikäsittely (puhdistus, antibioottikäsittely jne.), ihon funktionaalisen eheyden määritys, metabolinen tila, käytön perustelut

— diffuusiokammion tyyppi, vastaanottonesteen koostumus, vastaanottonesteen virtausnopeus tai näytteenottoajat ja -menettelyt

— testiaineen aplikointimenetelmä ja aplikoidun annoksen määrän määrittäminen

— altistusaika

— miten testiaine poistetaan iholta (esim. ihon huuhtelu)

— ihonäytteen analyysimenetelmä ja mahdolliset jaotustekniikat, joita käytettiin jakautumisen määrittämiseksi ihossa

▼B

— diffuusiokammion ja muiden laitteiden pesumenetelmät

— määritysmenetelmät, uuttomenetelmät, detektiorajat ja analyysimenetelmän validointi.

Tulokset:

— kokonaissaanto (aplikoitu annos = ihon huuhteluvesi + ihonäyte + vastaanottoneste + diffuusiokammion huuhteluvesi)

— yksittäisten diffuusiokammioiden saannot kunkin osaston osalta (taulukkomuodossa)

— absorptioprofiili

— absorptiotiedot taulukkomuodossa (imeytymisnopeutena sekä määränä tai prosenttiosuutena).

Tulosten pohdinta.

Päätelmät.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237–241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications* CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191–205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et* al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

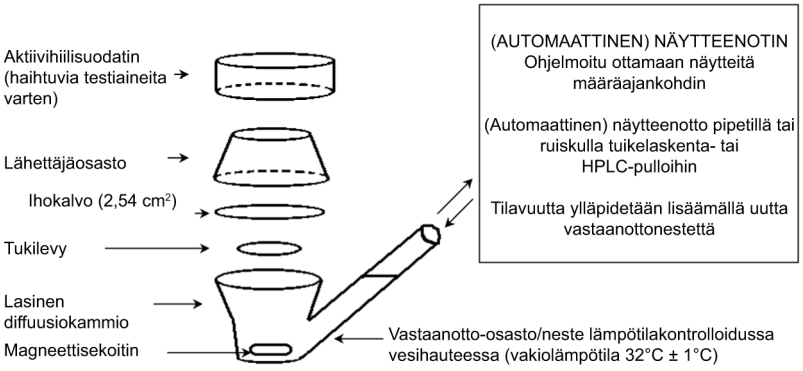
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Kuva 1

Esimerkki tyypillisestä in vitro -ihoabsorptiotestissä käytettävästä staattisesta diffuusiokammiosta



▼M8

B.46. *IN VITRO* -IHOÄRSYTTÄVYYS: REKONSTRUOIDUN IHMISORVASKEDEN TESTIMENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 439 (2015). Ihoärsytyksellä tarkoitetaan korjautuvan ihovaurion syntymistä enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen [kuten on määritelty Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmässä (Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemicals)] (1) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa Euroopan unionin asetuksessa (EU) 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]). Tässä testimenetelmässä selostetaan *in vitro* -menettely, jolla voidaan määrittää ärsyttävien kemikaalien (aineiden ja seosten) vaarallisuus YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 2 mukaisesti (2). Alueilla, joilla ei ole hyväksytty YK:n GHS-järjestelmän valinnaista luokkaa 3 (lievästi ärsyttävät aineet), tätä testimenetelmää voidaan käyttää myös luokittelemattomien kemikaalien määrittämiseen. Sovellettavan sääntelykehyksen ja luokitusjärjestelmän mukaan tämän testimenetelmän avulla voidaan määrittää kemikaalien ihoärsyttävyys joko yksittäisenä korvaavana testinä *in vivo* -ihoärsytystestauksen sijasta tai osittaisena korvaavana testinä tietyssä testausstrategiassa (3).

2. Ihoärsyttävyyden arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä [testimenetelmä B.4, vastaa OECD:n testiohjetta 404, joka hyväksyttiin ensimmäisen kerran vuonna 1981 ja jota on tarkistettu vuosina 1992, 2002 ja 2015] (4). Syövyttävyyden testaamiseen on hyväksytty kolme validoitua *in vitro* -testimenetelmää, jotka ovat EU:n testimenetelmät B.40 (vastaa OECD:n testiohjetta 430), B.40 a (vastaa OECD:n testiohjetta 431) ja B.65 (vastaa OECD:n testiohjetta 435) (5) (6) (7). Ihosyövyttävyyden ja -ärsyttävyyden testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja sisältävässä OECD:n ohjeasiakirjassa on useita moduuleita, joihin on ryhmitelty erilaisia tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä i) annetaan ohjeita siitä, miten yhdistellä ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja muita tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa ja ii) selostetaan, miten toimia, kun lisätestaus on tarpeen (3).

3. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihoärsytystä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Tämä *in vitro* -testijärjestelmään pohjautuva menetelmä perustuu rekonstruoituun ihmisen orvasketeen (Reconstructed human Epidermis, RhE), joka jäljittelee läheisesti ihmisihon ylemmän kerroksen eli epidermiksen biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia. RhE-testijärjestelmässä käytetään ihmisestä saaduista muuntamattomista orvaskeden keratinosyyteistä peräisin olevia soluja, ja testissä käytetään edustavaa kudos- ja soluarkkitehtuuria. Saatavana on myös suoritusvaatimukset, joilla voidaan validoida ja arvioida samanlaisia ja muunnettuja rekonstruoituun ihmisen orvasketeen perustuvia testimenetelmiä OECD:n ohjeasiakirjassa 34 esitettyjen periaatteiden mukaisesti (8) (9). Menetelmää vastaavat testiohjeet hyväksyttiin ensimmäisen kerran vuonna 2010. Testiohje päivitettiin vuonna 2013 lisäämällä siihen uusia RhE-malleja ja vuonna 2015 lisäämällä siihen viittauksia testauksen ja arvioinnin yhdennettyihin lähestymistapoihin ja ottamalla käyttöön elinkykyisyyden mittaamiseen tarkoitettu vaihtoehtoinen menettely.

4. Validointia edeltäviä optimointi- ja validointitutkimuksia on tehty neljästä kaupallisesti saatavilla olevasta *in vitro* -testimallista (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28), jotka perustuvat RhE-testijärjestelmään (herkkyys 80 %, spesifisyys 70 % ja

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M8

tarkkuus 75 %). Nämä neljä testimallia sisältyvät tähän testimenetelmään, ja ne on lueteltu lisäyksessä 2, jossa on myös tietoa kyseisten testimenetelmien validoimisessa käytetyn validointitutkimuksen tyypistä. Kuten lisäyksessä 2 on todettu, tämän testimenetelmän ja sitä koskevien suoritusvaatimusten kehittämisessä on käytetty validoitua vertailumenetelmää (VVM:ää) (8).

5. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (Mutual Acceptance of Data) taataan ainoastaan suoritusvaatimusten (8) mukaisesti validoitujen testimallien osalta, jos OECD on tarkistanut ja hyväksynyt nämä testimallit. Maat voivat käyttää tässä testimenetelmässä ja sitä vastaavassa OECD:n testiohjeessa olevia testimalleja määrittäessään ihoärsyttävyyden *in vitro* -testimenetelmien testituloksia koskevia vaatimuksiaan, ja samalla ne voivat hyödyntää tietojen vastavuoroista hyväksyntää.

6. Tässä asiakirjassa käytettävien termien määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

7. Kuten RhE-testimalleja arvioivassa ja luonnehtivassa täysimittaisessa prospektiivisessa validointitutkimuksessa on osoitettu (16), tämän testimenetelmän rajoituksena on se, ettei kemikaalien luokittelu YK:n valinnaiseen GHS-luokkaan 3 (lievästi ärsyttävät aineet) ole mahdollista (1). Se, miten tätä testimenetelmää käytetään, määrätään jäsenvaltioiden sääntelykehyksessä. EU:ssa luokkaa 3 ei ole sisällytetty CLP-asetuksen mukaiseen luokitukseen. Jotta paikalliset ihovaikutukset ihon kerta-altistuksen jälkeen voidaan arvioida kattavasti, on tukeuduttava ihosyövyttävyyden ja -ärsytytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan (3). Ihmisihon käyttöön on sovellettava kansallisia ja kansainvälisiä eettisiä käytäntöjä ja ehtoja.

8. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan ihoärsytystä ihmisten terveyteen liittyvänä määrityskohteena. Vaikka tällä testimenetelmällä ei saada riittävästi tietoja ihosyövyttävyydestä, on syytä panna merkille, että ihosyövyttävyyttä koskeva B.40a-testimenetelmä (joka vastaa OECD:n testiohjetta 431) perustuu samaan RhE-testijärjestelmään, mutta siinä käytetään toisenlaista tutkimusprotokollaa (6). Tässä selostettu menetelmä perustuu RhE-malleihin, joissa käytetään ihmisistä peräisin olevia keratinosyyttejä, jotka näin ollen edustavat tarkasteltavana olevan lajin kohde-elintä *in vitro*. Menetelmä kattaa suoraan myös aluksi esiintyvän tulehdusreaktion ja/tai reaktiomekanismin (soluvauriot ja paikalliseen vammaan johtavat kudosvauriot), joka tapahtuu *in vivo* -ärsytyksen aikana. Tämän testimenetelmän validoinnin yhteydessä on testattu useita erilaisia kemikaaleja, ja validointitutkimuksen tietokannassa on yhteensä 58 kemikaalia (16) (18) (23). Testimenetelmää voidaan käyttää kiinteisiin, nestemäisiin, puolikiinteisiin ja vahamaisiin aineisiin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan jauhettava hienoksi jauheeksi ennen applikointia; näytteen muuta esikäsittelyä ei vaadita. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksessa (29). Vaikka niitä voidaan teoriassa testata RhE-tekniikalla, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei kuitenkaan voida testata.

9. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Koska seoksia kuuluu moneen eri luokkaan ja niiden koostumukset ovat moninaisia ja koska seosten testaamisesta on tällä hetkellä saatavilla niukasti tietoa, niissä tapauksissa, joissa voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen seosluokkien kanssa (esimerkiksi Eskesin ja muiden (2012)

▼**M8**

ehdottaman strategian mukaisesti (30)), testimenetelmää ei pidä käyttää näiden seosluokkien yhteydessä. Näin on toimittava myös silloin, jos tiettyjen kemiallisten luokkien tai fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien osalta todetaan, etteivät ne sovellu tämän testimenetelmän kanssa käytettäviksi.

10. Testikemikaalit, jotka absorboivat valoa samalla aallonpituudella kuin MTT-formatsaani, ja testikemikaalit, jotka voivat suoraan pelkistää MTT-vitaaliväriä (MTT-formatsaaniksi), voivat häiritä solujen elinkykyisyysmittauksia, ja niiden yhteydessä on käytettävä mukautettuja kontrolleja korjauksiin (ks. 28–34 kohta).

11. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä kolme kudosnäytettä käsittävässä testiajossa. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset ja/tai jos keskimääräinen elinkyky on 50 ± 5 %, on harkittava toista testiajoa ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testin tulokset poikkeavat toisistaan.

TESTIN PERIAATE

12. Testikemikaalia applikoidaan paikallisesti kolmiulotteiseen RhE-malliin, joka koostuu ihmisestä saaduista muuntamattomista orvaskeden keratinosyyteistä, jotka on viljelty ihmisen orvaskeden monikerroksiseksi, täysin erilaistuneitten solujen malliksi. Se koostuu järjestyneistä tyvisolu-, okasolu- ja jyväiskerroksista ja monikerroksisesta marraskedestä, joka sisältää solujenvälisiä lamellaarisia lipidikerroksia, jotka edustavat lipidiluokkia, joita havaitaan myös in vivo -kokeissa.

13. Kemikaalien aiheuttama ihoärsytys, joka ilmenee eryteemana ja ödeemana, johtuu tapahtumasarjasta, joka käynnistyy, kun kemikaalit läpäisevät marraskeden ja alla olevat keratinosyyteistä ja muista ihosoluista koostuvat kerrokset vaurioituvat. Vaurioituneista soluista voi joko vapautua tulehduksen välittäjäaineita tai ne voivat käynnistää tulehdusreaktion, joka vaikuttaa myös verinahan soluihin, etenkin verisuonten stromaalisiin ja endoteelisoluihin. Havaitut eryteema ja ödeema johtuvat endoteelin solujen laajentumisesta ja tavallista suuremmasta läpäisevyydestä (29). Jos *in vitro* -testijärjestelmällä ei havaita verisuonittumista, RhE-tekniikkaan perustuvilla testimenetelmillä mitataan reaktion käynnistäviä tapahtumia eli solu- tai kudosvauriota (16) (17), ja arvona käytetään solujen elinkykyisyyttä.

14. RhE-malleissa solujen elinkyvyn mittaus perustuu siihen, että entsyymit muuntavat väriaine MTT:n (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi, tiatsolyylisininen; CAS-nro 298-93-1] siniseksi formatsaanisuolaksi, joka mitataan kvantitatiivisesti, kun se on uutettu kudoksista (31). Ärsytystä aiheuttavat kemikaalit tunnistetaan niiden kyvystä alentaa solun elinkykyä määritettyjen kynnysarvojen alle (ts. ≤ 50 % YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokan 2 osalta). Kulloisenkin sääntelyjärjestelmän ja testimenetelmän sovellettavuuden mukaan voidaan katsoa, että kemikaalit, joiden yhteydessä solujen elinkyky on määritettyä kynnysarvoa suurempi, eivät ole ärsyttäviä (ts. > 50 %, ei luokitusta).

▼M8

PÄTEVYYDEN OSOITUS

15. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään neljää tähän testimenetelmään liittyvää validoitua testimallia (lisäys 2) rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä taulukossa 1 lueteltujen pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden avulla. Jos lueteltua ainetta ei ole saatavilla, myös muita aineita voidaan käyttää, jos niistä on saatavilla asianmukaiset *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutiedot (esimerkiksi vertailukemikaalien luettelossa (8)), mikäli sovelletaan samoja valintaperusteita kuin taulukossa 1 kuvatut. Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun vaihtoehtoisen aineen käyttö on perusteltava.

16. Osana pätevyyden testausta käyttäjien on kudosten vastaanoton jälkeen tarkastettava kudosten läpäisevyysominaisuudet RhE-mallin laatijan vaatimusten mukaisesti. Tämä on erityisen tärkeää, jos kudoksia kuljetetaan pitkiä välimatkoja tai pitkiä aikoja. Kun testimenetelmä on otettu onnistuneesti käyttöön ja laboratorion pätevyys sen käytössä on saatu ja osoitettu, tällaista tarkastusta ei tarvitse tehdä säännöllisesti. Jos testimenetelmää käytetään säännöllisesti, läpäisevyysominaisuudet on kuitenkin jatkossakin syytä arvioida säännöllisin väliajoin.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet [1]

Aine	CAS-nro	*In vivo* -tulos [2]	Fysikaalinen olomuoto	YK:n GHS-luokka
LUOKITTELEMATTOMAT AINEET (YK:N GHS: EI LUOKITUSTA)				
Naftaleenietikkahappo	86-87-3	0	Kiinteä	Ei luokitusta
Isopropanoli	67-63-0	0,3	Neste	Ei luokitusta
Metyylistearaatti	112-61-8	1	Kiinteä	Ei luokitusta
Heptyylibutyraatti	5870-93-9	1,7	Neste	Ei luokitusta (*valinnainen luokka 3*) [3]
Heksyylisalisylaatti	6259-76-3	2	Neste	Ei luokitusta (*valinnainen luokka 3*) [3]
LUOKITELLUT AINEET (YK:n GHS-luokka 2)				
Syklameenialdehydi	103-95-7	2,3	Neste	Luokka 2
1-bromiheksaani	111-25-1	2,7	Neste	Luokka 2
Kaliumhydroksidi (5 % liuos vedessä)	1310-58-3	3	Neste	Luokka 2
1-metyyli-3-fenyyli-1-piperatsiini	5271-27-2	3,3	Kiinteä	Luokka 2
Heptanaali	111-71-7	3,4	Neste	Luokka 2

(1) Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet ovat joukko validointitutkimuksessa käytettyjä aineita, ja niiden valintaperusteet ovat seuraavat: i) kemikaalit ovat kaupallisesti saatavilla; ii) ne edustavat koko Draizen ärsyttävyyspisteytysasteikkoa (ärsyttämättömästä erittäin ärsyttävään); iii) niiden kemiallinen rakenne on tarkkaan määritetty; iv) niiden kemiallinen funktio on sama kuin validointiprosessissa käytettyjen kemikaalien; v) niistä on saatu toistettavia *in vitro* -tuloksia monissa testeissä ja monissa laboratorioissa; vi) niitä koskevat ennusteet *in vitro* -testeissä olivat oikeat ja vii) niillä ei ole erittäin toksisia ominaisuuksia (esimerkiksi karsinogeenisia tai lisääntymisjärjestelmälle myrkyllisiä ominaisuuksia), eivätkä niiden hävityskustannukset ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön.

(2) *In vivo* -tulokset testimenetelmän B.4 mukaan (4).

(3) Tässä testimenetelmässä katsotaan, että YK:n GHS-järjestelmän valinnainen luokka 3 (lievästi ärsyttävät aineet) (1) vastaa luokitusta ”ei luokitusta”.

▼M8

MENETTELY

17. Jäljempänä kuvataan ihoärsyttävyysarvioinnissa käytettävän RhE-testimenetelmän osat ja menettelyt (ks. myös kunkin testimallin parametrit lisäyksestä 3). Tämän testimenetelmän mukaiselle neljälle mallille on saatavana myös vakiotoimintamenettelyt (32) (33) (34) (35).

RHE-TESTIMENETELMÄN OSAT

Yleiset ehdot

18. Epiteelin valmistamiseen on käytettävä muuntamattomia ihmisen keratinosyyttejä. Toimivan marraskeden alla on oltava useita kerroksia eläviä epiteelisoluja (tyvisolukerros, okasolukerros ja jyväiskerros). Marraskedessä on oltava useita kerroksia ja olennainen lipidikoostumus, jotta se voi toimia esteenä sytotoksisten vertailukemikaalien, kuten natriumdodekyylisulfaatin (SDS) tai Triton X-100:n, nopealle kulkeutumiselle ihokerrosten läpi. Läpäisynestokyky on osoitettava, ja se voidaan arvioida joko määrittämällä pitoisuus, jossa vertailukemikaali vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) tietyn altistusajan jälkeen, tai määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan solun elinkyvyn vähenemiseen 50 prosentilla (ET_{50}), kun vertailukemikaalia käytetään tiettynä kiinteänä pitoisuutena. Mallin on oltava sellainen, että marraskeden ympärillä olevan materiaalin pääsy elävään kudokseen estyy, sillä marraskeden ympärillä olevien testikemikaalien pääsy kudokseen heikentää mallin kykyä mallintaa ihoaltistusta. RhE-mallissa ei saa olla kontaminaatiota (bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

Toimintaolosuhteet

Solujen elinkyky

19. Solujen elinkyky määritetään MTT-määritysmenetelmällä (31). RhE-kudoksen elinkykyiset solut pelkistävät vitaaliväri MTT:n saostuneeksi siniseksi MTT-formatsaaniksi, joka uutetaan kudoksista isopropanolilla (tai muulla vastaavalla liuottimella). Pelkän uuttoliuottimen optisen tiheyden (OD) on oltava riittävän pieni, ts. OD < 0,1. Uutettu MTT-formatsaani voidaan kvantifioida käyttämällä joko vakioabsorbanssimittausta (OD) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa (36). RhE-mallien käyttäjien on varmistettava, että kukin RhE-mallin erä täyttää negatiiviselle kontrollille asetetut vaatimukset. RhE-mallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo) (ihoärsytystestimenetelmän olosuhteissa). Tähän testimenetelmään sisältyvän neljän validoidun RhE-testimallin hyväksyttävyysalueet esitetään taulukossa 2. HPLC-/UPLC-spektrofotometrian käyttäjän on käytettävä taulukossa 2 esitettyjä negatiivisen kontrollin OD-vaihteluvälejä negatiivisen kontrollin hyväksymisperusteena. Negatiivisella kontrollikemikaalilla käsiteltyjen kudosten vakaus viljelmässä (niiden on annettava samanlaiset elinkykytulokset) testin altistusjakson ajan on dokumentoitava.

Taulukko 2

Tähän testimenetelmään sisältyvien testimallien negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalueet

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0,8	≤ 2,8

▼M8

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
SkinEthic™ RHE	≥ 0,8	≤ 3,0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0,7	≤ 2,5

Läpäisynestokyky

20. Marraskeden ja sen lipidikoostumuksen on oltava riittävä vastustamaan sytotoksisten vertailukemikaalien, esimerkiksi SDS:n tai Triton X-100:n, nopeaa läpäisyä, kun sitä arvioidaan IC_{50}:llä tai ET_{50}:llä (taulukko 3).

Morfologia

21. RhE-malli on tutkittava histologisesti, ja on osoitettava, että rekonstruktiolla on ihmisen orvaskeden kaltainen rakenne (myös monikerroksinen marraskesi).

Toistettavuus

22. On osoitettava, että testimenetelmän positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla saadut tulokset ovat toistettavissa pidemmällä aikavälillä.

Laadunvalvonta

23. RhE-mallia tulee käyttää vain, jos RhE-mallin kehittäjä/toimittaja osoittaa, että kukin RhE-mallin erä täyttää määritetyt tuotantokriteerit, joiden joukosta elinkykyisyyttä (19 kohta), läpäisyn estoa (20 kohta) ja morfologiaa (21 kohta) koskevat perusteet ovat merkityksellisimmät. Nämä tiedot on annettava testimenetelmän käyttäjille, jotta he voivat ilmoittaa tiedot testiraportissa. RhE-mallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä IC_{50}- tai ET_{50}-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo). Ainoastaan hyväksytyillä kudoksilla saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi ärsytyksen luokittelua varten. Tähän testimenetelmään sisältyvän neljän testimallin hyväksyttävyysalueet esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

Tähän testimenetelmään sisältyvien testimallien erän vapauttamiskriteerit laadunvalvonnassa

	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiSkin™ (SM) (18 tunnin käsittely SDS:llä) (32)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (33)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (34)	ET_{50} = 4,0 h	ET_{50} = 10,0 h
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 tunnin käsittely SDS:llä) (35)	IC_{50} = 1,4 mg/ml	IC_{50} = 4,0 mg/ml

▼M8

Testi- ja kontrollikemikaalien annostelu

24. Kutakin testikemikaalia ja kutakin kontrollia kohti on testiajossa käytettävä vähintään kolmea näytettä. Sekä nestemäisiä että kiinteitä kemikaaleja käytettäessä testikemikaalia on annosteltava riittävä määrä tasaisesti orvaskeden pinnalle kuitenkin niin, ettei käytetä rajoittamatonta annosta. Käytettävän määrän on siis oltava 26–83 $\mu l/cm^2$ tai mg/cm^2 (ks. lisäys 3). Kiinteitä kemikaaleja käytettäessä orvaskeden pinta on kostutettava deionisoidulla tai tislatulla vedellä ennen aineen annostelua, jotta testikemikaalin ja orvaskeden pinnan välinen kosketus olisi parempi. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Tietyissä tapauksissa voidaan käyttää nailonverkkoa apuna aineen levittämisessä (ks. lisäys 3). Altistuksen jälkeen testikemikaali on huuhdeltava huolellisesti orvaskeden pinnalta sopivalla vesipitoisella puskuriliuoksella tai 0,9-prosenttisella natriumkloridilla. Sen mukaan, mitä RhE-testimallia käytetään, altistusaika vaihtelee 15 ja 60 minuutin välillä. Inkubointilämpötilan tulee olla 20–37 °C. Altistusajat ja lämpötilat on optimoitu kunkin yksittäisen RhE-mallin mukaiselle testimenetelmälle, ja ne edustavat testimallien erilaisia luontaisia ominaisuuksia (kuten läpäisyn estoa) (ks. lisäys 3).

25. Kussakin testiajossa on käytettävä samanaikaisesti negatiivisia ja positiivisia kontrolleja osoittamaan, että solujen elinkyky (negatiivisella kontrollilla), läpäisyn esto ja altistuksesta seuraava kudoksen herkistyminen (positiivisella kontrollilla) ovat pidemmällä aikavälillä määritetyn hyväksyttävyysalueen mukaiset. Positiivisena kontrolliaineena suositellaan käytettäväksi 5-prosenttista SDS-vesiliuosta. Suositeltavat negatiiviset kontrolliaineet ovat vesi tai fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS).

Solujen elinkykymittaukset

26. Tärkeintä testimenettelyssä on se, että elinkykymittauksia ei tehdä heti testikemikaaleille altistamisen jälkeen, vaan vasta, kun kudokset on käsittelyn jälkeen huuhdeltu ja ne ovat olleet käsittelyn jälkeen riittävän pitkän inkubaatioajan tuoreessa kasvatusliuoksessa. Inkubaatioaika mahdollistaa sekä palautumisen heikoista sytotoksisista vaikutuksista että selkeiden sytotoksisten vaikutusten ilmaantumisen. Kahden RhE-pohjaisen testimallin optimointivaiheessa (11) (12) (13) (14) (15) todettiin, että 42 tuntia kestävä inkubaatioaika käsittelyn jälkeen on optimaalinen.

27. MTT-määritysmenetelmä on standardoitu kvantitatiivinen menetelmä, jota on käytettävä solujen elinkyvyn mittaamiseen tässä testimenetelmässä. MTT-menetelmä sopii käytettäväksi kolmiulotteisen kudosrakenteen kanssa. Kudosnäyte asetetaan kolmeksi tunniksi sopivan vahvuiseen MTT-liuokseen (esimerkiksi 0,3–1 mg/ml). Elinkykyiset solut muuntavat MTT:n siniseksi formatsaaniksi. Saostunut sininen formatsaani uutetaan kudoksesta liuottimella (esimerkiksi isopropanoli tai hapan isopropanoli), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD-arvo 570 nm:ssä käyttäen enintään ± 30 nm:n kaistanpäästösuodatinta tai käyttämällä HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa (ks. 34 kohta) (36).

28. Testikemikaalin optiset ominaisuudet tai sen kemiallinen reaktio MTT:n kanssa voivat aiheuttaa sen, että määritysmenetelmällä saadaan väärä arvio elinkyvystä (koska kemikaalit voivat estää värin muodostumisen tai vaihtoehtoisesti aiheuttaa sen). Näin voi tapahtua, jos tietty testikemikaali ei kokonaan poistu kudoksesta huuhtelemalla tai jos se imeytyy orvasketeen. Jos testikemikaali reagoi suoraan MTT:n kanssa (MTT:n pelkistin), on luonnostaan värillinen tai värjäytyy kudoksen käsittelyn aikana, on käytettävä lisäkontrolleja, jotta testikemikaalin vaikutus solujen elinkyvyn mittaustekniikkaan voidaan

▼M8

osoittaa ja korjata (ks. 29 ja 33 kohta). MTT:n suoran pelkistyksen ja väriaineiden aiheuttamien häiriöiden korjaamismenettelyt selostetaan yksityiskohtaisesti kyseistä neljää, tähän testimenetelmään sisältyvää validoitua mallia koskevissa vakiotoimintamenettelyissä (32) (33) (34) (35).

29. Jotta suorat MTT:n pelkistimet voidaan tunnistaa, on jokainen testikemikaali lisättävä tuoreeseen MTT-liuokseen. Jos testikemikaalia sisältävä MTT-seos muuttuu siniseksi tai violetiksi, testikemikaalin oletetaan olevan suora MTT:n pelkistin, jolloin on tehtävä toiminnallinen tarkastus kuolleilla RhE-kudoksilla riippumatta siitä, käytetäänkö vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa. Tässä toiminnallisessa lisätarkastuksessa käytetään kuolleita kudoksia, joiden metabolinen aktiivisuus on vähäistä mutta jotka absorboivat testikemikaalia yhtä paljon kuin elinkykyiset kudokset. Kutakin MTT:tä pelkistävää testikemikaalia laitetaan jokaisella altistuskerralla vähintään kahdelle sellaiselle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testin ajan, jotta saadaan aikaan epäspesifi MTT:n pelkistys (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Yksi NSMTT-kontrolli testikemikaalia kohti riittää itsenäisesti suoritettujen testien/testiajojen lukumäärästä riippumatta. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: MTT:n pelkistimelle altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys vähennettynä samalle MTT:n pelkistimelle altistettujen kuolleiden kudosten epäspesifisen MTT-pelkistyksen prosenttiosuudella laskettuna suhteessa negatiiviseen kontrolliin, joka testattiin samanaikaisesti korjattavan testin kanssa (%NSMTT).

30. Jotta voidaan tunnistaa värillisten testikemikaalien tai kosketuksessa veteen tai isopropanoliin värjäytyvien testikemikaalien aiheuttama mahdollinen interferenssi ja päättää, tarvitaanko lisäkontrolleja, testikemikaalista on tehtävä spektrianalyysi vedessä (ympäristö altistuksen aikana) ja/tai isopropanolissa (uuttoliuos). Jos vedessä ja/tai isopropanolissa oleva testikemikaali absorboi valoa alueella 570 ± 30 nm, on käytettävä useampia väriainekontrolleja tai vaihtoehtoisesti on käytettävä HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa, jolloin näitä kontrolleja ei tarvita (ks. 33 ja 34 kohta). Vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä kutakin häiritsevää värillistä testikemikaalia laitetaan jokaisella altistuskerralla vähintään kahdelle elinkykyiselle rinnakkaiskudosnäytteelle, joita käytetään koko testin ajan mutta jotka inkuboidaan MTT-liuoksen sijasta kasvatusaineessa MTT-inkubointivaiheen aikana, jotta saadaan aikaan epäspesifi värikontrolli (NSC_{living}). NSC_{living}-kontrolli on tehtävä samanaikaisesti jokaisen värillisellä testikemikaalilla tehtävän testin kanssa (jokaisessa testiajossa) elävien kudosten luontaisen biologisen vaihtelun vuoksi, ja useampien testien yhteydessä on tehtävä riippumaton NSC_{living}-kontrolli. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT-liuoksessa inkuboitujen elävien kudosten elinkykyisyyden prosenttiosuus vähennettynä häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä kasvatusaineessa inkuboitujen elävien kudosten epäspesifisen ja samanaikaisesti korjattavan testin kanssa testatun värikontrollin prosenttiosuudella ($\%NSC_{living}$).

31. Niille testikemikaaleille, joiden todetaan tuottavan sekä suoraa MTT:n pelkistystä (ks. 29 kohta) että väri-interferenssiä (ks. 30 kohta), tarvitaan vielä kolmas kontrollisarja edellisissä kohdissa kuvattujen NSMTT- ja NSC_{living}-kontrollien lisäksi vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä. Näin on yleensä MTT-määritystä häiritsevien tummien kemikaalien (esimerkiksi sinisten, violettien ja mustien) yhteydessä, koska niiden luontainen väri vaikeuttaa sen arviointia, miten ne pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan 29

▼**M8**

kohdassa kuvatun mukaisesti. Nämä testikemikaalit voivat sitoutua sekä eläviin että kuolleisiin kudoksiin, minkä vuoksiNSMTT-kontrolli saattaa korjata paitsi testikemikaalin mahdollisesti aiheuttaman suoran MTT:n pelkistyksen myös väri-interferenssin, joka johtuu testikemikaalin sitoutumisesta kuolleisiin kudoksiin. Tämä taas voi johtaa väri-interferenssin kaksinkertaiseen korjaamiseen, koska NSC_{living}-kontrollilla korjataan jo testikemikaalin eläviin kudoksiin sitoutumisesta johtuva väri-interferenssi. Jotta vältetään väri-interferenssin mahdollinen kaksinkertainen korjaaminen, tarvitaan kolmas, epäspesifinen väri kuolleissa kudoksissa -kontrolli (NSC_{killed}). Tässä lisäkontrollissa testikemikaalia laitetaan vähintään kahdelle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testin ajan mutta jotka inkuboidaan MTT-liuoksen sijasta kasvatusliuoksessa MTT-inkubointivaiheessa. Yksi NSC_{killed}kontrolli testikemikaalia kohti riittää tehtyjen itsenäisten testien/testiajojen määrästä riippumatta, mutta se on tehtävä samaan aikaan kuin NSMTT-kontrolli ja samalla kudoserällä, mikäli mahdollista. Kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan sen jälkeen tällä kaavalla: testikemikaalille altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys miinus %NSMTT miinus %NSC $plus_{living}$ häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä kasvatusliuoksessa inkuboitujen kuolleiden kudosten epäspesifisen värin prosentuaalinen osuus laskettuna suhteessa korjattavan testin kanssa samanaikaisesti tehtyyn negatiiviseen kontrolliin ($\%NSC_{killed}$).

32. On tärkeää muistaa, että epäspesifinen MTT:n pelkistys ja epäspesifiset väri-interferenssit voivat kasvattaa kudosuutteiden lukemia spektrofotometrin lineaarista asteikkoa suuremmaksi. Tämän vuoksi jokaisen laboratorion on määritettävä spektrofotometrinsä lineaarinen asteikko kaupallisesta lähteestä saatavalla MTT-formatsaanilla (CAS-nro 57360-69-7) ennen sääntelytarkoituksiin liittyvien testikemikaalien testaamisen aloittamista. Spektrofotometrillä tehtävä vakioabsorbanssimittaus (optinen tiheys) on asianmukainen suorien MTT:n pelkistimien ja väri-interferenssiä aiheuttavien testikemikaalien määrittämisessä, jos testikemikaalilla käsiteltyjen kudosuutteiden optiset tiheydet (ilman suoran MTT:n pelkistyksen ja/tai väri-interferenssin korjaamista) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon mukaiset tai jos testikemikaalilla saatu korjaamaton prosentuaalinen elinkykyisyys on jo $\leq$ 50 %. Sellaisia testikemikaaleja, joiden tuottamat %NSMTT- ja/tai $\%NSC_{living}$-arvot ovat $\geq$ 50 % negatiivisesta kontrollista, koskeviin tuloksiin on kuitenkin syytä suhtautua varauksellisesti, koska se on raja-arvo, jota käytetään luokiteltujen kemikaalien erottamiseen luokittelemattomista (ks. 36 kohta).

33. Niiden värillisten testikemikaalien yhteydessä, jotka eivät sovellu vakioabsorbanssimittaukseen (optinen tiheys), koska ne häiritsevät MTT-määritystä liikaa, voidaan vaihtoehtoisesti käyttää HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa MTT-formatsaanin mittaamiseen (ks. 34 kohta) (36). HPLC-/UPLC-spektrofotometrijärjestelmän avulla MTT-formatsaani voidaan erottaa testikemikaalista ennen sen kvantifiointia (36). Tästä syystä NSC_{living}- tai NSC_{killed}-kontrolleja ei tarvita koskaan HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa käytettäessä siitä riippumatta, mikä testattava kemikaali on. NSMTT-kontrolleja on kuitenkin käytettävä, jos testikemikaalin epäillään olevan suora MTT:n pelkistin tai jos sen väri vaikeuttaa sen arviointia, miten hyvin se pystyy pelkistämään MTT:tä suoraan (29 kohdassa kuvatun mukaan). Jos MTT-formatsaanin mittaamisessa käytetään HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa, kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin prosentuaalisena huippualueena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Niiden testikemikaalien osalta, jotka pystyvät pelkistämään

▼M8

MTT:tä suoraan, kudoksen todellinen elinkykyisyys lasketaan tällä kaavalla: testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saatu kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys miinus %NSMTT. On myös syytä muistuttaa siitä, että suoria MTT:n pelkistimiä, jotka voivat aiheuttaa myös väri-interferenssiä ja jotka pysyvät kudoksissa käsittelyn jälkeen ja pelkistävät MTT:tä niin voimakkaasti, että testattujen kudosuutteiden optiset tiheydet (vakiotiheysmittausta käyttäen) tai huippualueet (UPLC-/HPLC-spektrofotometriaa käyttäen) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon ulkopuolella, ei voida määrittää, vaikka tällaista oletetaan tapahtuvan vain hyvin harvoin.

34. HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa voidaan käyttää myös kaikentyyppisten testikemikaalien (värillisten, värittömien, MTT:n pelkistimien ja muiden kuin MTT:n pelkistimien) kanssa MTT-formatsaanin mittaamiseen (36). HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmien moninaisuuden vuoksi näiden järjestelmien asianmukaisuus on osoitettava, ennen kuin niitä käytetään kudosuutteiden MTT-formatsaanin kvantifioimisessa. Järjestelmien on täytettävä tavanomaisten laatuparametrien hyväksymisperusteet Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston bioanalyyttisten menetelmien validointia koskevissa ohjeissa kuvatun mukaisesti (36) (37). Nämä keskeiset parametrit ja niihin liittyvät hyväksymisperusteet esitetään lisäyksessä 4. Kun lisäyksessä 4 määritetyt hyväksymisperusteet täyttyvät, kyseistä HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmää pidetään asianmukaisena ja sillä voidaan mitata MTT-formatsaania tässä testimenetelmässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

Hyväksymisperusteet

35. Jokaisessa testimenetelmässä, jossa käytetään valideja RhE-mallieriä (ks. 23 kohta), negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen kudosten optisen tiheyden on kuvastettava sellaisten kudosten laatua, joiden osalta on toimittu kaikkien kuljetus- ja vastaanottovaiheiden ja tutkimussuunnitelman menettelyjen mukaisesti. Kontrollien OD-arvot eivät saa olla alhaisemmat kuin pitkähkön aiemman ajanjakson alemmat rajat. Vastaavasti positiivisella kontrollilla, esimerkiksi 5-prosenttisella SDS-vesiliuoksella, käsiteltyjen kudosten on ilmennettävä kudosten kykyä reagoida ärsytystä aiheuttavaan kemikaaliin tämän testimenetelmän mukaisissa olosuhteissa (ks. lisäys 3 ja lisätietoja tähän testimenetelmään sisältyvän neljän testimallin vakiotoimintamenettelyistä kirjallisuusviitteistä (32) (33) (34) (35)). Rinnakkaiskudosnäytteiden välisen vaihtelun (esimerkiksi keskihajonnat) on oltava käytettävälle testimallille vahvistettujen hyväksymisrajojen mukainen (ks. lisäys 3).

Tulosten tulkinta ja ennustemalli

36. Kullakin testikemikaalilla saaduista OD-arvoista voidaan laskea solujen prosentuaalinen elinkyky normalisoituna negatiiviseen kontrolliin, jonka arvoksi on asetettu 100 %. HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa käytettäessä kudoksen prosentuaalinen elinkykyisyys lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin prosentuaalisena huippualueena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Solujen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvo, jolla ärsyttävät testikemikaalit erotellaan luokittelemattomista testikemikaaleista, ja tulosten arviointiin ja ärsyttävien kemikaalien tunnistamiseen käytettävät tilastomenetelmät on määriteltävä selvästi ja dokumentoitava, ja niiden sopivuus on osoitettava (ks. lisätietoja testimalleja koskevista vakiotoimintamenettelyistä). Ärsyttävyyden ennustetta koskevat raja-arvot esitetään seuraavassa:

▼M8

— Testikemikaalin katsotaan edellyttävän YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaista luokitusta ja merkintää (luokka 2 tai luokka 1), jos kudoksen prosentuaalinen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on keskimäärin pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 50 prosenttia. Koska tähän testimenetelmään kuuluvilla RhE-testimalleilla ei voida erotella YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisia luokkia 1 ja 2, ihosyövyttävyydestä tarvitaan lisää tietoa, jotta sen lopullinen luokitus voidaan päättää [ks. myös testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskeva OECD:n ohjeasiakirja (3)]. Jos testikemikaalin todetaan olevan syövyttämätön (esimerkiksi testimenetelmän B.40, B.40 a tai B.65 perusteella) ja jos kudoksen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 50 prosenttia, testikemikaalin katsotaan olevan ihoa ärsyttävä YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 2 mukaisesti.

— Sen mukaan, millaista sääntelyjärjestelmää jäsenvaltioissa sovelletaan, voidaan katsoa, että testikemikaali ei aiheuta ärsytystä iholla YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokituksen ”ei luokitusta” mukaisesti, jos kudoksen elinkyky altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubaation jälkeen on suurempi kuin (>) 50 prosenttia.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

37. Kunkin testin osalta yksittäisiä rinnakkaiskudosnäytteitä koskevat mittaustulokset on esitettävä taulukkona (esimerkiksi kunkin testikemikaalin OD-arvot ja solujen prosentuaalista elinkykyä koskevat tiedot sekä luokittelu). Tarvittaessa on esitettävä myös mittaustulokset toistetuista kokeista. Lisäksi on esitettävä kunkin käsittelyn keskiarvo ± keskihajonta. Kunkin testikemikaalin osalta on esitettävä havaittu yhteisvaikutus MTT-reagenssin ja värillisten testikemikaalien kanssa.

Testiraportti

38. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrollikemikaalit:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

— Monesta ainesosasta muodostuva aine, UVCB-aine ja seos: luonnehditaan mahdollisimman tarkoin kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Käytetty RhE-malli ja protokolla (valinnan osalta perusteluineen, tarvittaessa)

▼**M8**

Testiolosuhteet:

— käytetty RhE-malli (ja eränumero)

— mittalaitteen (esimerkiksi spektrofotometrin) kalibrointitiedot, MTT-formatsaanin kvantifioimisessa käytetty aallonpituus ja kaistanpäästö (tarvittaessa) sekä mittalaitteen lineaarisuusasteikko MTT-formatsaanin kvantifioimisessa käytetyn menetelmän kuvaus

— HPLC-/UPLC-spektrofotometrijärjestelmän asianmukaisuuden kuvaus tarvittaessa täydelliset RhE-mallin käyttöä tukevat tiedot (myös mallin suoritusarvot). Näitä voivat olla esimerkiksi

i) elinkykyisyys

ii) läpäisyn esto

iii) morfologia

iv) uusittavuus ja ennustettavuus

v) mallin laatukontrollit

— viittaukset mallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla esimerkiksi laatukontrollitietojen hyväksyttävyys verrattuna aikaisempia eriä koskeviin tietoihin.

— Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla tehtyyn testaukseen perustuva osoitus pätevyydestä tämän testimenetelmän osalta ennen rutiininomaisen käytön aloittamista.

Testimenettely:

— tiedot käytetystä testimenettelystä (myös altistusjakson jälkeen käytetyistä pesumenettelyistä) testikemikaalin ja käytettyjen kontrollikemikaalien annokset

— altistusjakson kesto ja altistuslämpötila sekä altistuksen jälkeinen inkubointijakso

— tiedot kontrolleista, joita on käytetty suorille MTT:n pelkistimille ja/tai värjääville testikemikaaleille (tarvittaessa)

— testikemikaalia ja kontrolleja kohti käytettyjen rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä (positiivinen kontrolli, negatiivinen kontrolli, NSMTT, NSC_{living} ja NSC_{killed} tarvittaessa)

— kuvaus sovelletuista päätöksentekoperusteista / käytetystä ennustemallista käytetyn RhE-mallin perusteella

— kuvaus testimenettelyjen (ja pesumenettelyjen) mahdollisista muutoksista.

Testiajo ja testin hyväksymisperusteet:

— positiivisten ja negatiivisten kontrollien keskiarvot ja hyväksyttävyysalueet aikaisempien tietojen perusteella rinnakkaiskudosnäytteiden hyväksyttävä vaihtelu positiivisten ja negatiivisten kontrollien osalta

▼**M8**

— rinnakkaiskudosnäytteiden hyväksyttävä vaihtelu testikemikaalin osalta.

Tulokset:

— Taulukkomuotoiset tiedot yksittäisistä testikemikaaleista jokaisesta testiajosta ja jokaisesta rinnakkaismittauksesta sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, kudosten prosentuaalinen elinkykyisyys, kudosten prosentuaalisen elinkyvyn keskiarvo ja keskihajonta.

— Tarvittaessa tulokset kontrolleista, joita käytettiin suorien MTT:n pelkistimien ja/tai värjäävien testikemikaalien yhteydessä, sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, %NSMTT, $\%NSC_{living}$, $\%NSC_{killed}$, keskihajonta ja lopullinen oikea kudoksen prosentuaalinen elinkyky.

— Testikemikaalista (-kemikaaleista) ja kontrolleista saadut tulokset tietyssä testiajossa ja testin hyväksymisperusteisiin nähden.

— Kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

— Tulosten perusteella tehty luokitus ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekoperusteista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the ”Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Saatavana osoitteessa https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Tämän liitteen luku B.4, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(5) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* -ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

(6) Tämän liitteen luku B.40a *In vitro* -ihosyövyttävyys: Rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä.

(7) Tämän liitteen luku B.65, Kalvoesteeseen perustuva *in vitro* -testimenetelmä.

▼**M8**

(8) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57–93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351–367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329–349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559–601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603–619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351–358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Saatavana osoitteessa https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Huom. nämä ovat alkuperäiset suoritusvaatimukset, joita on käytetty kahden testimenetelmän validoinnissa. Näitä suoritusvaatimuksia ei tule enää käyttää, koska saatavilla on päivitetty versio (8).*

(22) EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OECD (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327–334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111–122

(26) OECD (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(27) OECD (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33–50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231–243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul. *Toxicol*. Pharmacol. 62, 393–403.

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24"

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Tekeillä oleva käsikirjoitus.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Saatavana osoitteessa [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lammintausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, teoksessa: Practical Contact Dermatitis, s. 7–18 (toim. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Huom. Tämä on ECVAMin suoritusvaatimusten nykyinen versio, joka on päivitetty vuonna 2009 YK:n GHS-järjestelmän täytäntöönpanon yhteydessä. Näitä suoritusvaatimuksia ei tule enää käyttää, koska niistä on saatavilla on päivitetty versio (8), joka liittyy nykyiseen testiohjeeseen.*

(40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) Euroopan komissio (2001). Komission direktiivi 2001/59/ EY, annettu 6 päivänä elokuuta 2001, vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kahdennenkymmenennenkahdeksannen kerran, Euroopan unionin virallinen lehti L 225, s. 1–333.

▼M8

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (9).

Solujen elinkykyisyys: Parametri, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta, esimerkiksi solujen mitokondrioiden dehydrogenaasien kykyä pelkistää väriaine MTT (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi eli tiatsolyylisininen), joka korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn mitatun päätetapahtuman ja testimenetelmän mukaan.

Kemikaali: Aine tai seos.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimalleille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään joskus toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi. Vastaavuuteen vaikuttaa suuresti positiivisten tulosten esiintyminen tutkittavien testikemikaalien tyypeissä (9).

ET_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä altistusaika, joka tarvitaan, jotta solujen elinkyky vähenee 50 prosenttia annosteltaessa vertailukemikaalia tiettynä määrättynä pitoisuutena; katso myös IC_{50}.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; Yhdistyneiden kansakuntien (YK) maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niihin liittyvät vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

HPLC: Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment, testauksen ja arvioinnin yhdennetyt lähestymistavat.

IC_{50}: Voidaan arvioida määrittämällä pitoisuus, jossa vertailukemikaali vähentää solujen elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) sovitun altistusajan jälkeen; katso myös ET_{50}.

Rajoittamaton annos: Orvasketeen applikoidun testikemikaalin määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan orvaskeden pinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu vähintään kahdesta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

▼M8

MTT: 3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi; tiatsolyylisininen tetrasoliumbromidi.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

NSC_{killed}: Epäspesifi värikontrolli kuolleissa kudoksissa.

NSC_{living}: Epäspesifi värikontrolli elävissä kudoksissa.

NSMTT: Epäspesifi MTT:n pelkistys.

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Tähän sisältyvät: i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (9).

PK: Positiivinen kontrolli, näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (9).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (9).

Korvaava testi: Testi, jolla voidaan korvata testi, joka on säännöllisesti käytössä ja joka on hyväksytty vaarallisuuden määrittämiseen ja/tai riskien arviointiin, ja jonka on osoitettu antavan ihmisten tai eläinten terveyden tai tarvittaessa ympäristön kannalta vastaavan tai korkeamman suojelutason hyväksyttyyn testiin verrattuna kaikissa mahdollisissa testaustilanteissa ja kaikkien kemikaalien yhteydessä (9).

Testiajo: Testiajo koostuu yhden tai useamman testikemikaalin testaamisesta samanaikaista negatiivista ja positiivista kontrollia käyttäen.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

▼**M8**

Ihoärsyttävyys *in vivo*: Korjautuvan ihovaurion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Ihoärsytys on altistuneen ihokudoksen paikallinen reaktio, joka kehittyy pian stimulaation jälkeen (38). Sen aiheuttaa paikallinen tulehdusreaktio, johon osallistuu myös ihokudoksen luontainen (epäspesifi) immuunijärjestelmä. Sen tärkeimmät ominaispiirteet ovat sen palautuvuus, johon liittyy tulehdusreaktioita, ja useimmat tulehdusreaktioon liittyvät ärsyttävyyden kliiniset ominaispiirteet (eryteema, ödeema, kutina ja kipu).

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantoprosessein tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UPLC: Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

▼**M8**

Lisäys 2

TÄHÄN TESTIMENETELMÄÄN SISÄLTYVÄT TESTIMALLIT

Nro	Testimallin nimi	Validointitutkimuksen tyyppi	Viittaukset
1	EpiSkin™	Laaja prospektiivinen validointitutkimus (2003–2007). Tämän mallin osia käytettiin ECVAMin alkuperäisten ja päivitettyjen suoritusvaatimusten oleellisten testimenetelmän osien määrittämisessä (39) (40) (21) (*). Lisäksi menetelmän tietoja, jotka liittyvät luokittelemattomien vs. luokiteltujen aineiden määrittämiseen, käytettiin perusteena alkuperäisten suoritusvaatimusten (*) spesifisyys- ja herkkyysarvojen määrittämisessä. (*)	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (*alkuperäinen*): Alun perin testimallin laaja prospektiivinen validointi tehtiin testimallin nro 1 kanssa vuosina 2003–2007. Tämän mallin osia käytettiin ECVAMin alkuperäisten ja päivitettyjen suoritusvaatimusten oleellisten testimenetelmien osien määrittämisessä (39) (40) (21) (*). **EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Alkuperäisen EpiDerm™-mallin muunnos validoitiin ECVAMin alkuperäisiä suoritusvaatimuksia käyttäen (21) vuonna 2008 (*)	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validointitutkimus perustui ECVAMin alkuperäisiin suoritusvaatimuksiin (21), ja se tehtiin vuonna 2008 (*).	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validointitutkimus (2011–2012) perustui OECD:n testiohjeen 439 mukaisiin suoritusvaatimuksiin (8), jotka pohjautuvat ECVAMin päivitettyihin suoritusvaatimuksiin (*) (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) ja tämän testiohjeen suoritusvaatimukset (8) (*)

(*) ECVAMin alkuperäiset suoritusvaatimukset (21) laadittiin vuonna 2007 prospektiivisen validointitutkimuksen (16) valmistuessa. Tässä tutkimuksessa arvioitiin testimallien nro 1 ja 2 suorituskykyä vaarallisista aineista annetun EU-direktiivin 28. muutoksessa (41) kuvattuun luokitusjärjestelmään nähden. Vuonna 2008 käyttöönotetun YK:n GHS-järjestelmän (1) ja voimaan tulleen EU:n CLP-asetuksen myötä luokittelemattomien aineiden erottelemisessa luokitelluista aineista *in vivo* -tuloksiin sovellettava raja-arvo muuttui arvosta 2,0 arvoon 2,3. ECVAMin suoritusvaatimusten tarkkuusarvoja ja vertailukemikaalien luetteloa päivitettiin vuonna 2009, jotta ne täyttäisivät tämän muuttuneen sääntelyvaatimuksen (2) (39) (40). Alkuperäisten suoritusvaatimusten tapaan päivitetyt suoritusvaatimuksetkin perustuivat pitkälti malleista 1 ja 2 saatuihin tietoihin (16), mutta lisäksi niissä käytettiin mallista nro 3 saatuja tietoja vertailukemikaaleista. Vuonna 2010 ECVAMin päivitettyjä suoritusvaatimuksia käytettiin tähän testiohjeeseen liittyvien suoritusvaatimusten määräämisessä (8). Tämän testimenetelmän validoitu vertailumenetelmä on EpiSkin™, koska suoritusvaatimusten kaikki kriteerit laadittiin sen perusteella. Tarkempia tietoja validointitutkimuksista, kooste tuotetuista tiedoista ja perustelut suoritusvaatimusten tarvittaville muutoksille, jotka johtuivat YK:n GHS-järjestelmän käyttöönotosta ja CLP-asetuksen voimaantulosta, on ECVAMin/BfR:n tausta-asiakirjassa, joka liittyy OECD:n testiohjeeseen 439 (23).

SIT: Skin Irritation Test, ihoärsytystesti

RHE: Reconstructed Human Epidermis, rekonstruoitu ihmisen orvaskesi

▼**M8**

Lisäys 3

TÄHÄN TESTIMENETELMÄÄN SISÄLTYVIEN TESTIMALLIEN TESTISUUNNITELMAN MUKAISET PARAMETRIT

RhE-mallien testisuunnitelmat ovat hyvin samanlaiset, ja kaikissa käytettävä käsittelyn jälkeinen inkubointiaika on 42 tuntia (32) (33) (34) (35). Vaihtelu liittyy pääasiassa kolmeen seuraavaan parametriin, jotka liittyvät testimallien erilaisiin läpäisynestotoimintoihin: A) käsittelyä edeltävä inkubointiaika ja -määrä, B) testikemikaalien applikoiminen ja C) käsittelyn jälkeisen inkuboinnin määrä.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24 SIT
A) Käsittelyä edeltävä inkubointi				
Inkubointiaika	18–24 tuntia	18–24 tuntia	< 2 tuntia	15–30 tuntia
Kasvatusaineen määrä	2 ml	0,9 ml	0,3 tai 1 ml	0,5 ml
B) Testikemikaalin applikointi				
Nesteet	10 µl (26 µl/cm^2)	30 µl (47 µl/cm^2)	16 µl (32 µl/cm^2)	25 µl (83 µl/cm^2)
Kiinteät aineet	10 mg (26 mg/cm^2) + TV (5 µl)	25 mg (39 mg/cm^2) + DPBS (25 µl)	16 mg (32 mg/cm^2) + TV (10 µl)	25 mg (83 mg/cm^2) + TV (25 µl)
Nailonverkon käyttö	Ei käytössä	Tarvittaessa	Käytössä	Ei käytössä
Applikoinnin kokonaisaika	15 minuuttia	60 minuuttia	42 minuuttia	15 minuuttia
Applikointilämpötila	HLT	a) HLT:ssä 25 minuuttia b) 37 °C:ssa 35 minuuttia	HLT	HLT
C) Käsittelyn jälkeisen inkuboinnin määrä				
Kasvatusliuoksen määrä	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Suurin hyväksyttävä vaihtelu				
Kudosnäytteiden keskihajonta	SD18	SD18	SD18	SD18

HLT: Huoneenlämpötila
TV: Tislattu vesi
DPBS: Dulbeccon fosfaattipuskuroitu suolaliuos

▼**M8**

Lisäys 4

KESKEISET PARAMETRIT JA HYVÄKSYMISPERUSTEET, JOIDEN MUKAAN HPLC-/UPLC-SPEKTROFOTOMETRIAJÄRJESTELMÄ VOIDAAN HYVÄKSYÄ RHE-KUDOKSISTA UUTETUN MTT-FORMATSAANIN MITTAAMISEEN

Parametri	Protokolla peräisin FDA:n ohjeista (36) (37)	Hyväksymisperusteet
Valikoivuus	Analyysi: isopropanoli, eläviä soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute elävistä RhE-kudoksista ilman käsittelyä), kuolleita soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute kuolleista RhE-kudoksista ilman käsittelyä)	$Alue_{interferenssi} \leq 20\ \%\ Alue_{LLOQ}$ (1):sta
Täsmällisyys	Laatukontrollit (esim. MTT-formatsaani pitoisuuksina 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanolilla (n=5)	CV ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Tarkkuus	Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	%Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Matriisivaikutus	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=5)	85 % ≤ matriisivaikutus % ≤ 115 %
Kulkeutuminen	Isopropanolin analysointi ULOQ (2)-standardin mukaan	$Alue_{interferenssi} \leq 20\ \%\ Alue_{LLOQ}$:sta
Toistettavuus (päivänsisäinen)	3 riippumatonta kalibrointikäyrää (perustuen 6 peräkkäiselle 1/3-laimennokselle MTT-formatsaanista isopropanolissa ULOQ-arvosta alkaen, ts. 200 µg/ml); Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	Kalibrointikäyrät: %Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta Laatukontrollit: %Dev ≤ 15 % ja CV ≤ 15 %
Toistettavuus (päivien välinen)	Päivä 1: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 2: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3) Päivä 3: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3)	
MTT-formatsaanin lyhytaikainen stabiilius RhE-kudosuutteessa	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja 24 tunnin kuluttua huoneenlämpötilassa säilytyksestä	%Dev ≤ 15 %
MTT-formatsaanin pitkäaikainen stabiilius RhE-kudosuutteessa (tarvittaessa)	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja muutaman päivän kuluttua tietyssä lämpötilassa (esimerkiksi 4°C, -20°C, -80°C) säilytyksestä	%Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: Alempi määritysraja, määritetty kattamaan kudoksen elinkykyisyys, kun se on 1–2 prosenttia, esim. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Ylempi määritysraja, määritetty olemaan vähintään kaksi kertaa suurempi kuin suurin odotettu MTT-formatsaanipitoisuus negatiivisten kontrollien isopropanoliuutteissa, esim. 200 µg/ml.

▼M7

B.47. NAUDAN SARVEISKALVON SAMEUDEN JA LÄPÄISEVYYDEN TESTIMENETELMÄ, JOLLA VOIDAAN MÄÄRITTÄÄ I) VAKAVIA SILMÄVAURIOITA AIHEUTTAVAT KEMIKAALIT JA II) KEMIKAALIT, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 437 (2013). Naudan sarveiskalvon sameuden ja läpäisevyyden testimenetelmä (BCOP) on arvioitu vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälisen koordinointikomitean (ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) toimesta. Tutkimukseen ovat osallistuneet vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalainen validointikeskus (ECVAM) ja Japanin vastaava keskus (JaCVAM) vuosina 2006 ja 2010 (1) (2). Ensimmäisellä kerralla arvioitiin BCOP-testimenetelmän käytettävyyttä vakavan silmävaurion aiheuttavien kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamisessa (1). Toisella kerralla arvioitiin BCOP-testimenetelmän käytettävyyttä sellaisten kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamisessa, joita ei luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (2). BCOP-validointitietokanta sisälsi yhteensä 113 ainetta ja 100 seosta (2) (3). Arviointien ja niiden vertaisarvioiden perusteella katsottiin, että testimenetelmällä voidaan tunnistaa oikein sekä vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit (aineet ja seokset) (luokka 1) että sellaiset, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta siten, kun se on määritetty Yhdistyneiden kansakuntien (YK) kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa luokitus- ja merkintäjärjestelmässä (GHS-järjestelmässä) (4) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetuksessa) ([1]), ja menetelmä on siten vahvistettu tieteellisesti päteväksi molempiin tarkoituksiin. Vakava silmävaurio on silmän kudosvaurio tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän pinnalle, eikä se palaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Vakavan silmävaurion aiheuttavat testikemikaalit on luokiteltu YK:n GHS-luokkaan 1. Kemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, on määritelty kemikaaleiksi, joita ei voida luokitella YK:n GHS-järjestelmän luokan 1 tai 2 (2A tai 2B) kemikaaleiksi, joten niitä kutsutaan kemikaaleiksi, joilla ei ole YK:n GHS-luokitusta. Tähän testimenetelmään kuuluvat BCOP-testimenetelmän suositeltu käyttö ja rajoitukset, jotka perustuvat BCOP:n arviointeihin. OECD:n testiohjeiden alkuperäisen vuoden 2009 version ja vuoden 2013 päivitetyn version tärkeimmät, mutta eivät ainoat, erot ovat: BCOP-testimenetelmän käyttö sellaisten kemikaalien tunnistamisessa, jotka eivät vaadi YK:n GHS-järjestelmän luokitusta (2 ja 7 kohdat); tarkennukset BCOP-testimenetelmän soveltuvuuteen alkoholien, ketonien ja kiintoaineiden (6 ja 7 kohdat) sekä aineiden ja seosten (8 kohta) testaamisessa; tarkennukset pinta-aktiivisten aineiden ja pinta-aktiivisia aineita sisältävien seosten suositeltavaan testaustapaan (28 kohta); positiivisia kontrolleja koskevat päivitykset ja tarkennukset (39 ja 40 kohdat); BCOP-testimenetelmän päätösperusteiden päivitys (47 kohta); tutkimuksen hyväksymisperusteiden päivitys (48 kohta); testiraportin osien päivitys (49 kohta); lisäyksen 1 määritelmien päivitys; lisäykseen 2 lisätty maininta BCOP-testimenetelmän ennustamiskyvystä eri luokitusjärjestelmissä; lisäyksessä 3 olevan pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen kemikaalien luettelon päivitys sekä lisäyksen 4 päivitys BCOP-testissä käytetyn sarveiskalvotelineen (1 kohta) ja opasitometrin (2 ja 3 kohdat) osalta.

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

Nykyään on yleisesti hyväksyttyä, että Draizen *in vivo* -silmätestiä ei lähitulevaisuudessa voida korvata millään yksittäisellä *in vitro* -silmä-ärsytystestillä, kun halutaan ennakoida kaikki eri kemikaaliluokkien aiheuttamien aiheuttamat ärsytykset. Draizen silmätesti voidaan mahdollisesti kuitenkin korvata käyttämällä monen vaihtoehtoisen testimenetelmän (porrastettua) testausstrategiaa (5). Ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa (5) on tarkoitettu käytettäväksi silloin, kun olemassa olevien tietojen perusteella voidaan olettaa, että kemikaalin ärsytyskyky on korkea. Alhaalta ylöspäin suuntautuva lähestymistapa (5) on taasen tarkoitettu käytettäväksi silloin, kun olemassa olevien tietojen perusteella voidaan olettaa, että kemikaali ei aiheuta niin suurta silmä-ärsytystä, että se olisi luokiteltava. BCOP-testimenetelmä on *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan käyttää tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin kemikaalien silmävaarallisuuden luokitukseen ja merkintään. Vaikka BCOP-testimenetelmää ei pidetäkään yksinään luotettavana *in vivo* -kaninsilmätestin korvaavana testinä, sitä suositellaan Scott *et al.:n* ehdotuksen kaltaisen ylhäältä alaspäin suuntautuvan testausstrategian ensimmäiseksi vaiheeksi (5) käytettäväksi vakavan silmävaurion aiheuttavien kemikaalien eli YK:n GHS-luokkaan 1 luokiteltujen kemikaalien tunnistamisessa ilman lisätestejä (4). BCOP-testimenetelmää suositellaan myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta sellaisena, kuin ne on määritetty YK:n GHS-järjestelmässä (ei YK:n GHS-luokitusta) (4) osana ylhäältä alaspäin suuntautuvan lähestymistavan kaltaista testausstrategiaa (5). Lopullisen luokituksen vahvistamiseksi kemikaali, jonka ei ennusteta aiheuttavan vakavaa silmävaurioita tai jota ei ole luokitettu BCOP-testimenetelmällä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, on kuitenkin testattava (*in vitro* ja/tai *in vivo*) lisätesteillä.

Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testikemikaalin mahdollinen vaarallisuus silmälle mittaamalla kykyä aiheuttaa sameutta ja läpäisevyyden lisääntymistä eristetyssä naudan sarveiskalvossa. Myrkylliset vaikutukset sarveiskalvoon mitataan seuraavilla menetelmillä: i) valo läpikulun (transmission) vähentyminen (sameus) ja ii) natriumfluoreseiini-väriaineen lisääntynyt siirtyminen silmään (läpäisevyys). Testikemikaalille altistuksen jälkeen tehtyjä sarveiskalvon sameus- ja läpäisevyysarviointeja tarkastellaan yhdessä siten, että voidaan johtaa *in vitro -ärsyttävyysarvo* (*In vitro* Irritancy Score, IVIS), jonka avulla luokitellaan testikemikaalin ärsyttävyystaso.

Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

Tämä testimenetelmä perustuu ICCVAMin ICE-testimenetelmäprotokollaan (6) (7), joka kehitettiin alun perin *In vitro* -tieteiden instituutin (IIVS) protokollasta ja INVITTOX-protokollasta 124 saatujen tietojen pohjalta (8). Viimeksi mainittua käytettiin Euroopan yhteisöjen rahoittamassa validointia edeltävässä tutkimuksessa vuosina 1997–1998. Molemmat protokollat perustuivat BCOP-testimenetelmään, jonka raportoivat ensimmäisenä Gautheron *et al*. (9)

BCOP-testimenetelmää voidaan YK:n GHS-järjestelmän mukaan vakavan silmävaurion aiheuttavaksi kemikaaliksi määritettyjen kemikaalien eli YK:n GHS-luokkaan 1 luokiteltujen kemikaalien tunnistamiseen (4). Tähän käyttötarkoitukseen käytettynä BCOP-testimenetelmän yleinen tarkkuus on 79 % (150/191), väärien positiivisten tulosten osuus 25 % (32/126) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 14 % (9/65) verrattuna kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testimenetelmällä saatuihin tietoihin luokiteltuna YK:n GHS-luokitusjärjestelmän mukaisesti (3) (ks. lisäys 2, taulukko 1). Kun tiettyihin kemiallisiin luokkiin (kuten alkoholit, ketonit) tai fysikaalisiin luokkiin (kuten kiintoaineet) kuuluvat testikemikaalit poistetaan tietokannasta, BCOP-testimenetelmän yleinen tarkkuus on 85 % (111/131), väärien positiivisten tulosten osuus 20 % (16/81) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 8 % (4/50) luokiteltuna YK:n GHS-luokitusjärjestelmän mukaisesti

▼M7

(3). BCOP-testimenetelmän mahdolliset puutteet vakavan silmävaurion aiheuttavien kemikaalien tunnistamisessa (YK:n GHS-luokka 1) johtuvat validointitietokannassa havaittujen alkoholien ja ketonien korkeasta väärien positiivisten tulosten määrästä ja kiintoaineiden korkean väärien negatiivisten tulosten määrästä (1) (2) (3). Koska kaikkia alkoholeja ja ketoneja ei kuitenkaan yliennusteta BCOP-testimenetelmässä, ja jotkin tunnistetaan oikein YK:n GHS-luokkaan 1 kuuluviksi, näiden orgaanisten funktionaalisten ryhmien ei katsota olevan testimenetelmän soveltamisalan ulkopuolella. Testimenetelmän käyttäjä voi päättää, onko alkoholien tai ketonien mahdollinen yliedustus hyväksyttävissä vai onko todistusnäytön perusteella tehtävä lisätestejä. Kiintoaineiden väärien negatiivisten tulosten osalta on huomattava, että kiintoaineet voivat aiheuttaa Draizen *in vivo* -silmä-ärsytystestissä erilaisia vaihtuvia ja äärimmäisiä altistumisolosuhteita, mistä voi aiheutua epäolennaisia johtopäätöksiä niiden todellisesta ärsyttävyydestä (10). On myös syytä huomata, että mikään ICCVAMin validointitietokannassa havaituista vakavan silmävaurion aiheuttavia kemikaaleja (YK:n GHS-luokkaa 1) koskevista vääristä negatiivisista tuloksista (2) (3) ei ollut sellainen, jossa IVIS-arvo olisi ollut ≤ 3, mikä on vaatimus sille, että testikemikaalin luokaksi voidaan määrittää ”ei YK:n GHS-luokitusta”. BCOP-testin väärät negatiiviset tulokset eivät tässä haittaa senkään vuoksi, koska kaikki testikemikaalit, joiden testituloksena on 3 < IVIS ≤ 55 testattaisiin myöhemmin muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä tai viimeisenä vaihtoehtona kaneilla sääntömääräisistä vaatimuksista riippuen käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja todistusnäytön arviointia. Koska jotkin kiinteät kemikaalit tunnistetaan BCOP-testimenetelmässä oikein YK:n GHS-luokkaan 1 kuuluviksi, tämän fysikaalisen olomuodon ei katsota olevan testimenetelmän soveltamisalan ulkopuolella. Tutkijat voisivat kuitenkin harkita tätä testimenetelmää kaikentyyppisille kemikaaleille, jolloin IVIS-arvon > 55 katsottaisiin viittaavan vakavaan silmävaurioon, jolloin kemikaali olisi luokiteltava ilman lisätestausta YK:n GHS-luokkaan 1. Alkoholeilla ja ketoneilla saatuihin positiivisiin tuloksiin olisi kuten sanottu kuitenkin suhtauduttava varovaisesti mahdollisesti yliennustuksen vaaran takia.

BCOP-testimenetelmää voi käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta sellaisena, kuin ne on määritetty YK:n GHS-järjestelmässä (4). Tähän käyttötarkoitukseen käytettynä BCOP-testimenetelmän yleinen tarkkuus on 69 % (135/196), väärien positiivisten tulosten osuus 69 % (61/89) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 0 % (0/107) verrattuna kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testimenetelmällä saatuihin tietoihin luokiteltuna YK:n GHS-luokitusjärjestelmän mukaisesti (3) (ks. lisäys 2, taulukko 2). Väärien negatiivisten tulosten määrä (*in vivo* -testin kemikaalit, joilla ei YK:n GHS-luokitusta ja joiden IVIS-arvo on >3, ks. 47 kohta) on huomattavan suuri, mutta se ei haittaa tässä, koska kaikki testikemikaalit, joiden testituloksena on 3 < IVIS ≤ 55 testattaisiin myöhemmin muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä tai viimeisenä vaihtoehtona kaneilla sääntömääräisistä vaatimuksista riippuen käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja todistusnäytön arviointia. BCOP-testimenetelmässä ei ole havaittu erityisiä puutteita alkoholien, ketonien ja kiintoaineiden testauksessa, kun tarkoituksena on tunnistaa kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta sellaisena, kuin ne on määritetty YK:n GHS-järjestelmässä (3). Tutkijat voisivat kuitenkin harkita tätä testimenetelmää kaikentyyppisille kemikaaleille, jolloin negatiivisen tuloksen (IVIS ≤ 3) katsottaisiin viittaavan siihen, että kemikaali ei vaadi luokitusta (”ei YK:n GHS-luokitusta”). Koska BCOP-testimenetelmällä voidaan tunnistaa oikein vain 31 % sellaisista kemikaaleista, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, tämän testimenetelmän ei pitäisi olla ensisijainen menetelmä alhaalta ylös suuntautuvan lähestymistavan ensimmäisenä testinä (5), jos käytettävissä on muita validoituja ja hyväksyttyjä *in vitro* -menetelmiä, joiden herkkyys on yhtä korkea ja erittelykyky korkeampi.

▼M7

BCOP-validointitietokanta sisälsi yhteensä 113 ainetta ja 100 seosta (2) (3). BCOP-testausmenetelmää pidetään siten sopivana sekä aineiden että seosten testaukseen.

BCOP-testimenetelmää ei suositella sellaisten testikemikaalien tunnistamiseen, jotka olisi luokiteltava silmiä ärsyttäväksi (YK:n GHS-luokka 2 tai luokka 2A) tai sellaisten testikemikaalien, jotka olisi luokiteltava lievästi silmiä ärsyttäväksi (YK:n GHS-luokka 2B), koska huomattava määrä YK:n GHS-luokan 1 kemikaaleja luokitellaan liian alhaiseen GHS-luokkaan 2, 2A tai 2B, ja kemikaalit, joille ei ole YK:n GHS-luokitusta, luokitellaan liian korkeaan GHS-luokkaan 2, 2A tai 2B (2),(3). Tätä varten saattaa olla tarpeen tehdä lisää testejä muilla soveltuvilla menetelmillä.

Kaikissa naudan silmiä ja sarveiskalvoja käyttävissä menettelyissä olisi noudatettava testauslaitoksen määräämiä eläinperäisten materiaalien (muun muassa muttei ainoastaan kudosten ja kudosnesteiden) käsittelyä koskevia sääntöjä. Suositellaan yleismaailmallisia laboratorioissa noudatettavia ennaltavarautumiskäytänteitä (11).

Vaikka BCOP-testimenetelmässä ei tarkastellakaan sidekalvon ja värikalvon vaurioita, siinä tutkitaan vaikutuksia sarveiskalvoon, jotka ovat YK:n GHS-luokituksen kannalta merkittävin *in vivo* -tekijä. BCOP-testimenetelmässä ei *sinänsä* voida arvioida sarveiskalvovaurioiden palautuvuutta. Kaninsilmätutkimusten perusteella on myös ehdotettu, että sarveiskalvovaurion alkusyvyyden avulla voidaan tunnistaa jotkin palautumattomat vaikutukset (12). Tarvitaan kuitenkin lisää tieteellistä tietoa siitä, miten syntyvät ne palautumattomat vaikutukset, jotka eivät liity suureen alkuvaurioon. BCOP-testimenetelmällä ei voida myöskään arvioida sitä, missä määrin silmäaltistukseen voi liittyä systeemistä toksisuutta.

Tätä testimenetelmää päivitetään aika ajoin sitä mukaa, kun saadaan uusia tietoja. Esimerkiksi histopatologiset tutkimukset voivat olla hyödyllisiä, jos sarveiskalvon vauriota on luonnehdittava tarkemmin. Kuten OECD:n ohjeasiakirjassa nro 160 (13) esitetään, käyttäjiä kehotetaan säilyttämään sarveiskalvot ja valmistelemaan histopatologisia näytteitä, joiden perusteella voidaan laatia tietokanta ja päätösperusteet, joiden avulla voidaan parantaa tämän testimenetelmän tarkkuutta.

Kun laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 3 mainittuja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratorio voi käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä BCOP-testin suorituksessa ennen kuin se toimittaa BCOP-testimenetelmästä saatuja tietoja sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

BCOP-testimenetelmä on elinmalli, joka mahdollistaa naudan sarveiskalvon tavanomaisten fysiologisten ja biokemiallisten toimintojen lyhytaikaisen ylläpitämisen *in vitro* -oloissa. Testikemikaalin aiheuttamaa vauriota arvioidaan tässä menetelmässä mittaamalla muutokset sarveiskalvon sameudessa ns. opasitometrillä ja muutokset läpäisevyydessä näkyvää valoa mittaavalla spektrofotometrillä. Molempia mittauksia käytetään IVIS-arvon laskemiseen. IVIS-arvon avulla osoitetaan aineelle *in vitro* -ärsyttävyyteen perustuva vaaraluokituskategoria, jotta voidaan ennustaa testiaineen *in vivo* -silmä-ärsytyskyky (ks. päätösperusteet, 48 kohta).

BCOP-testimenetelmässä käytetään vasta teurastetuista naudoista saaduista silmistä eristettyjä sarveiskalvoja. Sarveiskalvon sameus mitataan sinä valomääränä, joka kulkee sarveiskalvon läpi. Läpäisevyys mitataan sinä määränä natriumfluoreseiini-väriainetta, joka imeytyy koko sarveiskalvon läpi ja joka mitataan takakammiossa olevassa mediumissa (väliaineessa). Testikemikaalit annostellaan

▼M7

sarveiskalvon epiteelipinnalle lisäämällä sitä sarveiskalvotelineen etukammioon. Lisäyksessä 4 on kuvaus ja kaavio BCOP-testimenetelmässä käytetystä sarveiskalvotelineestä. Sarveiskalvotelineitä saa kaupallisesti eri lähteistä, tai ne voi rakentaa itse.

Naudan silmien lähde ja eläinten ikä sekä eläinlajin valinta

Teurastamoihin tuodut nautaeläimet teurastetaan useimmiten käytettäväksi ihmisravinnoksi tai muihin kaupallisiin tarkoituksiin. BCOP-testimenetelmään voidaan käyttää vain sarveiskalvoja, jotka on saatu terveistä, ihmisravinnoksi kelpaavista eläimistä. Koska nautaeläinten paino vaihtelee paljon riippuen rodusta, iästä ja sukupuolesta, ei anneta mitään suositusta siitä, minkä painoisia eläinten olisi oltava teurastushetkellä.

Sarveiskalvojen mitat voivat vaihdella käytettäessä eri ikäisistä eläimistä saatuja silmiä. Yli kahdeksan vuoden ikäisistä eläimistä saatujen sarveiskalvojen halkaisija vaakasuunnassa on yleensä >30,5 mm ja sarveiskalvon keskiosan paksuus (CCT) ≥ 1100 μm, kun taas alle viiden vuoden ikäisten sarveiskalvon halkaisija on 28,5 mm ja CCT < 900 μm (14). Tästä syystä ei yleensä käytetä silmiä, jotka on saatu yli 60 kuukauden ikäisistä eläimistä. Perinteisesti ei ole käytetty alle 12 kuukauden ikäisten nautojen silmiä, koska silmien kehitys on vielä kesken ja sarveiskalvo on huomattavasti ohuempi ja sen halkaisija pienempi kuin täysikasvuisten eläinten sarveiskalvon. Nuorista eläimistä (*eli* 6–12 kuukautta vanhoista) saatuja sarveiskalvoja voidaan käyttää, koska siihen liittyy joitakin etuja. Niitä saa helpommin, ikävaihtelu on pienempi, ja vaara työntekijöiden altistumisesta naudan spongiformiselle enkefalopatialle on pienempi (15). Koska olisi hyödyllistä arvioida lisää sarveiskalvon koon tai paksuuden vaikutusta sarveiskalvon reagoimiseen syövyttäviin ja ärsyttäviin kemikaaleihin, käyttäjiä kehotetaan raportoimaan niiden eläinten arvioitu ikä ja/tai paino, joista tutkimuksessa käytetyt sarveiskalvot on saatu.

Silmien kerääminen ja niiden kuljetus laboratorioon

Teurastamon henkilökunta kerää silmät. Silmien mekaanisten ja muiden vaurioiden ehkäisemiseksi silmät olisi poistettava silmästä mahdollisimman pian kuoleman jälkeen, ja ne olisi pantava jäähdytykseen heti silmämunasta poistamisen jälkeen ja kuljetuksen ajaksi. Jotta silmät eivät altistuisi mahdollisesti ärsyttäville kemikaaleille, teurastamon työntekijät eivät saisi käyttää detergenttejä huuhtoessaan eläimen päätä.

Silmät olisi upotettava kokonaan jäähdytettyyn Hanksin suolaliuokseen (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) sopivankokoisessa astiassa ja kuljetettava laboratorioon sellaisella tavalla, että bakteerikontaminaatio tai muut vauriot ovat mahdollisimman pieniä. Koska silmät kerätään teurastuksen yhteydessä, niihin saattaa roiskua verta ja muita biologisia aineita, kuten bakteereja ja muita pieneliöitä. Siksi on tärkeää varmistaa, että kontaminaatioriski on mahdollisimman pieni. *Esimerkiksi* astia, jossa silmät ovat, on pidettävä jäähauteessa, ja kuljetusta varten käytettävään HBSS:ään on lisättävä antibiootteja (esim. penisilliiniä 100 IU/ml ja streptomysiiniä 100 μg/mL]).

Silmien keräämisen ja BCOP-testin tekemisen välisen ajan pitäisi olla mahdollisimman lyhyt (keräys ja käyttö mieluiten samana päivänä), ja pitäisi osoittaa, etteivät määritystulokset ole sen takia epäluotettavia. Nämä tulokset perustuvat silmien valintaperusteisiin sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden vasteisiin. Kaikkien määrityksessä käytettyjen silmien olisi oltava peräisin samasta tiettynä päivänä kerätystä silmäryhmästä.

BCOP-testissä käytettävien silmien valintaperusteet

Heti kun silmät saapuvat laboratorioon, tutkitaan huolellisesti, onko niissä vikoja, kuten lisääntynyttä sameutta, naarmuja ja verisuonittumista. Testissä saa käyttää vain sellaisista silmistä saatuja sarveiskalvoja, joissa ei ole tällaisia vikoja.

▼M7

Kaikkien sarveiskalvojen laatua arvioidaan myös määrityksen myöhemmissä vaiheissa. Sarveiskalvot, joiden sameus on tunnin tasapainottumisajan jälkeen yli seitsemän sameusyksikköä tai opasitometrin ja sarveiskalvotelineen vastaavaa yksikköä, on hylättävä (HUOMAUTUS: opasitometri olisi kalibroitava sameusyksikköjen määrittelemiseen käytettävien sameusstandardien mukaisesti, ks. lisäys 4).

Kussakin käsittelyryhmässä (testikemikaali, samaan aikaan tehtävät negatiiviset ja positiiviset kontrollit) on oltava vähintään kolme silmää. BCOP-testauksessa pitäisi negatiiviseen kontrolliin käyttää kolme sarveiskalvoa. Koska kaikki sarveiskalvot leikataan kokonaisesta silmämunasta ja asetetaan sarveiskalvokammioihin, voi käsittelystä aiheutua vahinkoa, joka vaikuttaa yksittäisen sarveiskalvon sameuteen ja läpäisevyyteen (myös negatiivisessa kontrollissa). Negatiivisista kontrollisarveiskalvoista saatuja sameus- ja läpäisevyysarvoja käytetään lisäksi IVIS-laskelmissa korjaamaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja positiivisella kontrollilla käsiteltyjen sarveiskalvojen sameus- ja läpäisevyysarvoja.

MENETTELY

Silmien valmistelu

Virheettömät sarveiskalvot leikataan siten, että niihin jää 2–3 mm:n reuna kovakalvoa, mikä helpottaa myöhempää käsittelyä. Varotaan vahingoittamasta sarveiskalvon epiteeliä ja endoteeliä. Eristetyt sarveiskalvot asetetaan erikoistelineisiin, joissa on etu- ja takaosasto. Nämä ovat kosketuksissa sarveiskalvon epiteelipuoleen (etukammio) ja endoteelipuoleen (takakammio). Molemmat kammiot täytetään ylimäärin esilämmitetyllä Eaglen Minimum Essential Medium (EMEM) -viljelynesteellä (mediumilla), jossa ei ole fenolipunaa (takakammio ensin) ja varmistetaan, ettei muodostu kuplia. Laitteen annetaan tasapainottua 32 ± 1 celsiusasteessa vähintään tunnin, jotta sarveiskalvot tasapainottuvat mediumin kanssa ja niiden metabolinen toiminta palautuu normaaliksi (mikäli mahdollista). Sarveiskalvon pinnan lämpötila *in vivo* on noin 32 °C.

Tasapainottumisjakson jälkeen molempiin kammioihin lisätään tuoretta esilämmitettyä EMEM:iä, jossa ei ole fenolipunaa, ja kustakin sarveiskalvosta otetaan sameuden perustasolukema. Sarveiskalvot, joissa ilmenee makroskooppista kudosvauriota (kuten naarmuja, pigmentaatiota tai verisuonittumista) tai joiden sameus on yli seitsemän sameusyksikköä tai opasitometrin ja sarveiskalvotelineen vastaavaa yksikköä, on hylättävä. Negatiiviseksi kontrolliryhmäksi (tai liuotinkontrolliryhmäksi) valitaan vähintään kolme sarveiskalvoa. Muut sarveiskalvot jaetaan käsittelyryhmään ja positiivisen kontrollin ryhmään.

Koska veden lämpökapasiteetti on suurempi kuin ilman, vedellä saadaan tasaisempi inkubaatiolämpötila. Siksi suositellaan vesihauteen käyttöä sarveiskalvotelineen ja sen sisällön pitämiseksi 32 ± 1 celsiusasteessa. Kuitenkin myös ilmainkubaattoreita voidaan käyttää, kunhan huolehditaan siihen, että lämpötila pysyy vakaana (esimerkiksi esilämmittämällä telineet ja mediumit).

Testikemikaalin annostelu

Käsittelyä varten on kaksi eri protokollaa, toinen nesteille ja pinta-aktiivisille aineille (kiinteät tai nestemäiset) ja toinen kiinteille aineille, jotka eivät ole pinta-aktiivisia.

Nesteet testataan laimentamattomina. Puoliksi kiinteät aineet, voiteet ja vahat testataan tavallisesti kuten nesteet. Pinta-aktiiviset aineet testataan 10-prosenttisena liuoksena (w/v) 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa, tislatussa vedessä tai muussa liuottimessa, josta on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää. Jos laimennuksia muutetaan, on ne perusteltava. Pinta-aktiivisia aineita sisältävät

▼M7

teokset voidaan testata laimentamattomina tai sopivaksi pitoisuudeksi laimennettuna riippuen kysymykseen tulevasta *in vivo* -altistusskenaariosta. Jos pitoisuuksia muutetaan, on ne perusteltava. Sarveiskalvot altistetaan nesteille ja pinta-aktiivisille aineille 10 minuutin ajan. Jos altistusaikaa muutetaan, olisi se perusteltava tieteellisesti. Lisäyksessä 1 on pinta-aktiivisen aineen ja pinta-aktiivista ainetta sisältävän seoksen määritelmät.

Kiinteät aineet, jotka eivät ole pinta-aktiivisia, testataan tavallisesti 20-prosenttisena liuoksena (w/v) tai suspensiona 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa, tislatussa vedessä tai muussa liuottimessa, josta on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää. Joissakin olosuhteissa ja asianmukaisesti tieteellisesti perusteltuna kiinteitä aineita voidaan testata myös sellaisenaan annostelemalla niitä suoraan sarveiskalvon pinnalle avoimen kammion menetelmässä (ks. 32 kohta). Sarveiskalvot altistetaan kiinteille aineille neljän tunnin ajan. Kuten nesteiden ja pinta-aktiivisten aineiden tapauksessa, altistusajan muuttaminen on perusteltava tieteellisesti.

Käsittely voi olla erilaista riippuen testattavan aineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista, esimerkiksi siitä, onko kyseessä kiinteä aine, neste, viskoosi tai ei-viskoosi neste. Tärkeintä on varmistaa, että testikemikaali peittää riittävästi epiteelin pinnan ja että se voidaan huuhtelemalla poistaa riittävästi. Suljetun kammion menetelmää käytetään tavallisesti testattaville nestemäisille kemikaaleille, jotka vaihtelevat ei-viskoosista lievästi viskoosiin, kun taas avoimen kammion menetelmää käytetään tavallisesti puoliksi viskooseille ja viskooseille nestemäisille testikemikaaleille ja kiinteille aineille.

Suljetun kammion menetelmässä annostellaan etukammioon niin paljon testikemikaalia (750 µl), että se peittää sarveiskalvon epiteelipuolen. Annostelu tapahtuu kammion yläosassa olevien aukkojen kautta. Aukot suljetaan sitten tulpilla altistuksen ajaksi. On tärkeää varmistaa, että kukin sarveiskalvo altistetaan testiaineelle niin pitkäksi aikaa kuin on asianmukaista.

Avoimen kammion menetelmässä ikkunan lukitusrengas ja etukammion lasi-ikkuna poistetaan ennen käsittelyä. Kontrollia tai testikemikaalia (750 µl tai niin paljon, että testikemikaali peittää sarveiskalvon kokonaan) annostellaan suoraan sarveiskalvon epiteelipinnalle mikropipetillä. Jos testikemikaalia on vaikea annostella pipetillä, annostelua voidaan helpottaa siirtämällä testikemikaali positive displacement -pipettiin paineen avulla. Positive displacement -pipetin kärki työnnetään ruiskun annostelukärkeen niin, että aine voidaan siirtää displacement-pipetin kärkeen paineen avulla. Ruiskun mäntää painetaan samalla kun pipetin mäntää vedetään ylöspäin. Jos pipetin kärkeen ilmestyy ilmakuplia, testiaine puhalletaan ulos ja prosessi toistetaan, kunnes kärki saadaan täytettyä ilman ilmakuplia. Jos on tarpeen, voidaan käyttää tavallista ruiskua (ilman neulaa), koska sillä voidaan mitata tarkka tilavuus testikemikaalia, ja annostelu sarveiskalvon epiteelipinnalle on helpompaa. Annostelun jälkeen lasi-ikkuna pannaan paikalleen etukammion päälle, jotta järjestelmä on jälleen suljettu.

Inkubointi altistuksen jälkeen

Altistusajan jälkeen testikemikaali, negatiivinen kontrollikemikaali tai positiivinen kontrollikemikaali poistetaan etukammiosta ja epiteeli pestään vähintään kolmesti (tai kunnes testikemikaalia ei näy) EMEM:illä (jossa on fenolipunaa). Huuhteluun käytetään fenolipunaa sisältävää mediumia, koska fenolipunan värin vaihtumista voidaan seurata, kun halutaan määrittää happamien tai emäksisten testikemikaalien huuhtelun tehokkuus. Sarveiskalvoja pestään enemmän kuin kolme kertaa, jos fenolipuna on edelleen vääränvärinen (keltainen tai purppuranvärinen) tai jos testikemikaalia on vielä näkyvillä. Kun mediumissa ei ole enää

▼M7

testikemikaalia, sarveiskalvot pestään vielä kerran EMEM:illä (jossa ei ole fenolipunaa). EMEM-huuhtelua (ilman fenolipunaa) käytetään viimeiseksi sen varmistamiseksi, että fenolipuna on poistunut etukammiosta ennen sameusmittausta. Etukammio täytetään sitten uudelleen tuoreella EMEM:illä (ilman fenolipunaa).

Kun testikemikaali on neste tai pinta-aktiivinen aine, sarveiskalvoja inkuboidaan huuhtelun jälkeen vielä kaksi tuntia 32 ± 1 celsiusasteessa. Tietyissä olosuhteissa voi pitempi aika altistuksen jälkeen olla hyödyksi. Sitä voidaan harkita tapauskohtaisesti. Kiinteillä aineilla käsitellyt sarveiskalvot huuhdellaan perusteellisesti neljän tunnin altistuksen päätteeksi, mutta niitä ei tarvitse enää inkuboida enempää.

Kunkin sarveiskalvon sameus ja läpäisevyys kirjataan nesteille ja pinta-aktiivisille aineille altistuksen jälkeisen inkubaation jälkeen ja kiinteille aineille, jotka eivät ole pinta-aktiivisia aineita, neljän tunnin altistuksen jälkeen. Kutakin sarveiskalvoa tarkastellaan myös silmämääräisesti ja kirjataan merkitykselliset havainnot (esimerkiksi kudoksen kuoriutuminen, testikemikaalin jäämät, epätasainen sameusjakauma). Tällaiset havainnot voivat olla tärkeitä, sillä ne voivat näkyä opasitometrin lukemien vaihteluna.

Kontrollikemikaalit

Kussakin kokeessa on mukana samanaikaisesti määritettävät negatiiviset eli liuotin/kantaja-ainekontrollit ja positiiviset kontrollit.

Kun testataan 100-prosenttista nestemäistä ainetta, otetaan BCOP-määritykseen samanaikaisesti määritettävä negatiivinen kontrolli (esimerkiksi 0,9-prosenttinen natriumkloridiliuos tai tislattu vesi) sitä varten, että epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä voidaan havaita ja määrityksen päätepisteille saadaan perustaso. Näin varmistetaan myös, etteivät määritysolosuhteet aiheuta ärsytysvastetta tahattomasti.

Kun testataan laimennettua nestettä, pinta-aktiivista ainetta tai kiinteää ainetta, otetaan BCOP-määritykseen samanaikaisesti määritettävä liuotin/kantaja-ainekontrolliryhmä sitä varten, että epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä voidaan havaita ja määrityksen päätepisteille saadaan perustaso. Liuotinta/kantaja-ainetta saa käyttää vain, jos on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää.

Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan positiivisena kontrollina kemikaali, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen, jotta voidaan varmistaa testijärjestelmän vahingoittumattomuus ja sen moitteeton toiminta. Ärsytysvaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan määrittää.

Esimerkkejä nestemäisten testikemikaalien positiivisista kontrolleista ovat 100-prosenttinen etanoli tai 100-prosenttinen dimetyyliformamidi. Esimerkki kiinteiden testikemikaalien positiivisesta kontrollista on 20-prosenttisena liuoksena (w/v) oleva imitsadoli 0,9-prosenttisessa natriumkloridiliuoksessa.

Vertailukemikaalit ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyskykyä tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyskykyä tietyllä ärsytysvastealueella.

Mitatut päätepisteet

Sarveiskalvon sameus mitataan sinä valomääränä, joka kulkee sarveiskalvon läpi. Sarveiskalvon sameus mitataan kvantitatiivisesti opasitometrillä, jolla saadaan jatkuvalla asteikolla mitattuja sameusarvoja.

Läpäisevyys mitataan sinä määränä natriumfluoreseiini-väriainetta, joka imeytyy kaikkien sarveiskalvon solukerrosten (*ts.* sarveiskalvon ulkopinnan epiteelin ja sisäpinnan endoteelin) läpi. 1 ml natriumfluoreseiiniliuosta (4 mg/ml testattaessa nesteitä tai pinta-aktiivisia aineita tai 5 mg/ml testattaessa kiinteitä aineita, jotka eivät ole pinta-aktiivisia) lisätään sarveiskalvotelineen etukammioon, joka on kosketuksissa sarveiskalvon epiteelipuolen kanssa. Takakammiossa, joka on kosketuksissa sarveiskalvon endoteelipuolen kanssa, on tuoretta EMEM:iä. Telinettä

▼M7

inkuboidaan vaakasuorassa 90 ± 5 min 32 ± 1 celsiusasteessa. Takakammioon siirtyvän natriumfluoreseiinin määrä mitataan UV/VIS-spektrofotometrillä. 490 nanometrin aallonpituudella mitatut spektrofotometrin lukemat kirjataan optisena tiheytenä (OD490) tai absorbanssiarvoina, jotka mitataan jatkuvalla asteikolla. Fluoreseiiniläpäisevyysarvot määritetään käyttäen OD490-arvoja, jotka on mitattu spektrofotometrillä tavanomaisella 1 senttimetrin valotiellä.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää 96 kuopan kuoppalevyjen lukulaitetta, jos i) laitteen fluoreseiinin OD490 -arvojen mittausalue on lineaarinen; ja ii) 96 kuopan levyissä käytetään sellaista fluoreseiininäytteiden tilavuutta, jolla saadaan 1 cm:n valotiellä saatuja arvoja vastaavat OD490 -arvot (tämä saattaa edellyttää, että kuoppa täytetään kokonaan [tavallisesti 360 µl).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

Kun sameusarvot ja keskimääräiset läpäisevyysarvot (OD490) on korjattu taustan sameuden ja negatiivisen kontrollin läpäisevyyden OD490-arvojen suhteen, yhdistetään kunkin käsittelyryhmän sameuden keskiarvot ja läpäisevyyden keskimääräiset OD490-arvot kokemusperäiseen kaavaan, josta lasketaan kullekin käsittelyryhmälle *in vitro* -ärsytysaste (IVIS) seuraavasti:

IVIS = sameuden keskiarvo + (15 × keskimääräinen läpäisevyyden OD490-arvo)

Sina *et al*. (16) ovat raportoineet, että tämä kaava on johdettu heidän laboratoriossaan ja laboratorioidenvälisissä tutkimuksissa. Monilaboratoriotutkimuksessa 36 yhdisteen sarjalle saaduille tuloksille tehtiin monimuuttuja-analyysi, jossa määritettiin paras yhtälö *in vivo* ja *in vitro* saatujen tuloksien välille. Kahden eri yhtiön tutkijat toistivat analyysin ja saivat lähes samat yhtälöt.

Sameus- ja läpäisevyysarvoja olisi arvioitava myös erikseen, jotta nähdään, aiheuttaako testikemikaali syövytystä tai vakavaa ärsytystä vain yhden päätepisteen määrityksessä (ks. päätösperusteet).

Päätösperusteet

Seuraavassa on esitetty IVIS-raja-arvot, joiden avulla voidaan tunnistaa sellaiset kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (YK:n GHS-luokka 1), sekä kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (kemikaalit, joilla ei ole YK:n GHS-luokitusta):

IVIS	YK:n GHS
≤ 3	Ei luokitusta
> 3; ≤ 55	Ennusteita ei voida tehdä
> 55	Luokka 1

Tutkimuksen hyväksymisperusteet

Testiä pidetään hyväksyttävänä, jos positiivisella kontrollilla saadaan IVIS-arvo, joka on kahden standardipoikkeaman sisällä senhetkisestä pitkän aikavälin keskiarvosta, joka on päivitettävä vähintään kolmen kuukauden välein tai joka kerta kun sellaisissa laboratorioissa, joissa testejä tehdään vain harvoin (*eli* vähemmän kuin kerran kuussa) saadaan hyväksytty testi. Negatiivisista tai liuotin/kantaja-ainevasteista saatujen sameus- ja läpäisevyysarvojen pitäisi olla pienemmät kuin vahvistetut sameuden ja läpäisevyyden taustaraja-arvot naudan sarveiskalvolle, jota on käsitelty negatiivisilla tai liuotin/kantaja-ainekontrolleilla. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä vähintään kolme

▼M7

sarveiskalvoa käsittävässä testiajossa. Jos ensimmäisen testiajon tulokset ovat moniselitteisiä, on harkittava toista testiajoa (se ei kuitenkaan ole välttämätöntä) ja kolmatta, jos ensimmäisen ja toisen testiajon keskimääräiset IVIS-tulokset ovat ristiriitaisia. Ensimmäisen testiajon tuloksia pidetään moniselitteisinä, jos kolmen sarveiskalvon ennusteet ovat ristiriitaisia, kuten

— jos kaksi kolmesta sarveiskalvosta tuotti kaikkien kolmen sarveiskalvon keskiarvosta poikkeavia ennusteita TAI

— jos yksi kolmesta sarveiskalvosta tuotti kaikkien kolmen sarveiskalvon keskiarvosta poikkeavan ennusteen JA poikkeava ennuste oli > 10 IVIS-yksikköä kynnysarvosta 55.

— Jos uusi testiajo vahvistaa alkuperäisen testiajon (keskimääräiseen IVIS-arvoon pohjautuvan) ennusteen, lopullinen päätös voidaan tehdä ilman lisätestejä. Jos uusi testiajo tuottaa alkuperäisestä testiajosta poikkeavan (keskimääräiseen IVIS-arvoon pohjautuvan) ennusteen, yksiselitteisten ennusteiden saamiseksi ja testikemikaalin luokittelemiseksi olisi tehtävä kolmas ja viimeinen testiajo. Jos jokin testiajo tuottaa YK:n GHS-luokan 1 ennusteen, luokitus ja merkintä voidaan tehdä ilman lisätestejä.

Testiraportti

Testiraportissa olisi annettava seuraavat tiedot, jos ne ovat merkityksellisiä tutkimuksen suorittamiselle:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— kemiallinen nimi (nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos ne tunnetaan CAS-numero, jos se tunnetaan

— testi/kontrollikemikaalin puhtausaste tai koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla

— testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten olomuoto, haihtuvuus, pH, stabiilius, kemiallinen luokka ja vesiliukoisuus

— tarvittaessa testi- tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (*esimerkiksi* lämmittäminen tai jauhaminen)

— stabiilius, jos se tiedetään.

Tutkimuksen teettäjää ja testauslaitosta koskevat tiedot:

— Tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja.

Testiolosuhteet:

— käytetty opasitometri (esim. malli ja erittelyt) ja välineiden kokoonpano

— sameuden ja läpäisevyyden mittaukseen käytettyjen laitteiden (esimerkiksi opasitometrin ja spektrofotometrin) kalibrointitiedot, jotta voidaan varmistaa mittausten lineaarisuus

— käytettyjen sarveiskalvotelineiden tyyppi (esim. malli ja erittelyt)

▼M7

— kuvaus muista käytetyistä laitteista

— menettely, jolla testimenetelmän integriteetti (*eli* tarkkuus ja luotettavuus) ajan suhteen varmistetaan (esimerkiksi pätevöittämiseen käytettyjen aineiden säännöllinen testaus).

Hyväksyttävän testin perusteet

— hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen positiivisten ja negatiivisten kontrollien vaihteluvälit

— tapauksen mukaan hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen vertailukontrollien vaihteluvälit.

Silmien kerääminen ja valmistelu

— silmien lähteen tunnistustiedot (*esim.* laitos, josta ne on kerätty)

— sarveiskalvon halkaisija, jonka perusteella määritetään sen eläimen ikä, josta se on peräisin, sekä sen soveltuvuus testiin

— silmien säilytys- ja kuljetusolosuhteet (kuten (kuten silmien keräyspäivä ja kellonaika, aika siihen asti kun testi aloitettiin, kuljetuksessa käytetty medium ja lämpötilaolot, mahdollisesti käytetyt antibiootit)

— naudan sarveiskalvojen valmistelu ja paikalleen asettaminen, myös niiden laatua koskeva lausuma, sarveiskalvotelineen lämpötila ja testauksessa käytettävien sarveiskalvojen valintaperusteet.

Testimenettely

— rinnakkaisnäytteiden määrä

— käytetyt negatiiviset ja positiiviset kontrollit (ja mahdolliset liuotin- ja vertailukontrollit)

— käytettyjen testikemikaalien pitoisuus (pitoisuudet), annostelu, altistusaika ja altistuksen jälkeinen inkubaatioaika

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus tutkimuksen hyväksymiskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista

— kuvaus käytetyistä päätöskriteereistä.

Tulokset

— taulukko tuloksista, jotka on saatu yksittäisistä testinäytteistä (esimerkiksi sameus ja OD490-arvot ja lasketut IVIS-arvot testikemikaaleille sekä positiivisille, negatiivisille ja vertailukontrolleille [jos mukana] taulukkomuodossa, myös tulokset toistetuista kaksoismäärityksistä tapauksen mukaan, sekä keskiarvot ± standardipoikkeamat kullekin kokeelle

— kuvaus muista havaituista vaikutuksista

— mahdollinen *in vitro* -testillä laskettu YK:n GHS-järjestelmän mukainen luokitus.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

▼**M7**

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report – *In vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Current Validation Status of *In vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(3) OECD (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

(4) YK (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York and Geneva: United Nations. Saatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html.

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Validation Status of *In vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in vitro* 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. ja the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Saatavilla osoitteessa http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf.

▼**M7**

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Toxicol.* 36:106-117.

(13) OECD (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, nro 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. ja Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. ja Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D. ja Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

(17) Tässä liitteessä oleva B.5 kappale Acute eye irritation/corrosion.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm.

(19) OECD (1998) Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (tarkistettu 1997).

Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aine: Alkuaineet ja niiden yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, jotka sisältävät kaikki pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja tuotantotoiminnassa muodostuvat epäpuhtaudet lukuun ottamatta liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta (4).

Ei luokiteltu: Kemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen (YK:n GHS-luokka 2, 2A tai 2B) tai vakavan silmävaurion (YK:n GHS-luokka 1) osalta. Sama kuin ”Ei YK:n GHS-luokitusta”.

Ei YK:n GHS-luokitusta: Kemikaalit, joita ei voida luokitella YK:n GHS-järjestelmän luokan 1 tai 2 (2A tai 2B) kemikaaleiksi. Sama kuin ”Ei luokiteltu”.

***In vitro* ärsytysarvo (*In vitro* Irritancy Score, IVIS)**: BCOP-testimenetelmässä käytetty empiirisesti johdettu kaava, jossa kunkin käsittelyryhmän sameuden keskiarvot ja läpäisevyyden keskiarvot yhdistetään yhteen *in vitro* -arvoon. *IVIS* = sameuden keskiarvo + (15 × keskimääräinen läpäisevyysarvo)

Jäsentävä lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita. Se aloitetaan määrittämällä vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit (positiivinen tulos) ja muut kemikaalit (negatiivinen tulos).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Kokoava lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaalia ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella (negatiivinen tulos) ja muut kemikaalit (positiivinen tulos).

Korjautuvat vaikutukset silmiin: Ks. ”Silmä-ärsytys”.

Liuotin/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Opasitometri: Laite, jolla mitataan sarveiskalvon sameutta arvioimalla kvantitatiivisesti valon kulkeminen sarveiskalvon läpi. Opasitometrissä on tyypillisesti kaksi osastoa, joista kussakin on oma valonlähde ja valokenno. Toista osastoa käytetään käsitellylle sarveiskalvolle ja toista laitteen kalibrointiin ja nollaamiseen. Halogeenilampun valoa lähetetään kontrolliosaston läpi (tyhjä kammio, jossa ei ole ikkunaa eikä nestettä) valokennoon ja verrataan valoon, joka on lähetetty näytteelle käytetyn osaston (jossa on sarveiskalvon sisältävä kammio) läpi valokennoon. Valokennoista saadun valon transmissioita verrataan, ja numeronäytöllä näytetään numeerinen sameuden arvo.

Pinta-aktiivinen aine: Aine, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita; tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena.

▼M7

Pinta-aktiivista ainetta sisältävä seos: Tämän testimenetelmän yhteydessä seos, joka sisältää yhden tai useamman pinta-aktiivisen aineen, jonka lopullinen pitoisuus on > 5 %.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty kemikaalilla, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Positiivinen vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Pysyvät vaikutukset silmiin: Ks. ”Vakava silmävaurio”.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

Sarveiskalvon läpäisevyys: Sarveiskalvon epiteelin vaurion mitta, jota varten määritetään kaikkien sarveiskalvon solukerrosten läpi menneen fluoreseiini-väriaineen määrä.

Sarveiskalvon sameus: Sarveiskalvon sameuden mitta, kun sarveiskalvo on altistettu testikemikaalille. Sarveiskalvon sameuden lisääntyminen merkitsee sarveiskalvon vauriota. Sameus voidaan arvioida subjektiivisesti Draizen kaninsilmätestillä tai objektiivisesti jollain laitteella, kuten ”opasitometrillä”.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta, jotka eivät reagoi keskenään (4).

Silmä-ärsytys: Silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, ja korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”Korjautuvat vaikutukset silmiin” ja ”YK:n GHS-luokka 2” (4).

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää testikemikaalin vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Vaiheittainen testausstrategia: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testikemikaalin ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvaurio tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka on seurausta testikemikaalin annostelusta silmän etupinnalle eikä korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”Pysyvät vaikutukset silmiin” ja ”YK:n GHS-luokka 1” (4).

▼M7

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On tärkeää huomata, että validoitu testi ei ehkä ole riittävän tarkka ja luotettava, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen.

Vertailukemikaali: Kemikaali, johon testikemikaalia verrataan. Vertailuaineella olisi oltava seuraavat ominaisuudet: i) se saadaan vakaana pysyvästä ja luotettavasta lähteestä; ii) sen rakenne ja toiminta ovat samankaltaisia testattavan aineryhmän kanssa; iii) sen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tunnetaan; iv) se tukee tunnetuista vaikutuksista saatuja tietoja, ja v) sen vaikutuskyky halutun vasteen vaihtelualueella tunnetaan.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Väärien negatiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Väärien positiivisten tulosten osuus on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattori.

YK:n GHS-luokka 1: Ks. ”Vakava silmävaurio”.

YK:n GHS-luokka 2: Ks. ”Silmä-ärsytys”.

YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (4).

▼M7

Lisäys 2

BCOP-TESTIMENETELMÄN ENNUSTAMISKYKY

Taulukko 1

BCOP-menetelmän ennustamiskyky vakavan silmävaurion aiheuttavien kemikaalien tunnistamisessa [YK:n GHS-luokka / EU:n CLP-asetuksen luokka 1 vs Ei-luokiteltu 1 (luokka 2 + ei luokiteltu); US EPA -luokka I vs Ei-luokiteltu I (luokka II + luokka III + luokka IV)]

Luokitus Järjestelmä	Nro	Tarkkuus		Herkkyys		Väärä negatiivinen		Spesifisyys		Väärä positiivinen	
		%	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro
YK:n GHS EU CLP	191	78,53	150/191	86,15	56/65	13,85	9/65	74,60	94/126	25,40	32/126
US EPA	190	78,95	150/190	85,71	54/63	14,29	9/63	75,59	96/127	24,41	31/127

Taulukko 2

BCOP-menetelmän ennustamiskyky sellaisten kemikaalien tunnistamisessa, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (”ei-ärsyttävät”) [YK:n GHS-luokka / EU:n CLP-asetuksen luokka Ei-luokiteltu vs Ei ei-luokiteltu (luokka 1 + luokka 2); US EPA -luokka IV vs Ei luokiteltu IV (luokka I + luokka II + luokka III)]

Luokitus Järjestelmä	Nro	Tarkkuus		Herkkyys		Väärä negatiivinen		Spesifisyys		Väärä positiivinen	
		%	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro	%	Nro
YK:n GHS EU CLP	196	68,88	135/196	100	107/107	0	0/107	31,46	28/89	68,54	61/89
US EPA	190	82,11	156/190	93,15	136/146	6,85	10/146	45,45	20/44	54,55	24/44

▼M7

Lisäys 3

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT KEMIKAALIT BCOP-TESTIMENETELMÄLLE

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, sen olisi osoitettava teknisen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen 13 kemikaalin silmävaarallisuusluokitus. Kemikaalit valittiin sen mukaan, että ne edustavat erilaisia vasteita silmävaaroihin perustuen tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testillä (TG 405) (17) ja YK:n GHS-luokitusjärjestelmää (*eli* luokkia 1, 2A, 2B tai ei luokiteltu) (4). Muita valintaperusteita olivat kemikaalien kaupallinen saatavuus, korkealaatuisten *in vivo* -tutkimustulosten saatavuus ja BCOP-testimenetelmällä saatujen korkealaatuisten *in vitro* -tulosten saatavuus. Tutkimustulokset ovat nähtävissä asiakirjoista Streamlined Summary Document (3) ja in the ICCVAM Background Review Document for the BCOP test method (2) (18).

Taulukko 1

Teknisen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut suositellut kemikaalit BCOP-testimenetelmälle

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus ([2])	BCOP-luokitus
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Luokka 1	Luokka 1
Klooriheksidiini	55-56-1	Amiini, amidiini	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Dibentsoyyli-L-viinihappo	2743-38-6	Karboksyylihappo, esteri	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Imidatsoli	288-32-4	Heterosyklinen	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Trikloorietikkahappo (30 %)	76-03-9	Karboksyylihapot	Neste	Luokka 1	Luokka 1
2,6-Diklooribentsoyylikloridi	4659-45-4	Asyylihalidi	Neste	Kategoria 2A	Tarkkoja/luotettavia ennusteita ei voida tehdä
Etyyli-2-metyyliasetoasetaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Neste	Luokka 2B	Tarkkoja/luotettavia ennusteita ei voida tehdä
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Luokka 2 ([3])	Tarkkoja/luotettavia ennusteita ei voida tehdä
EDTA, dikaliumsuola	25102-12-9	Amiinit, karboksyylihappo (suola)	Kiinteä	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu
Tween 20	9005-64-5	Esteri, polyeetteri	Neste	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu
2-merkaptopyrimidiini	1450-85-7	Asyylihalidi	Kiinteä	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu
Fenyylibutatsoni	50-33-9	Heterosyklinen	Kiinteä	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu

▼M7

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus ([2])	BCOP-luokitus
Polyoksietyleeni-23-lauryylieetteri (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkoholi	Neste	Ei luokiteltu	Ei luokiteltu

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

([1]) Kunkin testikemikaalin kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa http//www.nlm.nih.gov/mesh) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

([2]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä in vivo -testillä (OECD TG 405) (17) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää (4).

([3]) Se, luokitellaanko kemikaali luokkaan 2A vai 2B, riippuu siitää, miten YK:n GHS-järjestelmässä tulkitaan erotettavan nämä kaksi luokkaa, eli onko eläimiä, joilla on seitsemäntenä päivänä vaikutuksia, oltava yksi kolmesta vai kaksi kolmesta, jotta kemikaali voidaan luokitella luokkaan 2A. In vivo -tutkimukseen sisältyi kolme eläintä. Yhdellä eläimellä esiintynyttä sidekalvon punaisuutta lukuun ottamatta kaikki päätepisteet palautuivat nolla-arvoon viimeistään päivään 7 mennessä. Päivään 7 mennessä toipumattoman eläimen sidekalvon punaisuusarvo oli 1 (päivänä 7). Täydellinen toipuminen tapahtui päivänä 10.

▼M7

Lisäys 4

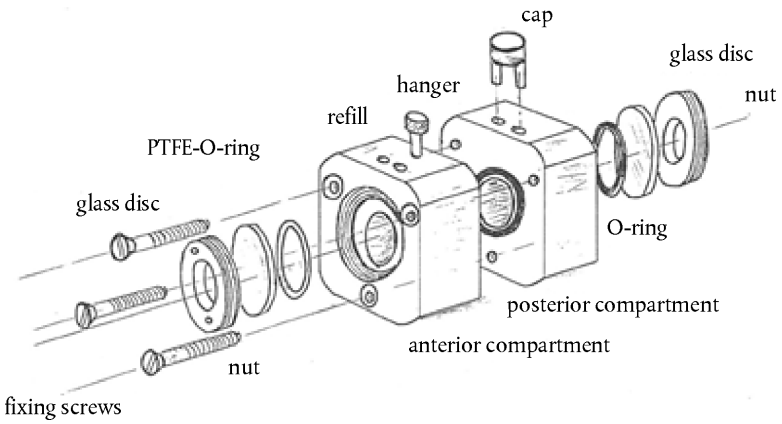
BCOP-TESTISSÄ KÄYTETTY SARVEISKALVOTELINE

BCOP-testissä käytetyt sarveiskalvotelineet valmistetaan reagoimattomasta aineesta (esimerkiksi polypropyleenistä). Telineissä on kaksi puolta (etu- ja takakammio) ja kaksi samanlaista lieriönmuotoista sisäkammiota. Kukin kammio on suunniteltu sellaiseksi, että siihen mahtuu noin 5 ml; kammion päässä on lasi-ikkuna, josta sameusmittaukset kirjataan. Kunkin sisäkammion halkaisija on 1,7 cm ja syvyys 2,2 cm ([1]). Takakammiossa on tiivisterengas vuotojen estämiseksi. Sarveiskalvo asetetaan endoteelipuoli alaspäin takakammion tiivisterenkaan päälle, ja etukammio asetetaan sarveiskalvon epiteelipuolen päälle. Kammiot kiinnitetään paikoilleen kolmella ruostumattomasta teräksestä valmistetulla ruuvilla, jotka sijaitsevat kammion ulkoreunoilla. Kunkin kammion päässä on lasi-ikkuna, joka voidaan poistaa, että sarveiskalvoon päästään helposti käsiksi. Lasi-ikkunan ja kammion välissä on tiivisterengas vuotojen estämiseksi. Medium ja testikemikaalit lisätään kammioon (ja poistetaan siitä) niiden yläosassa olevien kahden aukon kautta. Aukot suljetaan kumitulpilla käsittelyn ja inkubaation ajaksi. Sarveiskalvotelineen läpi kulkevan valon määrä saattaa muuttua, koska sisäkammioon reikiin tai lasi-ikkunoihin kerääntyvien tai niistä poistuvien kemiallisten jäämien voi vaikuttaa valon sirontaan ja heijastumiseen. Seurauksena voi olla sarveiskalvotelineen läpi kulkevan valon määrän perustason (ja vastaavasti sameuden perustasolukeman) kasvaminen ja väheneminen, mikä voi ilmetä odotettavien sarveiskalvon sameuden perustason alkumittausten huomattavina muutoksina (eli alussa mitattavat yksittäisissä sarveiskalvotelineissä olevan sarveiskalvojen sameusarvot voivat säännöllisesti poiketa yli kaksi tai kolme sameusyksikköä odotettavista perustasoarvoista). Kunkin laboratorion olisi harkittava tarkastusohjelman laatimista sarveiskalvotelineen läpi kulkevan valon muutosten arvioimiseksi testattavien kemikaalien luonteen ja kammioiden käyttötiheyden mukaan. Perustasoarvojen määrittämiseksi sarveiskalvotelineet voidaan ennen rutiinikäytön aloittamista tarkastaa mittaamalla sameuden perustasoarvot kammioista, jotka on täytetty mediumilla ja joissa ei ole sarveiskalvoja. Sarveiskalvotelineen läpi kulkevan valon määrä tarkastetaan säännöllisesti käyttöjaksojen aikana. Laboratorio voi määrittää testattavien kemikaalien, käyttötiheyden ja sarveiskalvon sameusarvojen perustasossa tapahtuvien muutosten perusteella itse, miten usein sarveiskalvoteline tarkastetaan. Jos sarveiskalvotelineen läpikulkevan valon määrässä ilmenee huomattavia muutoksia, sarveiskalvotelineen sisäpinta on aiheellista puhdistaa ja/tai kiillottaa tai vaihtaa uuteen.

([1]) Mitat ovat sarveiskalvotelineelle, jota käytetään 12–60 kuukauden ikäisille lehmille. Jos käytetään 6–12 kuukauden ikäisiä eläimiä, olisi teline suunniteltava niin, että kunkin kammion tilavuus on 4 ml ja kunkin sisäkammion halkaisija 1,5 cm ja syvyys 2,2 cm. Jos tehdään uusi, erilainen sarveiskalvoteline, on tärkeää huolehtia siitä, että altistetun sarveiskalvon pinta-alan suhde takakammion tilavuuteen on sama kuin käytettäessä tavanomaista sarveiskalvotelinettä. Tämä on välttämätöntä, jotta läpäisevyysarvot voidaan määrittää oikein IVIS-arvon laskemiseksi ehdotetulla kaavalla.

▼M7

Sarveiskalvoteline: räjäytyskuva



▼M7

Lisäys 5

OPASITOMETRI

Opasitometri on laite, jolla mitataan valon läpikulkua. Esimerkiksi BCOP-testimenetelmän validoinnissa käytettävän Electro Designin (Riom, Ranska) OP-KIT-laitteen halogeenilampusta lähetetään valoa kontrolliosaston läpi (tyhjä kammio, jossa ei ole ikkunaa eikä nestettä) valokennoon ja verrataan valoon, joka on lähetetty näytteelle käytetyn osaston (jossa on sarveiskalvon sisältävä kammio) läpi valokennoon. Valokennoista saadun valon transmissioita verrataan, ja numeronäytöllä näytetään numeerinen sameuden arvo. Sameusyksiköt määritetään. Muun tyyppisiä ja rakenteisia opasitometrejä (esimerkiksi sellaisia, joissa ei tarvitse mitata samanaikaisesti kontrolliosastoa ja näytteelle käytettyä osastoa) voidaan käyttää, jos ne antavat validoiduille laitteille todistetusti samanlaisia tuloksia.

Opasitometrillä pitäisi saada lineaarinen vaste sellaisella sameuslukema-alueella, joka kattaa ennustemallissa kuvatuille eri luokituksille käytetyt raja-arvot (ts. siihen arvoon saakka, joka määrittää syövyttävyyden ja/tai vakavan ärsyttävyyden). Jotta voidaan varmistaa, että lukemat ovat lineaarisia ja tarkkoja 75–80 sameusyksikköön saakka, on opasitometri kalibroitava sarjalla kalibraattoreita. Kalibraattorit asetetaan kalibrointikammioon (sarveiskalvokammion, joka on tarkoitettu kalibraattoreiden pitämiseen), ja ne luetaan opasitometrillä. Kalibrointikammio on suunniteltu sellaiseksi, että kalibraattorit ovat siinä suunnilleen samalla etäisyydellä valosta ja valokennosta kuin mihin sarveiskalvot asetettaisiin sameusmittausten ajaksi. Vertailuarvot ja alkuvaiheen asetuspisteet riippuvat käytettävästä laitteesta. Sameusmittausten lineaarisuus olisi vahvistettava soveltuvin (välinekohtaisin) menettelyin. Esimerkiksi Electro Designin (Riom, Ranska) OP-KIT-laitteessa opasitometri kalibroidaan ensin arvoon 0 sameusyksikköä käyttämällä kalibrointikammiota ilman kalibraattoria. Kalibrointikammioon asetetaan sitten peräkkäin kolme erilaista kalibraattoria ja mitataan sameudet. Kalibraattoreilla 1, 2 ja 3 pitäisi saada 5 prosentin tarkkuudella samat sameuslukemat kuin asetetut arvot 75, 150 ja 225 sameusyksikköä.

▼M7

B.48. **ERISTETYN KANAN SILMÄN KÄYTTÖÖN PERUSTUVA TESTIMENETELMÄ, JOLLA TUNNISTETAAN I) VAKAVIA SILMÄVAURIOITA AIHEUTTAVAT KEMIKAALIT JA II) KEMIKAALIT, JOITA EI TARVITSE LUOKITELLA SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVIEN SILMÄVAURIOIDEN OSALTA**

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 438 (2013). Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä (Isolated Chicken Eye, ICE) arvioitiin ICCVAMissa (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea) yhdessä Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen (ECVAM) ja Japanin vastaavan keskuksen (JaCVAM) kanssa vuosina 2006 ja 2010 (1) (2) (3). Ensimmäisessä arvioinnissa ICE-menetelmä vahvistettiin tieteellisesti pätevästi testimenetelmäksi, jota voidaan käyttää seulontatestinä sellaisten kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamiseksi, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (luokka 1), kuten Yhdistyneiden kansakuntien (YK) kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa luokitus- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) (2) (4) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) on määritelty ([1]). Toisessa arvioinnissa käsiteltiin ICE-menetelmän käyttöä seulontatestinä sellaisten kemikaalien tunnistamiseksi, joita ei ole YK:n GHS-järjestelmän (3) (4) nojalla luokiteltu silmä-ärsytystä tai vakavia silmävaurioita aiheuttaviksi. Validointitutkimuksen tulosten ja vertaisarviointilautakunnan suositusten perusteella pitäydyttiin alkuperäisessä suosituksessa, jonka mukaan ICE-menetelmää käytetään vakavia silmävaurioita aiheuttavien kemikaalien luokittelemiseen (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1), koska käytettävissä olevaa tietokantaa ei ole muutettu ICCVAMin alkuperäisen validoinnin jälkeen. Siinä vaiheessa ei annettu muita suosituksia ICE-menetelmän soveltamisalan laajentamiseksi myös muihin kategorioihin. Validointitutkimuksessa käytettyjen *in vitro*- ja *in vivo* -tulosjoukkojen uudelleenarvioinnissa keskityttiin arvioimaan ICE-menetelmän käytettävyyttä sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (5). Uudelleenarvioinnin tuloksena oli, että ICE-menetelmää voidaan käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmässä määritettyjen silmä-ärsytyksen ja vakavan silmävaurion osalta (4) (5). Testimenetelmä sisältää ICE-menetelmän käyttösuositukset ja -rajoitukset, jotka perustuvat näihin arviointeihin. OECD:n testiohjeen alkuperäisen vuoden 2009 version ja päivitetyn vuoden 2013 version väliset suurimmat erot ovat muun muassa ICE-menetelmän käyttö sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän mukaisesti, testiselosteen osien päivitys, lisäyksen 1 määritelmien päivitys ja lisäyksen 2 pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen kemikaalien päivitys.

On yleisesti tunnustettu, että lähitulevaisuudessa millään yksittäisellä silmä-ärsytystä mittaavalla *in vitro* -testillä tuskin voidaan korvata Draizen *in vivo* -silmätestiä, jolla pystytään ennustamaan kaikenlainen ärsytys, jota eri luokkiin kuuluvat kemikaalit voivat aiheuttaa. Draizen silmätesti saatetaan kuitenkin voida korvata yhdistelemällä strategisesti useita vaihtoehtoisia testimenetelmiä niin, että niistä muodostuu (vaiheittainen) testausstrategia (6). Jäsentävää lähestymistapaa (7) on tarkoitus käyttää silloin, kun kemikaalin odotetaan käytettävissä olevien tietojen perusteella olevan erittäin ärsyttävä, kun taas kokoavaa lähestymistapaa (7) käytetään silloin, kun kemikaalin odotetaan käytettävissä olevien tietojen perusteella aiheuttavan niin vähän silmä-ärsytystä, että sitä ei tarvitse luokitella. ICE-menetelmä on *in vitro* -testi, jota voidaan käyttää 8–10 kohdan

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

mukaisesti tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin kemikaalien luokittelemiseksi ja merkitsemiseksi silmiin kohdistuvien vaarojen osalta. Vaikka ICE-menetelmän ei katsota sellaisenaan korvaavan *in vivo* -kaninsilmätestiä, sitä suositellaan käytettävän ensimmäisenä testinä Scottin ja muiden (7) suosittelema jäsentävän lähestymistavan kaltaisissa testausstrategioissa tunnistamaan vakavia silmävaurioita aiheuttavia kemikaaleja. Nämä kemikaalit luokitellaan ilman lisätestausta YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1 (4). ICE-menetelmää suositellaan käytettävän myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta YK:n GHS-järjestelmässä (ei luokitusta) (4), ja siksi sitä voidaan käyttää ensimmäisenä testinä kokoavaa lähestymistapaa soveltavassa testausstrategiassa (7). Lopullisen luokituksen määrittämiseksi sellaisille kemikaaleille, joiden ei ennusteta aiheuttavan vakavia silmävaurioita tai joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen / vakavien silmävaurioiden osalta, on kuitenkin suoritettava lisätestejä (*in vitro* ja/tai *in vivo*). Lisäksi toimivaltaisilta sääntelyviranomaisilta tulisi pyytää ohjeita, ennen kuin ICE-menetelmää käytetään kokoavan lähestymistavan testausstrategiassa jonkin muun luokitusjärjestelmän kuin YK:n GHS-järjestelmän puitteissa.

Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testattavan kemikaalin vaarallisuus silmälle mittaamalla sen kykyä aiheuttaa toksisuutta irrotetussa kanan silmässä. Sarveiskalvoon kohdistuneet toksisuusvaikutukset mitataan i) määrittämällä sameus kvalitatiivisesti, ii) määrittämällä epiteelivaurio kvalitatiivisesti, kun silmään annostellaan fluoreseiiniä (fluoreseiinin retentio), iii) mittaamalla paksuuntuminen (turpoaminen) kvantitatiivisesti ja iv) arvioimalla pinnan makroskooppiset morfologiset vauriot kvalitatiivisesti. Sarveiskalvon sameus, turpoaminen ja vauriot arvioidaan testattavalle kemikaalille altistuksen jälkeen erikseen, minkä jälkeen ne yhdistetään, jotta niistä voidaan johtaa silmä-ärsytysluokitus.

Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

Tämä testimenetelmä perustuu OECD:n ohjeasiakirjassa 160 (8) ehdotettuun protokollaan, joka kehitettiin ICCVAMin kansainvälisen validointitutkimuksen perusteella (1) (3) (9). Tutkimukseen ovat osallistuneet vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalainen validointikeskus ECVAM, Japanin vastaava keskus ja Alankomaiden sovelletun luonnontieteen tutkimuslaitoksen (TNO) toksikologian ja sovelletun farmakologian elämän laatu -osasto. Protokolla perustuu julkaistuista protokollista ja TNO:n nykyisin käyttämästä protokollasta saatuihin tietoihin (10) (11) (12) (13) (14).

Tämän menetelmän validoinnin yhteydessä on testattu useita erilaisia kemikaaleja. Validointitutkimuksen empiirisessä tietokannassa on 152 kemikaalia, joista 72 on aineita ja 80 seoksia (5). Testimenetelmää voidaan soveltaa kiinteisiin aineisiin, nesteisiin, emulsioihin ja geeleihin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kaasuja ja aerosoleja ei ole vielä arvioitu validointitutkimuksessa.

ICE-menetelmää voidaan käyttää vakavia silmävaurioita aiheuttavien kemikaalien tunnistamisessa. Niitä ovat YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1 luokiteltavat kemikaalit (4). Kyseisessä käytössä on havaittu, että ICE-menetelmän haittana ovat alkoholien testauksessa saadut useat väärät positiiviset tulokset sekä kiinteiden aineiden ja pinta-aktiivisten aineiden testauksessa saadut useat väärät negatiiviset tulokset (1) (3) (9). Tässä yhteydessä vääristä negatiivisista tuloksista (eli YK:n GHS-järjestelmän luokkaa 1 ei tunnisteta YK:n GHS-järjestelmän luokaksi 1) ei kuitenkaan ole haittaa, koska kaikki negatiivisen tuloksen saaneet testikemikaalit

▼M7

testataan tämän jälkeen vähintään yhdellä muulla yhtä pätevällä *in vitro* -testillä tai viimeisenä vaihtoehtona sääntelyvaatimuksista riippuen kaneilla käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa, jossa sovelletaan todistusnäyttöön perustuvaa lähestymistapaa. On syytä panna merkille, että kiinteät aineet voivat johtaa Draizen *in vivo* -silmä-ärsyttävyystestissä vaihteleviin ja äärimmäisiin altistusolosuhteisiin, minkä vuoksi niiden todellisesta ärsyttävyydestä voidaan saada käyttökelvoton ennuste (15). Tutkijat voisivat harkita tämän testimenetelmän käyttöä kaiken tyyppisiin kemikaaleihin, ja positiivisen tuloksen tulisi tällöin katsoa viittaavan vakavaan silmävaurioon, mikä tarkoittaisi YK:n GHS-järjestelmän luokkaa 1 ilman lisätestausta. Alkoholeilla saatuihin positiivisiin tuloksiin olisi kuitenkin suhtauduttava varovaisesti yliennustuksen vaaran takia.

Vakavia silmävaurioita aiheuttavien kemikaalien (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1) tunnistamiseen käytettäessä ICE-menetelmän yleinen tarkkuus on 86 prosenttia (120/140), väärien positiivisten tulosten osuus on 6 prosenttia (7/113) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 48 prosenttia (13/27) verrattuna YK:n GHS-järjestelmän mukaan luokiteltuihin *in vivo* -kaninsilmätestistä saatuihin tietoihin (4) (5).

ICE-menetelmää voidaan käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän mukaisesti silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta (4). Toimivaltaisilta sääntelyviranomaisilta tulisi pyytää ohjeita, ennen kuin ICE-menetelmää käytetään kokoavan lähestymistavan testausstrategiassa jonkin muun luokitusjärjestelmän puitteissa. Tällä menetelmällä voidaan testata kaiken tyyppisiä kemikaaleja. Negatiivisen tuloksen perusteella kemikaali voitaisiin jättää luokittelematta silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta. Validointitietokannan yhden tuloksen perusteella orgaanisia liuottimia sisältävien eliönestomaalien vaikutus saatetaan kuitenkin aliennustaa (5).

Kun ICE-menetelmää käytetään sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta, sen yleinen tarkkuus on 82 prosenttia (125/152), väärien positiivisten tulosten osuus on 33 prosenttia (26/79) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 1 prosentti (1/73) verrattuna YK:n GHS-järjestelmän mukaan luokiteltuihin *in vivo* -kaninsilmätestistä saatuihin tietoihin (4) (5). Kun tietokannan ulkopuolelle jätetään tiettyihin luokkiin kuuluvat testikemikaalit (eli orgaanisia liuottimia sisältävät eliönestomaalit), ICE-menetelmän tarkkuus on 83 prosenttia (123/149), väärien positiivisten tulosten osuus on 33 prosenttia (26/78) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 0 prosenttia (0/71) YK:n GHS-järjestelmässä (4) (5).

ICE-menetelmää ei suositella käytettävän sellaisten testikemikaalien tunnistamiseen, jotka tulisi luokitella silmiä ärsyttäviksi (eli YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 2 tai 2A), tai testikemikaaleja, jotka tulisi luokitella lievästi silmiä ärsyttäviksi (YK:n GHS-järjestelmän luokka 2B), koska suuri määrä YK:n GHS-järjestelmän luokan 1 mukaisia kemikaaleja on luokiteltu liian alhaisiin YK:n GHS-järjestelmän luokkiin 2, 2A tai 2B ja YK:n GHS-järjestelmän mukaisia ”ei luokitusta” -kemikaaleja on luokiteltu liian korkeisiin YK:n GHS-järjestelmän luokkiin 2, 2A tai 2B. Tätä varten saattaa olla tarpeen tehdä lisää testejä muilla soveltuvilla menetelmillä.

Kaikissa kanan silmiä käyttävissä menettelyissä olisi noudatettava testauslaitoksen määräämiä ihmis- tai eläinperäisten materiaalien (muun muassa kudosten ja kudosnesteiden) käsittelyä koskevia sääntöjä ja menettelyjä. Suositeltavia ovat yleiset laboratorioissa noudatettavat ennaltavarautumiskäytänteet (16).

Vaikka ICE-menetelmässä ei oteta huomioon kaninsilmätestissä arvioituja sidekalvon ja värikalvon vaurioita, siinä käsitellään vaikutuksia sarveiskalvoon, jotka ovat *in vivo* -testeissä suurin luokittelun peruste YK:n GHS-järjestelmästä puhuttaessa. Kaninsilmätutkimusten perusteella on ehdotettu, että vaikka ICE-testissä ei sinänsä voida arvioida sarveiskalvovaurioiden palautuvuutta, sarveiskalvovaurion alkusyvyyden perusteella voidaan kuitenkin tunnistaa tietyt palautumattomat vaikutukset (17). Erityisesti tarvitaan enemmän tieteellistä tietoa sen ymmärtämiseksi, miten

▼M7

ensimmäisenä syntyviin suuriin vaurioihin liittymättömät palautumattomat vaikutukset syntyvät. ICE-menetelmällä ei voida myöskään arvioida sitä, missä määrin silmäaltistukseen voi liittyä systeemistä toksisuutta.

Tätä testimenetelmää päivitetään aika ajoin sitä mukaa, kun saadaan uusia tietoja. Esimerkiksi histopatologiasta saattaa olla hyötyä, jos sarveiskalvon vauriota on tarpeen luonnehtia tarkemmin. Tämän mahdollisuuden arvioimiseksi käyttäjiä kehotetaan säilyttämään silmät ja ottamaan histopatologisia näytteitä, joita voidaan käyttää tietokannan luomiseen ja päätösperusteiden laatimiseen, jotta menetelmän tarkkuutta voidaan parantaa. OECD on kehittänyt ohjeasiakirjan silmätoksisuuden *in vitro* -testimenetelmien käytöstä. Ohjeessa kuvataan yksityiskohtaisesti histopatologisten näytteiden ottaminen ja annetaan tiedot siitä, mihin näytteet ja/tai histopatologiset tiedot tulee toimittaa (8).

Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 2 mainittuja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratorio voi käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä ICE-menetelmän käytössä ennen kuin se toimittaa ICE-määritystuloksia sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

ICE-menetelmä on elinmalli, joka mahdollistaa kanan silmän lyhytaikaisen ylläpitämisen *in vitro*. Tässä testimenetelmässä testikemikaalin aiheuttama vaurio arvioidaan määrittämällä sarveiskalvon turpoaminen, sameus ja fluoreseiinin retentio. Kaksi jälkimmäistä muuttujaa arvioidaan kvalitatiivisesti, kun taas sarveiskalvon turpoaminen määritetään kvantitatiivisesti. Kukin mittaus joko muunnetaan kvantitatiiviseksi arvoksi, josta lasketaan yleinen ärsyttävyysindeksi, tai sille osoitetaan kvalitatiivinen luokka, jonka perusteella määritetään *in vitro* silmän vaaraluokitus, joko YK:n GHS-järjestelmän luokka 1 tai YK:n GHS-järjestelmän ”Ei luokitusta”. Kummankin tuloksen avulla voidaan ennustaa, kuinka todennäköisesti testikemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita *in vivo* tai voidaanko se jättää luokittelematta silmän vaaraluokituksessa (ks. päätösperusteet). Sellaisia kemikaaleja ei voida luokitella lainkaan, joiden mahdollisuutta aiheuttaa vakavia silmävaurioita ei ole ennustettu tai joita ei ole luokiteltu ICE-menetelmässä (ks. 11 kohta).

Kanansilmien alkuperä ja kanojen ikä

Tässä määrityksessä on tavanomaisesti käytetty teurastamossa elintarviketuotantoa varten teurastetuista kanoista saatuja silmiä, jolloin ei ole tarvittu laboratorioeläimiä. Testiin voidaan käyttää vain silmiä, jotka on saatu terveistä, ihmisravinnoksi kelpaavista eläimistä.

Parasta kanan ikää ei ole arvioitu kontrolloidussa tutkimuksessa. Testimenetelmässä on yleensä käytetty sen ikäisiä ja painoisia kanoja kuin siipikarjateurastamossa tavanomaisesti teurastetut kevätkananpojat ovat (eli noin seitsemän viikon ikäisiä, paino 1,5–2,5 kg).

Silmien kerääminen ja niiden kuljetus laboratorioon

Päät tulisi irrottaa heti sen jälkeen, kun kanat on tainnutettu, mikä tehdään tavallisesti sähkösokilla, ja kaula on viilletty verenlaskua varten. Laboratorion läheisyydestä tulisi etsiä paikallinen kanojen teurastamo, jotta kanojen päät voidaan kuljettaa teurastamosta laboratorioon riittävän nopeasti. Näin pilaantuminen ja/tai bakteerikontaminaatio voidaan pitää mahdollisimman vähäisinä. Kananpäiden keräämisestä ja silmien poistamisesta silmien tiputuslaitteen (superfuusiolaitteen) kammioon asettamiseen kuluvan ajan tulisi olla mahdollisimman lyhyt (yleensä enintään kaksi tuntia), jotta näytteiden määrittämisen hyväksymisperusteet täyttyvät. Kaikkien määrityksessä käytettyjen silmien olisi oltava peräisin samasta, tiettynä päivänä kerätystä silmäryhmästä.

▼M7

Koska silmät dissekoidaan laboratoriossa, koskemattomat päät kuljetetaan teurastamosta ympäristön lämpötilassa (yleensä 18–25 °C) muovilaatikoissa kosteutettuina isotonisella fysiologisella keittosuolaliuoksella kostutetuilla liinoilla.

ICE-testissä käytettävien silmien valintaperusteet ja määrä

Hylätyksi tulevat sellaiset silmät, jotka värjäytyvät voimakkaasti fluoreseiinillä (> 0,5) tai joiden sarveiskalvon sameusarvo on suuri (> 0,5) silmämunan poistamisen jälkeen.

Kussakin käsitellyssä ryhmässä ja samanaikaisesti määritettävässä positiivisessa kontrollissa on oltava vähintään kolme silmää. Negatiivisessa kontrolliryhmässä tai liuotinkontrollissa (jos käytetään muuta liuotinta kuin fysiologista keittosuolaliuosta) on oltava vähintään yksi silmä.

Jos kiinteitä aineita testattaessa tulokseksi tulee YK:n GHS-järjestelmän ”Ei luokitusta”, suositellaan testin uusimista vielä kolmella silmällä, jotta tulokselle saadaan vahvistus tai se voidaan hylätä.

MENETTELY

Silmien valmistelu

Silmäluomet leikataan huolellisesti pois varoen vahingoittamasta sarveiskalvoa. Sarveiskalvon eheys arvioidaan nopeasti lisäämällä tippa 2-prosenttista (w/v) natriumfluoreseiiniä sarveiskalvon pinnalle muutamaksi sekunniksi, minkä jälkeen pinta huuhdotaan fysiologisella keittosuolaliuoksella. Fluoreseiinillä käsiteltyjä silmiä tarkastellaan rakovalomikroskoopilla, jotta voidaan varmistaa, ettei sarveiskalvo ole vahingoittunut (eli fluoreseiinin retentio ja sarveiskalvon sameusarvo ovat enintään 0,5).

Jos silmä on vahingoittumaton, se dissekoidaan kallosta varoen vahingoittamasta sarveiskalvoa. Silmämuna vedetään irti silmäkuopasta pitäen tiukasti vilkkukalvosta kiinni kirurgisilla pihdeillä, ja silmän lihakset leikataan käyrillä, tylppäkärkisillä saksilla. On tärkeää, ettei sarveiskalvoa vahingoiteta liialla paineella (kompressioartefakta).

Kun silmää poistetaan silmäkuopasta, pitäisi osa näköhermoa jättää kiinni ja näkyville. Kun silmä on poistettu silmäkuopasta, se asetetaan imupaperialustalle, ja vilkkukalvo ja muu sidekudos leikataan pois.

Poistettu silmä kiinnitetään ruostumattomasta teräksestä valmistettuun pitimeen siten, että sarveiskalvo on pystysuorassa. Pidin siirretään tiputuslaitteen kammioon (18). Pidin asetetaan tiputuslaitteeseen niin, että tiputettava fysiologinen keittosuolaliuos kastelee koko sarveiskalvon (3–4 tippaa minuutissa tai 0,1–0,15 ml/min). Tiputuslaitteen kammioiden lämpötila on pidettävä arvossa 32 ± 1,5 °C. Lisäyksessä 3 esitetään kaavio tyypillisestä tiputuslaitteesta ja silmänpitimistä. Niitä voi ostaa tai ne voi rakentaa itse. Laite voidaan mukauttaa yksittäisen laboratorion tarpeisiin (esimerkiksi eri silmämäärille).

Kun silmät on asetettu tiputuslaitteeseen, niitä tarkastellaan jälleen rakovalomikroskoopilla, jotta voidaan varmistaa, etteivät ne ole vahingoittuneet dissektiossa. Sarveiskalvon huippukohdan paksuus olisi myös mitattava rakovalomikroskooppiin kuuluvalla syvyydenmittauslaitteella. Jos i) fluoreseiinin retentioarvo on yli 0,5, ii) sarveiskalvon sameus on yli 0,5 tai iii) silmissä on muita vahingoittumisen merkkejä, silmät on vaihdettava toisiin. Niistä silmistä, joita ei ole hylätty edellä mainittujen perusteiden perusteella, hylätään sellaiset, joiden sarveiskalvon paksuus poikkeaa yli 10 prosenttia kaikkien silmien keskiarvosta. Käyttäjien on syytä panna merkille, että rakovalomikroskoopeilla voi saada erilaisia arvoja sarveiskalvon paksuudelle, jos raon leveyden asetus on eri. Raon leveys olisi asetettava arvoon 0,095 mm.

▼M7

Kun kaikki silmät on tutkittu ja hyväksytty, silmiä inkuboidaan noin 45–60 min, jotta ne tasapainottuvat testijärjestelmässä ennen annostelua. Tasapainottumisjakson jälkeen sarveiskalvon paksuudelle ja sameudelle otetaan lukema perusarvoa varten (nolla-arvo ajanhetkellä 0). Dissektion yhteydessä määritettyä fluoreseiiniarvoa käytetään fluoreseiinin retention perusarvona.

Testikemikaalin annostelu

Välittömästi nolla-arvojen mittausten jälkeen silmä (telineineen) poistetaan tiputuslaitteesta, asetetaan vaakasuoraan, ja testikemikaali annostellaan sarveiskalvolle.

Nestemäiset testikemikaalit testataan tavallisesti laimentamattomina, mutta ne voidaan laimentaa tarvittaessa (esimerkiksi jos se kuuluu tutkimussuunnitelmaan). Testikemikaalit laimennetaan mieluiten fysiologisella keittosuolaliuoksella. Muitakin liuottimia voidaan käyttää valvotuissa olosuhteissa, mutta muiden liuottimien kuin fysiologisen keittosuolaliuoksen käyttökelpoisuus olisi osoitettava.

Nestemäiset testikemikaalit annostellaan sarveiskalvolle siten, että testiaine peittää kokonaan ja tasaisesti sarveiskalvon pinnan; tavanomainen tilavuus on 0,03 ml.

Kiinteät aineet olisi mahdollisuuksien mukaan jauhettava mahdollisimman hienoksi morttelissa survimella tai vastaavassa jauhamislaitteessa. Jauhe annostellaan sarveiskalvolle siten, että testiaine peittää pinnan tasaisesti; tavanomainen määrä on 0,03 g.

Testiaineen (nesteen tai kiinteän aineen) annetaan vaikuttaa 10 sekunnin ajan, minkä jälkeen se huuhdellaan silmästä fysiologisella keittosuolaliuoksella (noin 20 ml) huoneenlämpötilassa. Telineessä oleva silmä asetetaan uudelleen tiputuslaitteeseen pystysuoraan. Tarvittaessa silmää voidaan huuhdella lisää 10 sekunnin vaikutusajan jälkeen sekä myös myöhemmin (esimerkiksi silloin, kun sarveiskalvolla havaitaan testikemikaalin jäänteitä). Yleensä lisähuuhtelussa käytettävän keittosuolaliuoksen määrällä ei ole merkitystä, mutta kemikaalin tarttumista sarveiskalvolle on ehdottomasti tarkkailtava.

Kontrollikemikaalit

Kussakin kokeessa on oltava mukana negatiiviset eli liuotin-/kantaja-ainekontrollit ja positiiviset kontrollit.

Testattaessa 100-prosenttisia nesteitä tai kiinteitä aineita käytetään ICE-testissä negatiivisena kontrollina fysiologista keittosuolaliuosta, jotta voidaan havaita epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä ja varmistaa, etteivät määritysolosuhteet aiheuta tahattomasti ärsytysvastetta.

Testattaessa laimennettuja nesteitä testissä käytetään samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmää, jotta voidaan havaita epäspesifiset muutokset testijärjestelmässä ja varmistaa, etteivät määritysolosuhteet aiheuta tahattomasti ärsytysvastetta. Kuten kohdassa 31 mainitaan, liuotinta/kantaja-ainetta saa käyttää vain, jos on osoitettu, ettei se häiritse testijärjestelmää.

Kuhunkin kokeeseen otetaan mukaan tunnettu silmiä ärsyttävä kemikaali positiivisena kontrollina, jotta voidaan varmistaa, että saadaan asianmukainen vaste. Koska ICE-määritystä käytetään tässä testimenetelmässä syövyttävien tai vakavasti ärsyttävien kemikaalien tunnistamiseksi, positiivisen kontrollin olisi mielellään oltava vertailukemikaali, joka aiheuttaa tässä testimenetelmässä vakavan vasteen. Vakava ärsytysvaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida. Positiivisesta kontrollista olisi hankittava riittävästi *in vitro* -tuloksia, jotta positiiviselle kontrollille voidaan laskea tilastollisesti määritelty hyväksyttävä alue. Jos tietylle

▼M7

positiiviselle kontrollille ei ole saatavilla riittävästi aiempia ICE-testimenetelmällä saatuja tuloksia, on tietojen saamiseksi mahdollisesti tehtävä lisätutkimuksia.

Nestemäisten testikemikaalien positiivisina kontrolleina voidaan käyttää esimerkiksi 10-prosenttista etikkahappoa tai 5-prosenttista bentsalkoniumkloridia, ja kiinteiden testikemikaalien positiivisina kontrolleina voidaan käyttää esimerkiksi natriumhydroksidia tai imidatsolia.

Vertailukemikaalit ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyskykyä tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyskykyä tietyllä ärsytysvastealueella.

Mitatut päätepisteet

Käsitellyt sarveiskalvot arvioidaan ennen käsittelyä ja 30, 75, 120, 180 ja 240 minuuttia (± 5 minuuttia) käsittelyn jälkeen tehdyn huuhtelun jälkeen. Näillä ajanhetkillä saadaan riittävä määrä mittauksia neljän tunnin käsittelyn aikana, ja mittauksien välillä on riittävästi aikaa tehdä kaikista silmistä tarvittavat havainnot.

Arvioidut päätepisteet ovat sarveiskalvon sameus, turpoaminen, fluoreseiinin retentio ja morfologiset vaikutukset (esimerkiksi epiteelin pistemäinen syöpyminen tai irtoaminen). Kaikki määritykset (lukuun ottamatta fluoreseiinin retentiota, joka määritetään vain ennen käsittelyä ja 30 minuutin kuluttua testikemikaalin annostelusta) tehdään kullakin mainitulla ajanhetkellä.

On suositeltavaa ottaa valokuvia osoitukseksi sarveiskalvon sameudesta, fluoreseiinin retentiosta, morfologisista muutoksista ja histopatologiasta (jos sellaisia tutkimuksia on tehty).

Kun viimeinen tutkimus on tehty neljän tunnin kohdalla, silmät suositellaan säilytettävän sopivassa kiinnitysaineessa (esimerkiksi neutraalissa puskuroidussa formaliinissa) mahdollisia histopatologisia tutkimuksia varten (lisätietoja on kohdassa 14 ja lähteessä 8).

Sarveiskalvon turpoaminen arvioidaan sarveiskalvon paksuuden mittauksista, jotka tehdään rakovalomikroskooppiin kuuluvalla optisella paksuudenmittauslaitteella. Turpoaminen ilmoitetaan prosenttilukuna, ja se lasketaan sarveiskalvon paksuuden mittauksista seuraavalla kaavalla:

$$\left(\frac{\textit{sarveiskalvon paksuus hetkellä } t - \textit{sarveiskalvon paksuus hetkellä} = 0}{\textit{sarveiskalvon paksuus hetkellä} = 0} \right) \times 100$$

Kaikkien testattujen silmien sarveiskalvon turpoamisen prosenttikeskiarvo lasketaan kaikille havaintoajanhetkille. Kullekin testikemikaalille annetaan yleinen luokkaa koskeva arvo sarveiskalvon turpoamiselle saadun korkeimman (millä tahansa ajanhetkellä havaitun) keskimääräisen arvon perusteella (ks. 51 kohta).

Sarveiskalvon sameus lasketaan käyttäen sitä sarveiskalvon kohtaa, joka antaa suurimman sameusarvon (ks. taulukko 1). Kaikkien testattujen silmien sarveiskalvon keskimääräinen sameusarvo lasketaan kaikille havaintoajanhetkille. Kullekin testikemikaalille annetaan yleinen luokkaa koskeva arvo sarveiskalvon sameudelle saadun korkeimman (minä tahansa ajanhetkenä havaitun) keskimääräisen arvon perusteella (ks. 51 kohta).

▼M7

Taulukko 1

Sarveiskalvon sameusarvot

Arvo	Havainto
0	Ei sameutta
0,5	Hyvin heikkoa sameutta
1	Hajanaisia sameita alueita; värikalvon yksityiskohdat selvästi nähtävissä
2	Selvästi erottuva läpinäkyvä alue; värikalvon yksityiskohdat hiukan peittyneet
3	Vakavaa sarveiskalvon sameutta; värikalvosta ei ole näkyvillä erityisiä yksityiskohtia; silmäterän kokoa voi tuskin erottaa
4	Täysin samea sarveiskalvo; silmäterää ei näy

Fluoreseiinin retentio arvioidaan ainoastaan 30 minuutin ajanhetkelle (ks. taulukko 2). Kaikkien testattujen silmien fluoreseiinin retention keskiarvo lasketaan tämän jälkeen 30 minuutin ajanhetkelle. Sitä käytetään kullekin testikemikaalille annettavaan yleiseen luokka-arvoon (ks. 51 kohta).

Taulukko 2

Fluoreseiinin retention arvot

Arvo	Havainto
0	Ei fluoreseiinin retentiota
0,5	Hyvin vähäistä yksittäisten solujen värjääntymistä
1	Yksittäisiä värjääntyneitä soluja on hajaantuneena sarveiskalvon käsitellylle alueelle
2	Tiiviitä ja tiheitä yksittäisten värjääntyneiden solujen rykelmiä
3	Laajoja sarveiskalvon alueita, joilla esiintyy tiheää fluoreseiinivärjääntymistä

Morfologisia vaikutuksia ovat esimerkiksi sarveiskalvon epiteelisolujen ”pistemäinen syöpyminen”, epiteelin ”irtoaminen”, sarveiskalvon pinnan ”karhentuminen” ja testikemikaalin ”takertuminen” sarveiskalvoon. Näiden löydösten vakavuus voi vaihdella, ja ne voivat esiintyä samanaikaisesti. Näiden löydösten luokittelu riippuu tutkijan tulkinnasta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

Sarveiskalvon sameutta, turpoamista ja fluoreseiinin retentiota koskevat tulokset olisi arvioitava erikseen, jotta kullekin päätepisteelle voidaan muodostaa ICE-luokka. Tämän jälkeen kutakin päätepistettä koskevat ICE-luokat yhdistetään ärsytysluokituksen muodostamiseksi kullekin testikemikaalille.

Päätösperusteet

Kun kukin päätepiste on arvioitu, voidaan ICE-luokat osoittaa ennalta määrätyn vaihteluvälin perusteella. Sarveiskalvon turpoaminen (taulukko 3), sameus (taulukko 4) ja fluoreseiinin retentio (taulukko 5) käyttäen neljää ICE-luokkaa tulkitaan alla olevien asteikkojen mukaisesti. On syytä panna merkille, että taulukossa 3 esitettyjä sarveiskalvon turpoamisarvoja voi soveltaa vain, jos paksuus on

▼M7

mitattu rakovalomikroskoopilla (esim. Haag-Streit BP900), jossa on syvyydenmittauslaite nro 1 ja jonka raon leveys on $9\frac{1}{2}$, mikä vastaa 0,095 mm:iä. Käyttäjien on muistettava, että rakovalomikroskoopeilla voi saada erilaisia arvoja sarveiskalvon paksuudelle, jos raon leveyden asetus on eri.

Taulukko 3

ICE-luokitusperusteet sarveiskalvon turpoamiselle

Keskimääräinen sarveiskalvon turpoaminen (%) (*)	ICE-luokka
0–5	I
> 5–12	II
> 12–18 (> 75 min käsittelyn jälkeen)	II
> 12–18 (≤ 75 min käsittelyn jälkeen)	III
> 18–26	III
> 26–32 (> 75 min käsittelyn jälkeen)	III
> 26–32 (≤ 75 min käsittelyn jälkeen)	IV
> 32	IV

(*) Korkein keskiarvo minä tahansa ajankohtana

Taulukko 4

ICE-luokitusperusteet sameudelle

Keskimääräinen suurin sameusarvo (*)	ICE-luokka
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Keskimääräinen suurin arvo minä tahansa ajankohtana (perustuu taulukon 1 sameusarvoihin).

Taulukko 5

ICE-luokitusperusteet keskimääräiselle fluoreseiinin retentiolle

Keskimääräinen fluoreseiinin retentioarvo 30 minuuttia käsittelyn jälkeen (*)	ICE-luokka
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Perustuu taulukon 2 arvoihin.

Testikemikaalin *in vitro* -luokitus arvioidaan lukemalla GHS-luokitus, joka vastaa sarveiskalvon turpoamiselle, sarveiskalvon sameudelle ja fluoreseiinin retentiolle saatujen kategorioiden yhdistelmää taulukossa 6 esitetyllä tavalla.

▼M7

Taulukko 6

Yhdistetyt *in vitro* -luokitukset

GHS-luokitus	Kolmen päätepisteen yhdistelmät
Ei luokitusta	3 × I 2 × I, 1 × II
Ei voida ennustaa	Muut yhdistelmät
Luokka 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Sarveiskalvon sameus ≥ 3, kun on kulunut 30 minuuttia (vähintään kahdessa silmässä) Sarveiskalvon sameus = 4 millä tahansa mittausajanhetkellä (vähintään kahdessa silmässä) Vakava epiteelin irtoaminen (vähintään yhdessä silmässä)

(*) Harvinaisemmat yhdistelmät.

Tutkimuksen hyväksymisperusteet

Testi katsotaan hyväksyttäväksi, jos samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten tai liuotin-/kantaja-ainekontrollien antama GHS-luokitus on ”ei luokitusta” ja samanaikaisesti tehtyjen positiivisten kontrollien antama GHS-luokitus on luokkaluokka 1.

Testiseloste

Testiselosteessa olisi annettava seuraavat tiedot, jos niillä on merkitystä tutkimuksen suorittamisen kannalta:

Testikemikaali ja kontrollikemikaalit

— kemiallinen nimi (nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos tiedossa

— CAS-numero, jos tiedossa

— testi- tai kontrollikemikaalien puhtausaste ja koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla

— testin suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet, kuten olomuoto, haihtuvuus, pH, stabiilius, kemiallinen luokka ja vesiliukoisuus

— tarvittaessa testi- tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen),

— stabiilius, jos tiedossa.

Tutkimuksen teettäjää ja testauslaitosta koskevat tiedot:

— Tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— silmien alkuperä (esimerkiksi laitos, jossa ne on kerätty).

Testiolosuhteet

— kuvaus käytetystä testijärjestelmästä

▼M7

— käytetty rakovalomikroskooppi (esimerkiksi sen malli) ja käytetyn rakovalomikroskoopin laiteasetukset

— viittaus aiempiin negatiivisiin ja positiivisiin kontrollituloksiin ja tarvittaessa hyväksyttävät aiempiin tuloksiin perustuvat samaan aikaan tehtyjen vertailukontrollien vaihteluvälit

— käytäntö, jolla varmistetaan testimenetelmän eheyden (eli tarkkuuden ja luotettavuuden) säilyminen ajan kuluessa (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen kemikaalien säännöllinen testaus).

Silmien kerääminen ja valmistelu

— luovuttajaeläimen ikä ja paino ja, jos saatavilla, muita erityistietoja eläimistä, joilta silmät ovat peräisin (kuten sukupuoli, rotu)

— silmien säilytys- ja kuljetusolosuhteet (kuten silmien keräyspäivä ja -kellonaika, aika kananpäiden keräämisestä poistettujen silmien asettamiseen tiputuslaitteen kammioon)

— silmien valmistelu ja kiinnitys, esimerkiksi niiden laatua, silmäkammioiden lämpötilaa ja testissä käytettävien silmien valintaperusteita koskevat tiedot.

Testimenettely

— toistojen lukumäärä

— käytetyt negatiiviset ja positiiviset kontrollit (ja mahdolliset liuotin- ja vertailukontrollit)

— testikemikaalin annostus, annostelu ja altistusaika

— havaintoajanhetket (ennen käsittelyä ja sen jälkeen)

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus käytetyistä tutkimuksen hyväksymiskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— taulukkomuodossa sarveiskalvon turpoaminen, sarveiskalvon sameus ja fluoreseiinin retentio kutakin silmää kohti kunakin havaintoajanhetkenä, mukaan lukien kaikkien testattujen silmien keskiarvot kunakin havaintoajanhetkenä

— sarveiskalvon turpoamisen, sarveiskalvon sameuden ja fluoreseiinin retention korkein havaittu keskiarvo (minä tahansa ajanhetkenä) ja vastaava ICE-luokka

— kuvaus mahdollisista muista havaituista vaikutuksista

— johdettu *in vitro* -GHS-luokitus

— tarvittaessa valokuvat silmistä.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

▼M7

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report – *In vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 07-4517. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.
gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No: 10-7553A. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm

(4) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York ja Geneve, 2011. Saatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Pariisi.

(6) Tässä liitteessä oleva B.5 luku: Akuutti toksisuus: silmän ärsyttävyys/syövyttävyys.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In vitro* 24, s. 1–9.

(8) OECD (2011) Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Pariisi.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm

(10) Prinsen, M.K. ja Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31: s. 69–76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Saatavilla osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. ja Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In vitro* 9: s. 871–929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34: s. 291–296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. ja Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35: s. 23–37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in vitro* 20, s. 78–81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. ja Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Saatavilla osoitteessa http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. ja Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36: s. 106–117.

(18) Burton, A.B.G., M. York ja R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.-* 19, s. 471–480.

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aine: Alkuaineet ja niiden yhdisteet, sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, joihin sisältyy kaikki tuotteen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja kaikki menetelmästä peräisin olevat epäpuhtaudet lukuun ottamatta liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai koostumukseen (4).

Ei luokiteltu: Aineet, joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen (YK:n GHS-järjestelmän luokka 2) tai vakavien silmävaurioiden (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1) osalta. Sama kuin ”Ei YK:n GHS-luokitusta”.

Fluoreseiinin retentio: ICE-testissä tehty subjektiivinen mittaus fluoreseiininatriumin määrästä, jonka epiteelisolut pidättävät sarveiskalvossa, kun se on altistettu testiaineelle. Fluoreseiinin retentioaste viittaa sarveiskalvon epiteelin vaurioon.

Jäsentävä lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita. Se aloitetaan määrittämällä vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit (positiivinen tulos) ja muut kemikaalit (negatiivinen tulos).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Kokoava lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaalia ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella (negatiivinen tulos) ja muut kemikaalit (positiivinen tulos).

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Pinta-aktiivinen aine: Aine, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita; tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty kemikaalilla, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vakava vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Rakovalomikroskooppi: Laite, jolla tarkastellaan silmää suoraan kaksiokulaarisen mikroskoopin suurennoksella luomalla stereoskooppinen, pysty kuva. Laitetta käytetään ICE-testissä kanan silmän etukammion tarkasteluun ja sarveiskalvon paksuuden objektiiviseen mittaukseen mikroskooppiin liitetyn syvyyttä mittaavan laitteen avulla.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

▼M7

Sarveiskalvon sameus: Sarveiskalvon sameuden mitta, kun sarveiskalvo on altistettu testikemikaalille. Sarveiskalvon sameuden lisääntyminen merkitsee sarveiskalvon vauriota.

Sarveiskalvon turpoaminen: ICE-testissä objektiivisesti mitattu sarveiskalvon pullistumisen voimakkuus, kun sarveiskalvo on altistettu testikemikaalille. Turpoaminen ilmaistaan prosenttilukuna ja lasketaan sarveiskalvon paksuuden perustasomittauksista (ennen annostelua) ja paksuuksista, jotka on mitattu säännöllisin väliajoin sen jälkeen, kun sarveiskalvo on altistettu testikemikaalille ICE-testissä. Sarveiskalvon turpoamisaste viittaa sarveiskalvon vaurioon.

Seos: Kahdesta tai useammasta aineesta koostuva seos tai liuos, jossa aineet eivät reagoi (4).

Silmälle aiheutuvat palautumattomat vaikutukset: ks. ”Vakava silmävaurio” ja ”YK:n GHS-järjestelmän luokka 1”.

Silmälle aiheutuvat palautuvat vaikutukset: ks. ”Silmä-ärsytys” ja ”YK:n GHS-järjestelmän luokka 2”.

Silmä-ärsytys: Silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, ja korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Vaihdettavissa ”Silmälle aiheutuvien palautuvien vaikutusten” ja ”YK:n GHS-järjestelmän luokan 2” kanssa (4).

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää kemikaalin vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Vaiheittainen testausstrategia: Monivaiheinen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testikemikaalin ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

▼M7

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvaurio tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka on seurausta testikemikaalin annostelusta silmän etupinnalle eikä korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Vaihdettavissa ”Silmälle aiheutuvien palautumattomien vaikutusten” ja ”YK:n GHS-järjestelmän luokan 1” kanssa (4).

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On tärkeää huomata, että validoitu testi ei ehkä ole riittävän tarkka ja luotettava, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen.

Vertailukemikaali: Kemikaali, johon testikemikaalia verrataan. Vertailukemikaalilla on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava ja muuttumaton alkuperä, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testikemikaaliryhmällä, iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vasteen vaihteluvälillä.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

YK:n GHS-järjestelmän ”Ei luokitusta”: Aineet, jotka eivät täytä YK:n GHS-järjestelmän luokan 1 tai 2 (2A tai 2B) vaatimuksia. Vaihdettavissa määrityksen ”Ei luokiteltu” kanssa.

YK:n GHS-järjestelmän luokka 1: ks. ”Vakava silmävaurio” ja/tai ”Silmälle aiheutuvat palautumattomat vaikutukset”.

YK:n GHS-järjestelmän luokka 2: ks. ”Silmä-ärsytys” ja/tai ”Silmälle aiheutuvat palautuvat vaikutukset”.

YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (4).

▼M7

Lisäys 2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT KEMIKAALIT ICE-TESTIMENETELMÄÄ VARTEN

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, sen tulisi osoittaa tekninen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen 13 kemikaalin silmän vaaraluokitus. Kemikaalit valittiin edustamaan silmään kohdistuvia vaaroja koskevia erilaisia vasteita, jotka perustuvat *in vivo* -kaninsilmätestiin (TG 405) ja YK:n GHS-järjestelmään (eli YK:n GHS-järjestelmän kategorioihin 1, 2A, 2B tai ”Ei luokitusta”) (4) (6). Muita valintaperusteita olivat kemikaalien kaupallinen saatavuus, korkealaatuisten *in vivo* -vertailutietojen saatavuus ja korkealaatuiset ICE-menetelmän *in vitro* -tutkimustulokset. Vertailutiedot ovat nähtävissä OECD:n (5) ja ICCVAMin (9) ICE-menetelmää koskevissa tausta-asiakirjoissa.

Taulukko 1

Suositellut kemikaalit ICE-menetelmän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -luokitus (2)	*In vitro* -luokitus (3)
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Luokka 1	Luokka 1
Klooriheksidiini	55-56-1	Amiini, amidiini	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Dibentsoyyli-L-viinihappo	2743-38-6	Karboksyylihappo, esteri	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Imidatsoli	288-32-4	Heterosyklinen	Kiinteä	Luokka 1	Luokka 1
Trikloorietikkahappo (30 %)	76-03-9	Karboksyylihapot	Neste	Luokka 1	Luokka 1
2,6-Diklooribentsoyylikloridi	4659-45-4	Asyylihalidi	Neste	Luokka 2A	Ei voida ennustaa (4)
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Luokka 2A (5)	Ei voida ennustaa (4)
Etyyli-2-metyyliasetoasetaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Neste	Luokka 2B	Ei voida ennustaa (4)
Dimetyylisulfoksidi	67-68-5	Orgaaninen rikkiyhdiste	Neste	Ei luokitusta	Ei luokitusta
Glyseroli	56-81-5	Alkoholi	Neste	Ei luokitusta	Ei luokitusta (rajatapaus)
Metyylisyklopentaani	96-37-7	Hiilivety (syklinen)	Neste	Ei luokitusta	Ei luokitusta
n-Heksaani	110-54-3	Hiilivety (asyklinen)	Neste	Ei luokitusta	Ei luokitusta

▼**M7**

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka (1)	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -luokitus (2)	*In vitro* -luokitus (3)
Triasetiini	102-76-1	Lipidi	Neste	Ei luokiteltu	Ei luokitusta

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) Kunkin testikemikaalin kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

(2) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu *in vivo* -kaninsilmätestillä (OECD TG 405) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää (4) (6).

(3) Perustuu ICE-testin tuloksiin (ks. taulukko 6).

(4) Muiden kuin taulukossa 6 kuvattujen ICE-testitulosten yhdistelmä, josta käy ilmi kuuluvuus YK:n GHS-järjestelmän luokkaan ”Ei luokitusta” tai YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1 (ks. taulukko 6).

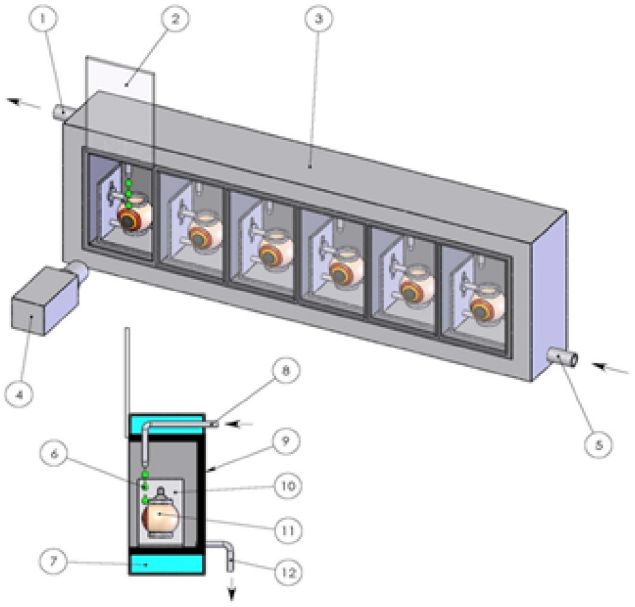
(5) Luokittelu luokkaan 2A tai 2B riippuu siitä, miten tulkitaan YK:n GHS-järjestelmän kriteerejä, jotka erottavat nämä luokat toisistaan, eli siitä, onko päivänä 7 vaikutuksia osoittavia eläimiä oltava yksi vai kaksi kolmesta, jotta kemikaali voidaan luokitellaan luokkaan 2A. *In vivo* -tutkimuksessa oli kolme eläintä. Yhdellä eläimellä esiintynyttä sidekalvon punaisuutta lukuun ottamatta kaikki päätepisteet palautuivat nolla-arvoon viimeistään päivään 7 mennessä. Päivään 7 mennessä toipumattoman eläimen sidekalvon punaisuusarvo oli 1 (päivänä 7). Täydellinen toipuminen tapahtui päivänä 10.

▼M7

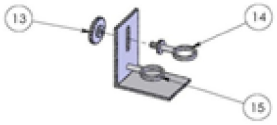
Lisäys 3

ICE-TESTISSÄ KÄYTETYN TIPUTUSLAITTEEN JA SILMÄNPITIMIEN KAAVIOT

(ks. Burton et al. (18), jossa esitetään yleinen kuvaus tiputuslaitteesta ja silmänpitimestä)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Nro	Kuvaus	Nro	Kuvaus
1	Lämpimän veden ulostulo	9	Osasto
2	Liukuovi	10	Silmänpidin
3	Tiputuslaite	11	Kanan silmä
4	Optinen mittauslaite	12	Keittosuolaliuoksen ulostulo
5	Lämpimän veden sisäänmeno	13	Säätöruuvi
6	Keittosuolaliuos	14	Säädettävä yläosa
7	Lämmin vesi	15	Kiinteä alaosa
8	Keittosuolaliuoksen sisäänmeno		

▼M7

B.49. *IN VITRO* -MIKROTUMATESTI NISÄKÄSSOLUILLA

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 487 (2016).Se on osa genotoksisuutta koskevien testimenetelmien sarjaa. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1)..

In vitro -mikrotumatesti (MNvit) on genotoksisuustesti, jolla määritetään interfaasisolujen sytoplasman mikrotumat. Mikrotumat voivat olla peräisin asentrisista kromosomin osista (joista puuttuu sentromeeri) tai kokonaisista kromosomeista, jotka eivät pysty vetäytymään kohti napoja solunjakautumisen anafaasivaiheessa. Näin ollen MNvit-testi on *in vitro* -menetelmä, jolla voidaan kattavasti tutkia *in vitro* kromosomivaurioiden mahdollisuutta, koska sillä voidaan havaita sekä aneugeenit että klastogeenit (2) (3) soluissa, joissa on tapahtunut solun jakautuminen testikemikaalille altistumisen aikana tai sen jälkeen (ks. lähemmin 13 kohta). Mikrotumat edustavat vauriota, jotka ovat välittyneet tytärsoluihin. Sen sijaan metafaasivaiheen soluissa esiintyvät kromosomipoikkeavuudet eivät ehkä välity seuraaviin vaiheisiin. Kummassakin tapauksessa muutokset saattavat vaikuttaa solujen elinkykyyn.

Testi voidaan suorittaa niin, että aktiinin polymerisaation inhibiittoria sytokalasiini B:tä (sytoB) käytetään tai ei käytetä. SytoB:n lisääminen ennen tavoiteltua mitoosia johtaa kaksitumaisiin soluihin ja mahdollistaa siten mikrotumien määrittämisen ja analysoinnin ainoastaan niissä soluissa, joissa on tapahtunut yksi mitoosi (4) (5). Tässä testimenetelmässä testisuunnitelmia voidaan soveltaa myös ilman sytokineesin inhibitointia edellyttäen, että analysoitavassa solupopulaatiossa on todistetusti tapahtunut mitoosi.

Mikrotumien muodostumista aiheuttavien kemikaalien tunnistamiseksi toteutettavan MNvit-testin lisäksi kromosomivaurioiden ja mikrotuman muodostumisen mekanismeista voidaan saada tietoa myös käyttämällä kinetokorien immunokemiallista merkkausta tai sentromeeri-/telomeerikoettimilla suoritettavaa hybridisaatiota (fluoresenssi- *in situ* -hybridisaatio (FISH)) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Näitä merkkaus- ja hybridisaatiomenetelmiä voidaan käyttää, kun mikrotumien muodostuminen on kiihtynyt ja tutkija haluaa määrittää, johtuuko kiihtyminen klastogeenisista ja/tai aneugeenisista tapahtumista.

Koska interfaasisolujen mikrotumat voidaan havaita suhteellisen objektiivisesti, laboratorion henkilökunnan on vain määritettävä kaksitumaisten solujen määrä sytoB:tä käytettäessä ja mikrotumaisten solujen määrä kaikissa tapauksissa. Näin ollen objektilasit voidaan laskea suhteellisen nopeasti ja analysointi voidaan automatisoida. Tämän takia kussakin käsittelyssä voidaan laskea satojen solujen sijaan tuhansia soluja, mikä lisää testin tehokkuutta. Koska mikrotumia voi syntyä hitaasti liikkuvista (”lagging”) kromosomeista, menetelmällä voidaan havaita aneuploidisia tekijöitä, joita on vaikea tutkia perinteisillä kromosomipoikkeavuustesteillä, kuten OECD:n testiohjeella 473 (tässä liitteessä oleva B.10 luku) (18). MNvit-testillä ei kuitenkaan voida eritellä kromosomimäärän ja/tai ploidian muutoksia aiheuttavia kemikaaleja ja klastogeenisia kemikaaleja ilman erityistekniikoita, kuten 4 kohdassa tarkoitettua FISH-tekniikkaa.

MNvit-testi on luotettava ja siinä voidaan käyttää useita eri solutyyppejä joko sytoB:n kanssa tai ilman sitä. Erilaisten solutyyppien (solulinjojen viljelmien sekä primääristen soluviljelmien) käytön soveltuvuudesta MNvit-testiin on saatu kattavia todisteita (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Näitä ovat etenkin Société Française de Toxicologie Génétique -järjestön (SFTG) koordinoimat kansainväliset validointitutkimukset

▼M7

(19) (20) (21) (22) (23) sekä genotoksisuuden testausta käsittelevän kansainvälisen työryhmän (International Workshop on Genotoxicity Testing) selvitykset (5) (17). Saatavilla olevat tiedot on myös arvioitu uudelleen Euroopan komission alaisen Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskuksen (ECVAM) tekemässä todistusnäytön jälkivalidointitutkimuksessa, ja ECVAM:in tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) on vahvistanut testimenetelmän tieteellisesti päteväksi (37) (38) (39).

Nisäkässoluilla tehtävässä MNvit-testissä voidaan käyttää ihmisistä tai jyrsijöistä saatujen solulinjojen viljelmiä tai primäärisiä soluviljelmiä. Koska mikrotumien esiintymistaajuus vaikuttaa taustana testin herkkyyteen, testissä olisi käytettävä solutyyppejä, joissa mikrotumien muodostumisen taustataajuus on tasainen ja selvästi erottuva. Käytettävien solujen valintakriteerejä ovat solujen hyvä kasvukyky viljelmässä, niiden karyotyypin pysyvyys (kromosomiluku mukaan luettuna) ja mikrotumien spontaanifrekvenssi (40). Tällä hetkellä käytettävissä olevat tiedot eivät mahdollista vankkoja suosituksia, mutta viittaavat siihen, että kemiallisia vaaroja arvioitaessa on tärkeää ottaa huomioon *p53*-status, geneettinen (karyotyypin) pysyvyys, DNA:n korjautumiskyky sekä testattavaksi valittujen solujen alkuperä (jyrsijät vai ihmiset). Näin ollen tämän testimenetelmän käyttäjiä kehotetaan ottamaan huomioon näiden sekä muiden solujen ominaisuuksien vaikutus solulinjan tehokkuuteen mikrotumien muodostumisen havaitsemisessa tietämyksen lisääntyessä tällä alalla.

Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

In vitro -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää, ellei solujen metabolia sovellu kyseisiin testikemikaaleihin. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita. On pyrittävä välttämään erityisesti sellaisia olosuhteita, joissa saatavat väärät positiiviset tulokset eivät heijasta testikemikaalien genotoksisuutta. Tällaisia olosuhteita ovat muun muassa pH-arvon (41) (42) (43) tai osmolaliteetin muutokset, vuorovaikutus soluviljelmän elatusaineen kanssa (44) (45) tai sytotoksisuuden korkea taso (ks. 29 kohta).

Mikrotumien muodostumisen analysoimiseksi on tärkeää, että sekä käsitellyissä että käsittelemättömissä viljelmissä on tapahtunut mitoosi. Eniten tietoja mikrotumien laskemiseksi saadaan soluista, joissa on tapahtunut yksi mitoosi testikemikaalilla käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Valmistettuja nanomateriaaleja varten tätä testimenetelmää on mukautettava, mutta mukauttamisia ei kuvailla tästä testimenetelmässä.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIN PERIAATE

Ihmisistä tai muista nisäkkäistä peräisin olevat soluviljelmät altistetaan testikemikaalille sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa että ilman sitä, paitsi jos testissä käytetään soluja, joiden metabolointikyky on riittävä (ks. 19 kohta).

Testikemikaalille altistamisen aikana tai sen jälkeen soluja kasvatetaan riittävän kauan, jotta kromosomivauriot tai muut vaikutukset solusykliin/solunjakautumiseen voivat johtaa mikrotuman muodostumiseen inferfaasisoluissa. Jotta aneuploidia muodostuisi, testikemikaalin olisi yleensä oltava läsnä mitoosin aikana. Kerätyt ja värjätyt interfaasisolut analysoidaan mikrotumien havaitsemiseksi. Mikrotumat on laskettava pääasiassa vain niissä soluissa, joissa mitoosi on päättynyt testikemikaalille altistamisen aikana tai käsittelyn jälkeisessä vaiheessa, jos

▼M7

testissä käytetään sitä. Sytokineesin inhibiittorilla käsitellyistä viljelmistä tämä tehdään yksinkertaisesti laskemalla vain kaksitumaiset solut. Jos sytokineesin inhibiittoria ei ole käytetty, on tärkeä osoittaa solupopulaation lisääntymisen perusteella, että analysoiduissa soluissa on todennäköisesti tapahtunut solunjakautuminen testikemikaalille altistumisen aikana tai sen jälkeen. Kaikissa menetelmissä on tärkeä osoittaa, että solut ovat lisääntyneet sekä kontrolliviljelmässä että käsitellyissä viljelmissä, ja testikemikaalin aiheuttamaa sytotoksisuutta tai sytostaasia on arvioitava kaikissa niissä viljelmissä, joiden mikrotumat lasketaan.

MENETELMÄN KUVAUS

Solut

Testeissä voidaan käyttää viljeltyjä ihmisen tai muiden nisäkkäiden perifeerisen veren lymfosyyttejä (7) (20) (46) (47) ja erilaisten jyrsijäsolulinjojen (esimerkiksi CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y) tai ihmisen solulinjojen (esimerkiksi TK6) soluja (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (ks. 6 kohta). Muiden solulinjojen (esimerkiksi HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2) soluja (52) (53), A549-soluja ja syyrianhamsterialkion primaarisoluja (54) on käytetty mikrotumatestauksessa, mutta toistaiseksi niitä ei ole validoitu laajasti. Tästä syytä näiden solulinjojen ja -tyyppien käyttö on perusteltava esittäen tiedot niiden todistetusta suorituskyvystä testissä Hyväksyttävyysperusteet -kohdan mukaisesti. SytoB:n on raportoitu vaikuttavan mahdollisesti L5178Y-solulinjan solujen kasvuun, ja tästä syystä sitä ei suositella käytettäväksi tämän solulinjan kanssa (23). Primaarisoluja käytettäessä olisi eläinten hyvinvoinnin vuoksi harkittava ihmisestä peräisin olevien solujen käyttöä, kun tämä on mahdollista, edellyttäen, että solut on kerätty ihmisiä koskevien eettisten periaatteiden ja sääntöjen mukaisesti.

Ihmisen perifeerisen veren lymfosyytit on kerättävä nuorilta (noin 18–35-vuotiaat), terveiltä, tupakoimattomilta henkilöiltä, joiden ei tiedetä altistuneen äskettäin genotoksisille aineille (esimerkiksi kemikaaleille tai ionisoivalle säteilylle) sellaisilla tasoilla, jotka lisäisivät mikrotumaisten solujen taustaesiintyvyyttä. Näin varmistetaan, että mikrotumaisten solujen taustaesiintyvyys on matala ja tasainen. Mikrotumaisten solujen taustaesiintyvyys kasvaa iän myötä, ja ilmiö on yleisempi naisilla kuin miehillä (55). Jos soluja kerätään useammalta kuin yhdeltä luovuttajalta, luovuttajien määrä on ilmoitettava. On osoitettava, että solut ovat jakautuneet testikemikaalilla käsittelyn aloittamisen ja solujen keräämisen välillä. Soluviljelmiä pidetään eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa (solulinjat) tai niitä stimuloidaan jakautumaan (primaariset viljelmät tai lymfosyytit), jotta solut altistetaan solusyklin eri vaiheissa, koska soluasteiden herkkyys testikemikaaleille ei ehkä ole tiedossa. Primaarisolut, joita on niiden jakautumiseksi stimuloitava mitogeenisilla aineilla, eivät yleensä ole enää synkronoituja testikemikaalille altistamisen aikana (esimerkiksi ihmisen lymfosyytit 48 tuntia kestävän mitogeenisen stimulaation jälkeen). Synkronoitujen solujen käyttöä testikemikaalilla käsittelyn aikana ei suositella, mutta se voidaan perustelluissa tapauksissa hyväksyä.

Elatusaineet ja viljelyolosuhteet

Soluviljelmiä on viljeltävä sopivissa kasvatusväliaineissa ja inkubaatio-olosuhteissa (kasvatusastiat, kosteutettu ilmakehä, jonka CO_2-pitoisuus on 5 %, 37 °C:n lämpötila). Solulinjoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja varmistettava, ettei ole mykoplasmakontaminaatiota. Soluja ei pidä käyttää, jos ne ovat kontaminoituneet tai jos modaalinen kromosomimäärä on muuttunut. Normaali solusyklin kesto testauslaboratoriossa käytetyissä solulinjoissa tai primaarisissa soluviljelmissä on määritettävä ja sen on oltava solujen julkaistujen ominaisuuksien mukainen.

▼M7

Soluviljelmien valmistelu

Solulinjat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä ja kylvetään elatusaineeseen sellaiseen tiheyteen, että suspensioissa tai yksikerrosviljelmissä olevat solut kasvavat eksponentiaalisesti keräämisajankohtaan asti (esimerkiksi konfluenttisuutta olisi vältettävä yksikerrosviljelmissä kasvavien solujen osalta).

Lymfosyytit: antikoagulantilla (esimerkiksi hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai erotettuja lymfosyyttejä viljellään (esimerkiksi 48 tunnin ajan ihmisen lymfosyyttien osalta) mitogeenin (esimerkiksi fytohemagglutiniini, PHA) kanssa solunjakautumisen indusoimiseksi ennen testikemikaalille ja sytoB:lle altistamista.

Metabolinen aktivaatio

Jos solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä, on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä, jota suositellaan oletusarvoisesti, ellei jokin muu järjestelmä ole perusteltu, on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (56) (57) tai fenobarbitonin ja b-naftoflavonin (58) (59) (60) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyrsijöiden (yleensä rottien) maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmä ei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen (61) kanssa, ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254:n (58) (59) (60). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue on 1–2 tilavuusprosenttia, mutta sen pitoisuutta voidaan nostaa 10 tilavuusprosenttiin lopullisessa testiväliaineessa. Mitoosi-indeksiä vähentäviä tuotteita, varsinkin kalsiumkomplekseja aiheuttavia tuotteita (62), olisi vältettävä käsittelyn aikana. Testattavien kemikaalien luokka saattaa vaikuttaa siihen, mitä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tai metabolisen indusoijan tyyppiä ja pitoisuutta päätetään käyttää.

Testikemikaalin valmistus

Kiinteät testikemikaalit on valmistettava sopivissa liuottimissa ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset testikemikaalit voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen testijärjestelmän käsittelyä. Kaasujen tai haituvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä asianmukaisia mukautuksia. Kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (63) (64) (65). Testikemikaali on valmistettava juuri ennen käsittelyä, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

Testiolosuhteet

Liuottimet

Liuotin on valittava siten, että testikemikaalien liukoisuus on mahdollisimman hyvä eikä tämä haittaa testin suorittamista esimerkiksi muuttamalla solukasvua, vaikuttamalla testikemikaalin eheyteen, reagoimalla viljelyastioiden kanssa tai haittaamalla metabolista aktivaatiojärjestelmää. Vesipitoisen liuottimen (tai soluviljelmän elatusaineen) käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Hyvin tunnettuja liuottimia ovat vesi ja dimetyylisulfoksidi (DMSO). Yleisesti ottaen orgaanisten liuottimien pitoisuus saa olla enintään 1 tilavuusprosentti. Jos sytoB:tä liuotetaan DMSO:hon, sekä testikemikaalia että sytoB:tä varten käytettävän orgaanisen liuottimen kokonaismäärä saa olla enintään 1 tilavuusprosentti; muussa tapauksessa on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja sen varmistamiseksi, että orgaanisen liuottimen pitoisuudella ei ole haitallisia vaikutuksia. Vesipitoisten liuottimien (suolaliuoksen tai veden) pitoisuus lopullisessa kasvatusväliaineessa saa olla enintään 10 tilavuusprosenttia. Jos testissä käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia (esimerkiksi etanolia tai asetonia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne ja testikemikaali sopivat yhteen ja että ne eivät ole genotoksisia käytettyinä pitoisuuksina.

▼M7

Tällaisten perustelevien tietojen puuttuessa on tärkeää käyttää käsittelemättömiä kontrolleja (ks. lisäys 1) sekä liuotinkontrolleja, jotka osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole haitallisia eikä kromosomeihin kohdistuvia vaikutuksia (esimerkiksi aneuploidia tai klastogeenisyys).

SytoB:n käyttö sytokineesin inhibiittorina

Yhtenä MNvit-testin tärkeimpänä näkökohtana on varmistaa, että lasketuissa soluissa on tapahtunut mitoosi käsittelyn aikana tai käsittelyä seuraavalla inkubaatiojaksolla, jos sitä on käytetty. Tästä syystä mikrotumien laskeminen on rajoitettava soluihin, joissa on tapahtunut mitoosi käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Sytokineesin inhibiittorina käytetään yleisimmin sytoB:tä, koska se estää aktiinin muodostumisen ja näin ollen estää tytärsolujen erkaantumisen mitoosin jälkeen, mikä johtaa kaksitumaisten solujen muodostumiseen (6) (66) (67). Testikemikaalin vaikutus solujen proliferaation kinetiikkaan voidaan mitata samanaikaisesti sytoB:tä käytettäessä. Ihmisen lymfosyyttejä käytettäessä sytokineesin inhibiittorina on käytettävä sytoB:tä, koska solusyklin kesto vaihtelee eri luovuttajien välillä ja koska kaikki lymfosyytit eivät reagoi PHA-stimulaatioon. SytoB:n käyttö ei ole pakollista muita solutyyppejä käytettäessä, jos voidaan osoittaa 27 kohdassa kuvatulla tavalla, että ne ovat jakautuneet. Lisäksi sytoB:tä ei yleensä käytetä, kun näytteitä arvioidaan mikrotumien havaitsemiseksi virtaussytometrisillä menetelmillä.

Laboratorion on määritettävä sopiva sytoB:n pitoisuus erikseen kullekin solutyypille, jotta liuottimella käsiteltyjen kontrolliviljelmien kaksitumaisten solujen määrä voidaan optimoida, ja pitoisuuden on osoitettava tuottavan hyvän kaksitumaisten solujen saannon laskemista varten. Yleensä SytoB:n sopiva pitoisuus on 3–6 μg/ml (19).

Solujen proliferaation ja sytotoksisuuden mittaaminen ja käsittelypitoisuuksien valitseminen

Päätettäessä testikemikaalin suurimmasta pitoisuudesta on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta (ks. 29 kohta), saostumista väliaineeseen (ks. 30 kohta) tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (ks. 9 kohta). Jos testikemikaali aiheuttaa sitä lisättäessä väliaineen pH-arvon merkittävän muuttumisen, pH-arvoa voidaan mukauttaa puskuroimalla lopullinen käsittelyväliaine väärien myönteisten tulosten välttämiseksi ja asianmukaisten viljelyolosuhteiden säilyttämiseksi.

Solujen proliferaation mittauksella varmistetaan, että riittävän monissa käsitellyissä soluissa on tapahtunut mitoosi testin aikana ja että käsittelyissä on käytetty asianmukaisia sytotoksisuustasoja (ks. 29 kohta). Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solukuoleman ja solukasvun indikaattoreita (ks. 26 ja 27 kohta). Vaikka sytotoksisuuden arviointi alustavassa testissä voi olla hyödyksi, jotta voidaan määrittää pääasiallisessa kokeessa käytettävät pitoisuudet, alustava testi ei ole pakollinen. Jos se suoritetaan, se ei saa korvata sytotoksisuuden mittausta pääasiallisessa kokeessa.

Kun viljelmät käsitellään sytoB:llä ja viljelmän yksitumaisten, kaksitumaisten ja monitumaisten solujen suhteellinen osuus määritetään, käsittelyn täsmällinen vaikutus solujen proliferaatioon ja solun sytotoksiseen tai sytostaattiseen toimintaan voidaan määrittää kvantitatiivisesti (6). Lisäksi varmistetaan, että mikroskoopilla tehtävässä laskennassa huomioon otetaan vain solut, jotka ovat jakautuneet käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Sytokineesin eston proliferaatioindeksiä (6) (27)

▼M7

(68) tai replikaatioindeksiä (RI), joka on määritetty vähintään 500 solulle viljelmää kohti, suositellaan käsittelyn sytotoksisen ja sytostaattisen toiminnan arvioimiseksi vertailemalla käsiteltyjen viljelmien ja kontrolliviljelmien arvoja. Myös muiden sytotoksisuuden merkkien (esimerkiksi solujen eheyden, apoptoosin, nekroosin, metafaasien määrän ja solusyklin) arvioinnilla voidaan saada hyödyllistä tietoa, mutta sitä ei saa käyttää sytokineesin eston proliferaatioindeksin tai RI:n sijasta.

Ilman sytoB:tä tehtävissä tutkimuksissa on osoitettava, että viljelmän solut ovat jakautuneet siten, että merkittävä osuus lasketuista soluista on jakautunut testikemikaalilla käsittelyn aikana tai sen jälkeen. Muussa tapauksessa tutkimuksesta voidaan saada vääriä negatiivisia tuloksia. Populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen (PSK) tai solumäärän suhteellisen lisääntymisen (SMSL) määrittämistä suositellaan käsittelyn sytotoksisen ja sytostaattisen toiminnan arvioimiseksi (17) (68) (69) (70) (71) (ks. kaavat lisäyksessä 2). Kun näytteenottoajat ovat pitkiä (esimerkiksi käsittely 1,5–2 normaalia solusykliä vastaavan ajan ja kerääminen 1,5–2 normaalia solusykliä vastaavan ajan tämän jälkeen, jolloin näytteenottoajat ovat yhteensä 3–4 normaalia solusykliä, kuten 38 ja 39 kohdassa kuvataan), PSK saattaa johtaa sytotoksisuuden aliarviointiin (71). Tällaisissa olosuhteissa SLSM saattaa olla parempi mittari, tai sytotoksisuuden arviointi 1,5–2 normaalia solusykliä vastaavan ajan jälkeen antaisi hyödyllisen arvion. Myös muiden sytotoksisuuden tai sytostaattisuuden merkkien (esimerkiksi solujen eheyden, apoptoosin, nekroosin, metafaasien määrän, profileraatioindeksin (PI), solusyklin, tumasiltojen tai mikrotumien) arvioinnilla voidaan saada hyödyllistä tietoa, mutta sitä ei saa käyttää PSK:n tai SMSL:n sijasta.

Vähintään kolmea hyväksyttävyysperusteet (asianmukainen sytotoksisuus, solumäärä jne.) täyttävää testipitoisuutta (pois lukien liuotinkontrolli ja positiiviset kontrollit) on arvioitava. Solujen tyypistä riippumatta (solulinjat tai primaariset lymfosyyttiviljelmät) kullekin testattavalle pitoisuudelle voidaan altistaa kaksi rinnakkaista viljelmää tai vain yksi viljelmä. Vaikka rinnakkaisten viljelmien käyttö on suositeltavaa, vain yhden viljelmän käyttö on myös hyväksyttävää edellyttäen, että yksittäisestä viljelmästä tai rinnakkaisviljelmistä lasketaan sama kokonaismäärä soluja. Yhden viljelmän käyttö on erityisen merkityksellistä, kun arvioidaan useampaa kuin kolmea pitoisuutta (ks. 44–45 kohta). Riippumattomista rinnakkaisviljelmistä tietyllä pitoisuudella saadut tulokset voidaan yhdistää analyysia varten. Sellaisten testikemikaalien kohdalla, jotka osoittavat vähän tai eivät lainkaan sytotoksisuutta. sopiva pitoisuuksien välinen kerroin on yleensä 2–3. Jos sytotoksisuutta esiintyy, valittujen testipitoisuuksien on katettava vaihteluväli 29 kohdassa kuvatusta sytotoksisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan. Monien testikemikaalien pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, ja tietojen saamiseksi vähäisestä ja keskitason sytotoksisuustasosta tai annosvastesuhteen tutkimiseksi tarkasti on käytettävä pitoisuuksia, jotka ovat lähempänä toisiaan, ja/tai useampaa kuin kolmea pitoisuutta (yksittäisiä viljelmiä tai rinnakkaisviljelmiä) erityisesti tilanteissa, joissa tarvitaan toistettuja kokeita (ks. 60 kohta).

Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, suurimmassa pitoisuudessa sytotoksisuuden olisi oltava 55 ± 5 prosenttia suositeltuja sytotoksisuusparametreja käyttäen (solulinjojen SMSL:n ja PSK:n väheneminen, kun sytoB:tä ei käytetä, ja sytokineesin eston proliferaatioindeksin tai RI:n pieneneminen 45 ± 5 prosentin tasoon samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista, kun sytoB:tä käytetään (72). Tulkittaessa vain tämän sytotoksisuuden 55 ± 5 prosentin vaihteluvälin yläpäässä havaittuja positiivisia tuloksia on oltava varovainen (71).

▼M7

Sellaisten huonosti liukenevien testikemikaalien kohdalla, jotka eivät ole sytotoksisia pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, suurimmassa analysoitavassa pitoisuudessa on esiinnyttävä testikemikaalilla käsittelyn päättyessä silmin tai käänteismikroskoopilla havaittavaa sameutta tai saostumista.Vaikka sytotoksisuutta esiintyisi pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, on suosit eltavaa testata vain yhdessä sameutta tai näkyvää saostumista aiheuttavassa pitoisuudessa, koska saostuminen saattaa aiheuttaa vääriä vasteita. Saostumista aiheuttavissa pitoisuuksissa on huolehdittava siitä, että saostuminen ei vaikuta testin suorittamiseen (esimerkiksi värjäykseen tai laskemiseen). Ennen koetta saattaa olla hyödyllistä määrittää liukoisuus soluviljelmän elatusaineeseen.

Jos saostumista tai rajoittavaa sytotoksisuutta ei esiinny, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 10 mM, 2 mg/ml tai 2 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin (73) (74) (75). Jos testikemikaalin koostumusta ei ole määritelty eli se on esimerkiksi koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksien reaktiotuote tai biologinen materiaali (UCVB) (76) tai ympäristöstä otettu näyte, suurimman pitoisuuden on riittävän sytotoksisuuden puuttuessa ehkä oltava suurempi (esimerkiksi 5 mg/ml) kunkin osan pitoisuuden lisäämiseksi. On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (93).

Kontrollit

Jokaisena solujen keräämisajankohtana on otettava samanaikaisesti näytteet myös negatiivisista kontrolleista (ks. 21 kohta), jotka koostuvat pelkästä tutkittavaa ainetta sisältävässä kasvatusväliaineessa olevasta liuottimesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä.

Samanaikaisia positiivisia kontrolleja tarvitaan, jotta voidaan osoittaa laboratorion kyky tunnistaa klastogeenejä ja aneugeenejä käytetyn testisuunnitelman olosuhteissa sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus (tarvittaessa). Esimerkkejä positiivisista kontrolleista esitetään jäljempänä taulukossa 1. Vaihtoehtoisia positiivisia kontrollikemikaaleja voidaan käyttää perustelluissa tapauksissa.

Tähän mennessä ei ole havaittu, että yhdenkään aneugeenin genotoksinen toiminta edellyttäisi metabolista aktivaatiota (17). Koska nisäkässoluilla tehtävät *in vitro* -geenitoksisuustestit on standardoitu riittävästi samanaikaisesti metabolisen aktivaation kanssa ja ilman sitä tehtäviä ja lyhyitä kestoltaan samoja käsittelyjä varten, positiivisten kontrollien käyttö voidaan rajoittaa metabolista aktivaatiota edellyttävään klastogeeniin. Tässä tapauksessa yksikin klastogeeninen positiivinen kontrollisvaste osoittaa sekä metaboolisen aktivaatiojärjestelmän toiminnan että testijärjestelmän herkkyyden. Pidennetyllä käsittelyllä (ilman S9-jaetta) on kuitenkin oltava oma positiivinen kontrollinsa, koska käsittelyn kesto poikkeaa testistä, jossa käytetään metabolista aktivaatiota. Jos lyhyen metabolisen aktivaation kanssa ja ilman sitä suoritettavan käsittelyn ainoaksi positiiviseksi kontrolliksi valitaan klastogeeni, pidennetyn ilman metabolista aktivaatiota suoritettavan käsittelyn kontrolliksi on valittava aneugeeni. Sekä klastogeenisuuden että aneugeenisuuden positiivisia kontrollikemikaaleja on käytettävä metabolialtaan soveltuvissa soluissa, joissa ei tarvita S9-jaetta

Kutakin positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä yhtenä tai useampana pitoisuutena, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa olevan lisääntymisen taustaan verrattuna, mikä osoittaa koejärjestelmän herkkyyden (vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä), eikä tässä testimenetelmässä määritetyt raja-arvot ylittävä sytotoksisuustaso saa vaarantaa vasteen luotettavuutta.

▼M7

Taulukko 1

Laboratorion pätevyyden arviointia ja positiivisten kontrollien valintaa varten suositellut vertailukemikaalit

Luokka	Kemikaali	CAS-nro
1. **Klastogeenit, jotka ovat aktiivisia ilman metabolista aktivaatiota**		
	Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3
	Mitomysiini C	50-07-7
	4-nitrokinoliini-N-oksidi	56-57-5
	Sytosiiniarabinosidi	147-94-4
2. **Klastogeenit, jotka edellyttävät metabolista aktivaatiota**		
	Bentso(a)pyreeni	50-32-8
	Syklofosfamidi	50-18-0
3. **Aneugeenit**		
	Kolkisiini	64-86-8
	Vinblastiini	143-67-9

MENETTELY

Altistusohjelma

Jotta aneugeenin tai klastogeenin toiminta tietyssä solusyklin vaiheessa voidaan mahdollisimman todennäköisesti osoittaa, on tärkeää, että testikemikaalilla käsitellään riittävä määrä soluja niiden kaikissa solusyklin vaiheissa. Kaikki käsittelyt on käynnistettävä ja saatava päätökseen, kun solut kasvavat eksponentiaalisesti, ja solujen on jatkettava kasvuaan näytteenottoajankohtaan asti. Solulinjojen ja primääristen soluviljelmien käsittelyaikataulu voi näin ollen poiketa jonkin verran lymfosyyttien käsittelyaikataulusta, sillä niiden solusyklin käynnistyminen edellyttää mitogeenista stimulaatiota (17). Tehokkain menetelmä lymfosyyteille on aloittaa testikemikaalille altistaminen 44–48 tunnin kuluttua PHA-stimulaatiosta, kun solut jakautuvat asynkronisesti (6).

Julkaistujen tietojen perusteella (19) useimmat aneugeenit ja klastogeenit voidaan osoittaa S9-jakeen kanssa ja ilman S9-jaetta toteutettavalla 3–6 tuntia kestävällä lyhyellä käsittelyjaksolla, jonka jälkeen testikemikaali poistetaan ja solut kerätään noin 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua käsittelyn aloittamisen jälkeen (7).

Negatiivisen tuloksen vahvistamiseksi tarvittavaa perusteellista arviointia varten testi on kuitenkin suoritettava kaikissa seuraavissa kolmessa testiolosuhteissa, joissa käytetään lyhytkestoista käsittelyä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa sekä ilman metabolista aktivaatiota (ks. 56, 57 ja 58 kohta)

— Soluja on altistettava tutkittavalle aineelle ilman metabolista aktivaatiota 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua altistuksen aloittamisesta (19).

— Soluja on altistettava tutkittavalle aineelle metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa 3–6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua altistuksen aloittamisesta (19).

▼M7

— Soluja on altistettava tutkittavalle aineelle ilman metabolista aktivaatiota näytteenottoon asti, joka tehdään suunnilleen 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua.

Jos joissakin edellä esitetyistä testiolosuhteista saadaan positiivinen vaste, muita altistusohjelmia ei ole välttämättä tarpeen tutkia.

Jos tiedetään tai oletetaan, että testikemikaali vaikuttaa solusyklin kestoon (esimerkiksi kun testataan nukleosidianalogeja) erityisesti testattaessa p53-proteiinia vastaanottamaan kompetentteja soluja (35) (36) (77), näytteenotto- tai palautumisaikoja voidaan pidentää vielä 1,5–2,0 normaalia solusykliä vastaavalla ajalla (eli yhteensä 3,0–4,0 solusyklin mittaisiksi lyhyt- ja pitkäkestoisen käsittelyn aloittamisesta). Näin voidaan ottaa huomioon testikemikaalin ja sytoB:n mahdollinen vuorovaikutus. Kun käytetään pidennettyjä näytteenottoaikoja (yhteensä 3,0–4,0 solusyklin mittaisia viljelyaikoja), on huolehdittava siitä, että solut jakautuvat yhä aktiivisesti. Esimerkiksi lymfosyyttien eksponentiaalinen kasvu voi hidastua 96 tunnin kuluttua stimulaatiosta, ja yksikerrosviljemistä voi tulla konfluentteja.

Solujen ehdotetut käsittelyaikataulut esitetään taulukossa 2. Näitä yleisiä käsittelyaikatauluja voidaan mukauttaa (tämä on perusteltava) testikemikaalin stabiiliuden tai reaktiivisuuden tai käytettävien solujen erityisten kasvuominaisuuksien mukaisesti.

Taulukko 2

Solujen käsittely- ja keräämisajankohdat MNvit-testissä

Lymfosyytit, primaarisolut ja solulinjat, jotka on käsitelty sytoB:llä	+ S9 Lyhyt käsittely	Käsitellään 3–6 tuntia S9:n kanssa; poistetaan S9 ja käsittelyväliaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua käsittelyn aloittamisen jälkeen.
	– S9 Lyhyt käsittely	Käsitellään 3–6 tuntia; poistetaan käsittelyväliaine; lisätään uusi väliaine ja sytoB; kerätään 1,5–2,0 normaalin solusyklin kuluttua käsittelyn aloittamisen jälkeen.
	– S9 Pidennetty käsittely	Käsitellään 1,5–2 normaalin solusyklin ajan sytoB:n kanssa; kerätään käsittelyjakson päättyessä.
Solulinjat, joita ei ole käsitelty sytoB:n kanssa (Samat käsittelyaikataulut, mutta sytoB:tä ei lisätä)		

Yksikerrosviljelmissä voi esiintyä mitoosissa olevia soluja (pyöreitä, irtoavat pinnasta) 3–6 tuntia kestävän käsittelyn päättyessä. Koska mitoosissa olevat solut irtoavat helposti, ne voivat hävitä testikemikaalia sisältävän väliaineen mukana, kun se kaadetaan pois. Jos mitoosissa olevien solujen määrän havaitaan lisääntyvän huomattavasti kontrolleihin verrattuna, mikä viittaa todennäköisesti mitoosin pysähtymiseen, solut on kerättävä sentrifugoimalla ja palautettava viljelmään, jotta mitoosivaiheessa olevia soluja, joissa mikrotumia/kromosomipoikkeavuuksia voi muodostua, ei menetetä keruuvaiheessa.

▼M7

Solujen kerääminen ja objektilasien preparointi

Jokainen viljelmä kerätään ja käsitellään erikseen. Solujen preparointiin voidaan käyttää hypotonista käsittelyä, mutta tämä vaihe ei ole tarpeen, jos solut levittäytyvät lasille riittävästi. Objektilasien preparoinnissa voidaan käyttää erilaisia tekniikoita edellyttäen, että pisteytystä varten saadaan korkealaatuisia solupreparaatteja. Solut, joiden solukalvo ja solulima ovat vahingoittumattomia, on säilytettävä mikrotumien osoittamista ja (sytokineesin estämiseen perustuvassa menetelmässä) kaksitumaisten solujen luotettavaa tunnistamista varten.

Objektilasit voidaan värjätä erilaisilla menetelmillä, kuten Giemsa-menetelmällä tai fluorisoivilla DNA-spesifisillä väriaineilla. Asianmukaisten fluorisoivien väriaineiden (esimerkiksi akridiinioranssin (78) tai Hoechst 33258:n plus pyroniini-Y:n (79)) käytöllä voidaan eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Mikrotumien sisällön selvittämisessä (kokonaiset kromosomit värjäytyvät, mutta asentriset kromosomifragmentit eivät) voidaan käyttää anti-kinetokorivasta-aineita, FISH-tekniikkaa yhdessä pansentromeeri-DNA-koettimien kanssa tai *in situ* -merkkausta pansentromeerispesifisillä alukkeilla yhdessä sopivan DNA:n vastavärjäyksen kanssa, jos mikrotumien muodostumisesta halutaan saada mekanistista tietoa (16) (17). Muita klastogeenien ja aneugeenien erottelumenetelmiä voidaan käyttää, jos menetelmät on osoitettu tehokkaiksi ja validoitu. Esimerkiksi tietyissä solulinjoissa sellaisten tumien määrittäminen, joiden kromosomimäärä on alle 2N, hypodiploidisina tapahtumina kuva-analyysin, laserpyyhkäisysytometrian tai virtaussytometrian kaltaisten menetelmien avulla voi myös antaa hyödyllistä tietoa (80) (81) (82). Myös morfologiset havainnot tumista voivat antaa viitteitä mahdollisesta aneuploidiasta. Lisäksi metafaasissa olevien solujen kromosomipoikkeavuustesti, joka suoritetaan mieluiten samalla solutyypillä ja herkkyydeltään vastaavalla testisuunnitelmalla, saattaa myös olla hyödyllinen tapa määrittää, johtuvatko mikrotumat kromosomien katkeamisesta (kun tiedetään, että kromosomien häviämää ei havaittaisi kromosomipoikkeavuustestissä).

Analyysi

Kaikki objektilasit, myös negatiivisia ja käsittelemättömiä kontrolleja (jos niitä käytetään) ja positiivisia kontrolleja sisältävät, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikrotumien esiintymistaajuuden mikroskooppitutkimusta. Käytettäessä automatisoitua pisteytysjärjestelmää, kuten virtaussytometriaa, laserpyyhkäisysytometriaa tai kuva-analyysia, on käytettävä tarvittavia menetelmiä mahdollisten virheiden tai muutosten valvomiseksi. Riippumatta siitä, käytetäänkö mikrotumien laskentaan automaattista järjestelmää, olisi arvioitava samanaikaisesti sytokineesin eston proliferaatioindeksi, RI, PSK tai SMSL.

SytoB-käsiteltyjen viljelmien mikrotumien määrä on analysoitava vähintään 2 000 kaksitumaisessa solussa kutakin pitoisuutta ja kontrollia kohti (83). Solujen on jakauduttava tasaisesti rinnakkaisviljelmien kesken, mikäli niitä käytetään. Jos käytetään yhtä erillistä viljelmää (ks. 28 kohta), viljelmästä on laskettava vähintään 2 000 kaksitumaista solua viljelmää kohti (83). Jos kussakin pitoisuudessa laskettavissa on huomattavasti vähemmän kuin 1 000 kaksitumaista solua (jos käytetään rinnakkaisviljelmiä) tai 2 000 solua (jos käytetään yhtä viljelmää) viljelmää kohti ja jos mikrotumien määrä ei havaintojen mukaan ole kasvanut merkittävästi, testi on toistettava useammilla soluilla tai vähemmän sytotoksisilla pitoisuuksilla sen mukaisesti, kumpi vaihtoehto soveltuu tarkoitukseen paremmin. On varmistettava, että muodoltaan epäsäännöllisiä kaksitumaisia soluja tai soluja, joiden kaksi tumaa poikkeavat kooltaan huomattavasti toisistaan, ei lasketa. Kaksitumaisia soluja ei myöskään saa sekoittaa huonosti levittyneisiin monitumaisiin soluihin. Useampia kuin kaksi päätumaa sisältävistä soluista ei pitäisi analysoida

▼M7

mikrotumia, koska mikrotumien määrä voi olla tällaisissa soluissa suurempi (84). Yksitumaisten solujen laskeminen hyväksytään, jos testikemikaalin on osoitettu häiritsevän sytoB:n aktiivisuutta. Testin toistaminen ilman sytoB:tä saattaa olla tällaisissa tapauksissa hyödyllistä. Yksitumaisten solujen laskeminen kaksitumaisten solujen lisäksi saattaa antaa hyödyllistä tietoa (85) (86), mutta se ei ole pakollista.

Solulinjoissa, jotka testataan ilman sytoB-käsittelyä, mikrotumat olisi pisteytettävä vähintään 2 000 solussa testattavaa pitoisuutta ja kontrollia kohti (83). Solujen on jakauduttava tasaisesti rinnakkaisviljelmien kesken, mikäli niitä käytetään. Jos käytetään yhtä erillistä viljelmää pitoisuutta kohti (ks. 28 kohta), viljelmästä on laskettava vähintään 2 000 kaksitumaista solua viljelmää kohti. Jos kussakin pitoisuudessa laskettavissa on huomattavasti vähemmän kuin 1 000 solua (jos käytetään rinnakkaisviljelmiä) tai 2 000 solua (jos käytetään yhtä viljelmää) viljelmää kohti ja jos mikrotumien määrä ei havaintojen mukaan ole kasvanut merkittävästi, testi on toistettava useammilla soluilla tai vähemmän sytotoksisilla pitoisuuksilla sen mukaisesti, kumpi vaihtoehto soveltuu tarkoitukseen paremmin.

Kun sytoB:tä käytetään, sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on määritettävä solujen proliferaation arvioimiseksi (ks. lisäys 2) käyttämällä vähintään 500:aa solua viljelmää kohti. Kun käsittely tehdään ilman sytoB:tä, on tärkeää esittää todisteet siitä, että laskettavat solut ovat jakautuneet (ks. 24–28 kohta).

Laboratorion pätevyys

Jotta laboratoriolla voidaan todeta olevan riittävä kokemus testistä ennen sen käyttöä rutiinitestauksessa, laboratorion täytyy olla suorittanut useita kokeita positiivisilla vertailukemikaaleilla, jotka vaikuttavat eri mekanismien välityksellä (ainakin yksi metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa ja yksi ilman sitä sekä yksi aneugeenisen mekanismin välityksellä vaikuttava kemikaali, jotka valitaan taulukossa 1 luetelluista kemikaaleista), sekä useita negatiivisia kontrolleja (joihin sisältyy käsittelemättömiä viljelmiä ja erilaisia liuottimia/kantaja-aineita). Näiden positiivisten ja negatiivisten kontrollien vasteiden olisi oltava yhdenmukaisia lähdekirjallisuuden kanssa. Tätä ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta eli joista on käytettävissä 49–52 kohdassa määritelty laboratoriokohtainen tietokanta.

Tiettyjä positiivisia kontrollikemikaaleja (ks. taulukko 1) on tutkittava lyhyillä ja pidennetyillä käsittelyillä ilman metabolista aktivaatiota ja myös lyhyellä käsittelyllä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa, jotta osoitetaan pätevyys havaita klastogeenisia ja aneugeenisia kemikaalisia, määrittää metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus ja osoittaa laskentamenetelmien (mikroskooppianalyysi, virtaussytometria, laserpyyhkäisysytometria tai kuva-analyysi) soveltuvuus. Valittujen kemikaalien eri pitoisuudet on valittava siten, että ne aiheuttavat toistettavissa olevia ja pitoisuuteen liittyviä lisääntymisiä taustaan verrattuna, koejärjestelmän herkkyyden ja dynaamisen alueen osoittamiseksi.

Aiemmat kontrollitiedot

Laboratorion on määritettävä:

— aiempien positiivisten kontrollien vaihteluväli ja jakauma

— aiempien negatiivisten kontrollien (käsittelemättömien ja liuotinkontrollien) vaihteluväli ja jakauma.

Hankittaessa aluksi tietoja aiempien negatiivisten kontrollien jakaumaa varten samanaikaisten negatiivisten kontrollien on oltava yhdenmukaisia julkaistujen negatiivisten kontrollitietojen kanssa, jos sellaisia on olemassa. Kun kontrollien jakaumaan lisätään kokeellisia tietoja, samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava kyseisen jakauman 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (87) (88). Laboratorion aiempien negatiivisten kontrollien tietokanta on aluksi luotava vähintään 10 kokeella, mutta sen olisi mieluiten koostuttava vähintään 20 kokeesta, jotka on suoritettu vastaavissa testiolosuhteissa. Laboratorioiden

▼M7

on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten laadunvalvontakortteja (esimerkiksi C-kortteja tai X-bar-kortteja (88)), positiivisten ja negatiivisten kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja osoittaakseen, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän (83). Lisäsuosituksia aiempien tietojen muodostamisesta ja käytöstä (esimerkiksi perusteet tietojen sisällyttämiseksi aiempiin tietoihin tai jättämiseksi pois niistä sekä kokeiden hyväksyttävyysperusteet) annetaan lähdekirjallisuudessa (87).

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa olisi otettava huomioon tietojen yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aiempia kontrolleja koskevien tietokantojen kanssa. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aiempien kontrollien tietokanta.

Negatiivisten kontrollitietojen on koostuttava mikrotumaisten solujen esiintymistiheydestä yhdessä viljelmässä tai niiden yhteismäärästä rinnakkaisviljelmissä 28 kohdan mukaisesti. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aiempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (87) (88). Jos samanaikaisia negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 prosentin kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aiempien kontrollien jakaumaan edellyttäen, että ne eivät ole äärimmäisiä harha-arvoja ja on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 50 kohta), sekä siitä, että kyse ei ole teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten esittäminen

Jos käytetään sytokineesin inhibiittoritekniikkaa, mikrotumien indusoitumisen arvioinnissa käytetään vain sellaisia kaksitumaisia soluja, joissa esiintyy mikrotumia (riippumatta mikrotumien määrästä solua kohti). Yksi, kaksi tai monta mikrotumaa omaavien solujen määrä voidaan ilmoittaa erikseen, ja sen laskemisella voidaan saada hyödyllistä tietoa, mutta se ei ole pakollista.

Kaikille käsitellyille, negatiivisille ja positiivisille kontrolliviljelmille olisi tehtävä samanaikaisesti sytotoksisuus- ja/tai sytostaasimääritykset (16). Sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI on laskettava kaikille käsitellyille viljelmille ja kontrolliviljelmille määrittämällä solusyklin viivästyminen, kun käytetään sytokineesin estomenetelmää. Jos sytoB:tä ei käytetä, on määritettävä populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen tai solumäärän suhteellisen lisääntyminen (ks. lisäys 2).

Kustakin viljelmästä on esitettävä tiedot erikseen. Kaikista tiedoista on lisäksi esitettävä yhteenveto taulukkomuodossa.

Hyväksyttävyysperusteet

Testin hyväksyttävyysperusteet ovat seuraavat:

— Samanaikainen negatiivinen kontrolli katsotaan hyväksyttäväksi laboratorion aiempien negatiivisten kontrollien tietokantaan 50 kohdan mukaisesti.

— Samanaikaisten positiivisten kontrollien (ks. 50 kohta) on indusoitava vasteita, jotka ovat yhteensopivia laboratorion aiempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa, ja tuotettava tilastollisesti merkittävä lisääntyminen verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin.

— Solujen proliferaatiota koskevien kriteereiden on täytyttävä liuotinkontrollissa (25–27 kohta).

— Testi suoritettiin kaikissa testiolosuhteissa, ellei jokin niistä tuottanut positiivisia tuloksia (36–40 kohta).

— Riittävä määrä soluja ja pitoisuuksia on analysoitavissa (28 sekä 44–46 kohta).

▼M7

— Suurimman pitoisuuden valintaperusteet vastaavat 24–31 kohdassa esitettyjä kriteerejä.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Edellyttäen, että kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi positiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista testiolosuhteista (ks. 36–39 kohta)

— vähintään yksi testipitoisuuksista aiheuttaa tilastollisesti merkittävän lisääntymisen verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin (89)

— lisääntyminen on annoksesta riippuva ainakin yhdessä testiolosuhteista asianmukaisella trenditestillä arvioituna (ks. 28 kohta)

— jokin tuloksista on aiempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuvat 95 prosentin kontrollirajat; katso 52 kohta).

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan indusoida kromosomien katkeamista ja/tai liittymää tai häviämää tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on myös suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (90) (91) (92).

Edellyttäen, että kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi negatiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista testiolosuhteista (ks. 36–39 kohta):

— mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkittävää lisääntymistä verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— pitoisuudesta riippuvaa lisääntymistä ei esiinny asianmukaisella trenditestillä arvioituna

— kaikki tulokset ovat aiempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman sisällä (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuvat 95 prosentin kontrollirajat; katso 52 kohta).

Tällöin katsotaan, että testikemikaali ei voi indusoida kromosomien katkeamista ja/tai liittymää tai häviämää tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on myös suosituksia soveltuvimmista tilastollisista menetelmistä (90) (91) (92).

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen edellä kuvatun mukaisesti ja/tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea, tietoja on arvioitava asiantuntija-arvion ja/tai lisätutkimusten avulla. Lisäsolujen laskeminen (tarvittaessa) tai kokeen toistaminen käyttäen mahdollisesti modifioituja testiolosuhteita (esimerkiksi pitoisuusvälit, muut metaboliset aktivaatiojärjestelmät [kuten S9-jakeen pitoisuus tai alkuperä]) saattaa olla hyödyllistä.

Joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei lisätutkimusten jälkeenkään voida tehdä varmoja päätelmiä positiivisuudesta tai negatiivisuudesta, ja tulokset jäävät näin ollen epäselviksi.

MNvit-testissä testikemikaalit voivat aiheuttaa mikrotumien muodostumista indusoimalla kromosomien katkeamista, niiden häviämistä tai molempia. Antikinetokorivasta-aineilla, sentromeerispesifisillä *in situ* -koettimilla tai muilla menetelmillä voidaan yrittää määrittää, johtuuko mikrotumien indusoitumismekanismi klastogeenisesta ja/tai aneugeenisesta vaikutuksesta.

▼M7

Testiraportti

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalien reagointi liuottimen/kantaja-aineen tai solujen kasvatusväliaineen kanssa

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus soluviljelmän elatusaineessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuvat aineet:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen.

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallinen koostumuksen, esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

Liuotin:

— liuottimen valintaperusteet

— liuottimen pitoisuus lopullisessa kasvatusväliaineessa

Solut:

— käytettyjen solujen tyyppi ja alkuperä

— käytetyn solutyypin soveltuvuus

— solulinjojen osalta mykoplasman puuttuminen

— solulinjojen osalta tiedot solusyklin kestosta tai proliferaatioindeksi

— lymfosyyttien osalta verenluovuttajien sukupuoli, ikä ja muut merkitykselliset tiedot luovuttajista, tieto siitä, onko testissä altistettu kokoverta vai eristettyjä lymfosyyttejä, käytetty mitogeeni

— tavallinen (negatiivisen kontrollin) solusyklin kesto

— solulinjojen osalta siirrostusten lukumäärä, jos saatavilla

— solulinjojen osalta soluviljelymenetelmät

— solulinjojen osalta kromosomien modaalinen lukumäärä

▼M7

Testiolosuhteet:

— mahdollinen sytokineesin inhibiittori (esimerkiksi sytoB), sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto

— testikemikaalin pitoisuus ilmaistuna lopullisena pitoisuutena kasvatusväliaineessa (esimerkiksi µg tai mg/mL tai mM kasvatusväliaineessa)

— pitoisuuksien ja soluviljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esimerkiksi sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset

— väliaineen koostumus ja tarvittaessa CO_2-pitoisuus, kosteuspitoisuus

— kasvatusväliaineeseen lisätyn liuottimen ja testikemikaalin pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubaatiolämpötila ja -aika

— käsittelyn kesto

— käsittelyn jälkeinen keräämisajankohta

— tarvittaessa solutiheys inokuloitaessa

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus (S9-jakeen alkuperä, S9-seoksen valmistusmenetelmä, S9-seoksen ja S9-jakeen pitoisuus tai tilavuus lopullisessa kasvatusväliaineessa, S9-jakeen laadunvalvonta [esimerkiksi entsymaattinen aktiivisuus, steriiliys, metabolointikyky])

— positiiviset ja negatiiviset kontrollikemikaalit, lopulliset pitoisuudet, käsittelyolosuhteet ja käsittelyjen kestot sekä palautumisajat

— objektilasien preparointimenetelmät ja käytetyt värjäystekniikat

— mikrotumaisten solujen laskentaperusteet (analysoitavissa olevien solujen valinta ja mikrotumien tunnistus)

— analysoitujen solujen määrät

— sytotoksisuuden mittausmenetelmät

— muut sytotoksisuuteen ja käytettyyn menetelmään liittyvät tiedot

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— käytetyt tilastoanalyysimenetelmät

— tarvittaessa menetelmät sen määrittämiseksi, sisältävätkö mikrotumat kokonaisia kromosomeja vai kromosomifragmentteja, esimerkiksi kinetokorivasta-aineen tai pansentromeerispesifisten koettimien käyttö

— pH:n, osmolaliteetin ja saostumisen määritysmenetelmät.

Tulokset:

— analysoitavaksi hyväksyttävien solujen määritelmä

— jos sytoB:tä ei käytetä, käsiteltyjen solujen lukumäärä ja solulinjojen osalta kustakin viljelmästä kerättyjen solujen lukumäärä

▼M7

— käytetyt sytotoksisuuden määritysmenetelmät, esimerkiksi sytokineesin eston proliferaatioindeksi tai RI (sytokineesin estoon perustuva menetelmä); solumäärän suhteellinen lisääntyminen tai populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen (muu kuin sytokineesin estoon perustuva menetelmä); tarvittaessa muut havainnot (esimerkiksi solujen konfluenssi, apoptoosi, nekroosi, metafaasien määrä ja kaksitumaisten solujen määrä)

— saostumisen merkit ja määrittämisajankohta

— tiedot käsittelyväliaineen pH:sta ja osmolaliteetista, jos määritetty

— yksi-, kaksi- ja monitumaisten solujen osuudet, jos sytokineesin estoon perustuvaa menetelmää on käytetty

— mikrotumaisten solujen määrä kussakin käsitellyssä viljelmässä ja kontrolliviljelmässä ja tiedot solujen mahdollisesta kaksitumaisuudesta tai monitumaisuudesta

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisten negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aiemmat tiedot negatiivisista (liuotin) ja positiivisista kontrolleista, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat sekä jakauman 95 prosentin kontrollirajat sekä tietojen lukumäärä

— tilastoanalyysi; mahdolliset p-arvot.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDELUETTELO

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris..

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 1–4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, s. 3–15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, s. 233–246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, s. 167–172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, s. 1084–1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, Vol. 161/2, s. 193–198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, s. 34–43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research*, Vol. 234/5, s. 9–20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, s. 297–302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, s. 329–334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*, Vol. 319/3, s. 205–213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, s. 519–525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research*, Vol. 322/1, s. 9–20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research*, Vol. 372/2, s. 233–245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 372/2, s. 211–219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research*, Vol. 540/2, s. 153–163.

(18) Tässä liitteessä oleva B.10 luku: *Kromosomipoikkeavuustesti nisäkässoluilla in vitro*.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research*, Vol. 607/1, s. 13–36.

(20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 607/1, s. 37–60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, s. 61–87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, s. 88–124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research*, Vol. 607/1, s. 125–152.

(24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 187–208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 45–59.

▼M7

(26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, s. 81–116.

(27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, Vol. 439/2, s. 183–190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 445/1, s. 55–71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Research*, Vol. 468/2, s. 137–163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, s. 123–134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, s. 569–580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 607/1, s. 1–152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Research*, Vol. 702/2, s. 139–147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, s. 28–36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, s. 373–384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, s. 105–115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC:in 25. kokous, 16.–17. marraskuuta 2006. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/index.htm

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Saatavilla osoitteessa http://ecvam.jrc.it/index.htm

(39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, s. 271–283.

(40) ILSI paper (luonnos). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation research.*

▼M7

(41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research*, Vol. 257/2, s. 147–205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, Vol. 268/2, s. 297–305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, s. 789–886.

(44) Long, L.H. *et al*. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, s. 177–183.

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, s. 439–452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, s. 29–36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research*, Vol. 392, s. 11–18.

(48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, s. 825–840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, s. 251–259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, s. 555–560.

(51) Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, s. 295–304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, s. 257–260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, s. 315–328.

(54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, s. 61–70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001). Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, s. 31–45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, s. 173–215.

(57) Ong, T.-m. *et al*. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, s. 55–65.

▼M7

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, s. 175–177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976). ”A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems”, teoksessa *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (toim.), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, s. 51–59.

(61) UNEP (2001). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus, Yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelma (UNEP). Saatavilla osoitteessa http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol. 190/3, s. 225–228.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). ”CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids”, teoksessa Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (toim.), Plenum, New York, s. 91–103.

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, s. 795–801.

(65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, s. 122–130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, Vol. 285/1, s. 35–44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, s. 103–112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to ”Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”. *Mutation Research,* 564, s. 97–100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, s. 1–3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, Vol. 341/3, s. 169–184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, s. 86–87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, s. 101–107.

(73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Saatavilla pyynnöstä.

▼M7

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, s. 32–56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, s. 36–43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research,* Vol. 746/1, s. 29–34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research*, Vol. 120/4, s. 241–247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, s. 269–275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, s. 280–286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, s. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, s. 33–40.

(83) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, s. 65–75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, s. 193–198.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, s. 873–899.

(87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, s. 87–90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2. painos., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). "*In vitro* micronucleus test", teoksessa *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2. painos, Chow, S. (toim.), Marcel Dekker, Inc. New York, s. 463–467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3. painos, John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al*. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays, teoksessa *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (toim.), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aneugeeni: aine tai prosessi, joka on vuorovaikutuksessa solun mitoottisen ja meioottisen jakautumissyklin vaiheiden kanssa johtaa solujen tai organismien aneuploidiaan.

Aneuploidia: yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Apoptoosi: ohjelmoitunut solukuolema, jossa tietyt vaiheet johtavat solujen hajoamiseen solukalvon ympäröimiksi rakkuloiksi, jotka myöhemmin häviävät fagosytoosin tai puhkeamisen seurauksena.

Genotoksinen: yleinen nimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa katkeamiselle, deleetioille, addukteille, nukleotidien muutoksille ja sidoksille, uudelleenjärjestäytymiselle, geenimutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Interfaasisolut: solut, jotka eivät ole mitoosivaiheessa.

Kemikaali: aine tai aineiden seos.

Kinetokori: proteiinia sisältävä rakenne, joka rakentuu kromosomin sentromeerin kohdalle, johon tumasukkulat kiinnittyvät solun jakautumisen aikana ja jonka ansiosta tytärkromosomit voivat liikkua kohti tytärsolujen napoja.

Klastogeeni: aine tai prosessi, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solu- tai organismipopulaatioissa.

Käsittelemätön kontrolli: soluviljelmät, joita ei altisteta (eli joihin ei lisätä testikemikaalia eikä liuotinta), mutta jotka käsitellään samanaikaisesti samalla tavoin kuin testikemikaalia saavat soluviljelmät.

Liuotinkontrolli: yleinen nimitys kontrolliviljelmille, joihin lisätään vain testikemikaalin liuottamiseen käytettyä liuotinta.

Maksan S9-jae: maksan homogenaatin supernatantti 9 000 g:n sentrifugoinnin jälkeen, ts. käsittelemättömästä maksasta eristetty osa.

Mikrotumat: pienet tumat, jotka eivät ole solujen varsinaisia tumia vaan esiintyvät niiden lisäksi ja jotka muodostuvat hitaasti liikkuvista kromosomifragmenteista tai kokonaisista kromosomeista mitoosin tai meioosin telofaasin aikana.

Mitoosi: solutuman jakautuminen, joka jaotellaan yleensä profaasiin, prometafaasiin, metafaasiin, anafaasiin ja telofaasiin.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Mutageeninen: aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Nondisjunktio: häiriö, jossa kromatidiparit eivät erkaannu toisistaan ja jakaudu oikein kehittyviin tytärsoluihin, minkä takia tytärsolujen kromosomimäärä poikkeaa tavallisesta.

▼M7

p53-status: p53-proteiini osallistuu solusyklin säätelyyn, apoptoosiin ja DNA:n korjautumiseen. Solut, joista puuttuu toimiva p53-proteiini tai jotka eivät pysty pysäyttämään solusykliä tai hävittämään vahingoittuneita soluja apoptoosilla tai muilla p53-proteiinin toimintoihin liittyvillä mekanismeilla (esimerkiksi indusoimalla DNA:n korjautumisen, ovat teoriassa alttiimpia geenimutaatioille tai kromosomipoikkeavuuksille.

Pitoisuudet: testikemikaalin lopulliset pitoisuudet kasvatusväliaineessa.

Polyploidia: solujen tai organismien kromosomien lukumäärää koskeva poikkeavuus, joka koskee yksittäisen kromosomin tai kromosomien (aneuploidia) sijaan koko kromosomistoa.

Populaation suhteellinen kaksinkertaistuminen (PSK): sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (ks. kaava lisäyksessä 2).

Proliferaatioindeksi (PI): sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (ks. kaava lisäyksessä 2).

Replikaatioindeksi (RI): altistus- ja palautumisjakson aikana päättyneiden solunjakautumissyklien osuus käsitellyssä viljelmässä verrattuna käsittelemättömään kontrolliviljelmään (ks. kaava lisäyksessä 2).

S9-seos: S9-jakeen ja metabolisen entsyymitoiminnan kannalta välttämättömien kofaktorien seos.

Sentromeeri: kromosomin DNA:n alue, jossa kromatidit liittyvät yhteen ja johon molemmat kinetokorit kiinnittyvät rinnakkain.

Solujen proliferaatio: solujen määrän kasvaminen solujen mitoottisen jakautumisen seurauksena.

Solumäärän suhteellinen lisääntyminen (SMSL): sytotoksisuuden mittausmenetelmä, kun sytoB:tä ei käytetä (ks. kaava lisäyksessä 2).

Sytokineesi: solun jakautuminen välittömästi mitoosin jälkeen, jolloin muodostuu kaksi yksitumaista tytärsolua.

Sytokineesin eston proliferaatioindeksi (SEPI): toisen jakautumisvaiheen solujen osuus käsitellyssä populaatiossa käsittelemättömään kontrollipopulaatioon verrattuna (ks. kaava lisäyksessä 2).

Sytostaasi: solujen kasvun estäminen (ks. kaava lisäyksessä 2).

Sytotoksisuus: Tämän testimenetelmän kattamien, sytokalasiini B:n läsnäollessa suoritettujen testien osalta sytotoksisuus määritellään käsiteltyjen solujen sytokineesin eston proliferaatioindeksin (SEPI) tai replikaatioindeksin (RI) pienenemiseksi negatiiviseen kontrolliin verrattuna (ks. 26 kohta ja lisäys 2).

Tämän testimenetelmän kattamien, ilman sytokalasiini B:tä suoritettujen testien osalta sytotoksisuus määritellään käsiteltyjen solujen populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen (PSK) tai solumäärän suhteellisen lisääntymisen (SMSL) vähentymiseksi negatiiviseen kontrolliin verrattuna (ks. 27 kohta ja lisäys 2).

Testikemikaali: aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M7

Lisäys 2

KAAVAT SYTOTOKSISUUDEN MÄÄRITYSTÄ VARTEN

Kun sytoB:tä käytetään, sytotoksisuuden arvioinnin on perustuttava **sytokineesin eston proliferaatioindeksiin (SEPI)** tai **replikaatioindeksiin (RI)** (17) (69). Sytokineesin eston proliferaatioindeksi ilmaisee tumien keskimääräistä määrää solua kohti, ja sitä voidaan käyttää solujen proliferaation laskemiseen. RI ilmaisee solusyklien suhteellista määrää solua kohti käsitellyissä viljelmissä sytoB:lle altistamisen aikana verrattuna kontrolliviljelmiin, ja sitä voidaan käyttää sytostaasiasteen (sytostaasi- %) laskemiseen seuraavasti:

$$\text{sytostaasi-}\ \% = 100 - 100\{(\text{SEPI}_T - 1) \div (\text{SEPI}_C - 1)\}$$

ja:

T = testikemikaalilla käsitelty viljelmä

C = kontrolliviljelmä

jossa

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{yksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{kaksitumaisten solujen määrä}) + (3 \times \text{monitumaisten solujen määrä}))}{(\text{solujen kokonaismäärä})}$$

Näin ollen, jos SEPI = 1 (kaikki solut ovat yksitumaisia), sytostaasi on 100 %.

Sytostaasi = 100 − RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{yksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{monitumaisten solujen määrä}))/(\text{solujen kokonaismäärä})_T}{((\text{yksitumaisten solujen määrä}) + (2 \times \text{monitumaisten solujen määrä}))/(\text{solujen kokonaismäärä})_C} \times 100$$

T = käsitellyt viljelmät

C = kontrolliviljelmät

Näin ollen, jos RI = 53 %, kontrolliviljelmässä kaksitumaisiksi ja monitumaisiksi soluiksi jakaantuneiden solujen määrään verrattuna vain 53 % soluista jakaantui käsitellyssä viljelmässä, eli sytostaasi on 47 %.

Kun sytoB:tä ei käytetä, sytotoksisuus on arvioitava **solumäärän suhteellisen lisääntymisen (SMSL)** tai **populaation suhteellisen kaksinkertaistumisen (PSK)** perusteella (69), koska molemmissa otetaan huomioon jakaantuneen solupopulaation osuus.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{solujen määrän lisääntyminen käsitellyissä viljelmissä}(\text{loppu} - \text{alku}))}{(\text{solujen määrän lisääntyminen kontrolliviljelmissä}(\text{loppu} - \text{alku}))} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{populaatioiden kaksinkertaistumisen määrä käsitellyissä viljelmissä})}{(\text{populaatioiden kaksinkertaistumisen määrä kontrolliviljelmissä})} \times 100$$

jossa

populaation kaksinkertaistuminen = [log (solumäärä käsittelyn jälkeen ÷ alkuperäinen solumäärä)] ÷ log 2

Näin ollen, jos SMSL tai PSK = 53 %, sytotoksisuus/sytostaasi = 47 %.

▼M7

Sytotoksisuutta voidaan arvioida **proliferaatioindeksin (PI)** avulla laskemalla 1 solusta (kl1), 2 solusta (kl2), 3 tai 4 solusta (kl4) ja 5–8 solusta (kl8) muodostuneiden kloonien määrä seuraavasti

$$\mathrm{PI} = \frac{((1 \times \mathrm{cl1}) + (2 \times \mathrm{cl2}) + (3 \times \mathrm{cl4}) + (4 \times \mathrm{cl8}))}{(\mathrm{cl1} + \mathrm{cl2} + \mathrm{cl4} + \mathrm{cl8})}$$

Proliferaatioindeksiä on käytetty sytotoksisuuden tärkeänä ja luotettavana parametrina myös ilman sytoB:tä *in vitro* viljellyille solulinjoille (35) (36) (37) (38), ja sitä voidaan pitää hyödyllisenä lisäparametrina.

Joka tapauksessa solujen määrän ennen käsittelyä olisi oltava sama käsitellyissä ja negatiivisissa kontrolliviljelmissä.

Vaikka solumäärän suhteellista lisääntymistä (solujen lukumäärä käsitellyissä viljelmissä / solujen lukumäärä kontrolliviljelmissä) on aiemmin käytetty sytotoksisuuden parametrina, sitä ei enää suositella, koska se voi johtaa sytotoksisuuden aliarviointiin.

Käytettäessä automaattisia laskentajärjestelmiä, kuten virtaussytometriaa, laserpyyhkäisysytometriaa tai kuva-analyysia, kaavassa käytetty solumäärä voidaan korvata tumien määrällä.

Negatiivisissa kontrolliviljelmissä populaation kaksinkertaistumisen tai replikaatioindeksin määrittämisessä on noudatettava vaatimusta ottaa soluista näyte noin 1,5–2,0 normaalia solusykliä vastaavan ajan kuluttua käsittelyn jälkeen.

▼M3

B.50. **IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ: DA**

JOHDANTO

1. Kemikaalien testausta koskevia OECD:n suuntaviivoja ja EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Ensimmäinen, hiiren ihoherkistyksen määrittämisessä käytettävä testimenetelmä (B.42) eli paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429) on tarkistettu (1). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja siihen liittyvän työn arviointi on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) LLNA-menetelmässä lymfosyyttien proliferaatio määritetään radioisotoopilla leimatun tymidiinin tai jodin avulla. Siksi määritysmenetelmän käyttö on rajattua paikoissa, joissa radioaktiivisten aineiden hankkiminen, käyttö tai hävittäminen on ongelmallista. LLNA: DA -menetelmä (jonka on kehittänyt Daicel Chemical Industries, Ltd) on LLNA-menetelmän mukautus, jossa ei käytetä radioaktiivisia merkkiaineita, vaan jossa lymfosyyttien proliferaatio määritetään bioluminesenssin avulla määritettävän adenosiinitrifosfaattipitoisuuden (ATP-pitoisuuden) avulla. Kansainvälinen vertaisarviointityöryhmä on arvioinut LLNA: DA -testimenetelmän, validoinut sen ja katsonut, että sillä voidaan määrittää ihoa herkistäviä ja muunlaisia kemikaaleja tietyin rajoituksin (10) (11) (12) (13). Tässä selostettu testimenetelmä on suunniteltu kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseen eläimillä. Tämän liitteen B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (14). Käytettäessä LLNA-menetelmää (tämän liitteen B.42 luku; OECD:n testiohje 429) ja sen kahta muuhun kuin radioaktiivisuuteen perustuvaa muunnosta eli LLNA: DA -menetelmää (tämän liitteen B.50 luku; OECD:n testiohje 442 A) ja LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää (tämän liitteen B.51 luku; OECD:n testiohje 442 B) voidaan testeihin käytettävien eläinten määrää vähentää. Näin ollen ne ovat eläinten käytön osalta edistyneempiä B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 (14) tarkoitettuihin marsutesteihin verrattuna.

2. Kuten LLNA-menetelmässä, myös LLNA: DA -menetelmässä tutkitaan ihoherkistyksen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. Koska ihoa herkistäviä aineita voidaan tunnistaa ilman radioaktiivista DNA-merkkiainetta, työssä ei altistuta radioaktiivisuudelle, eikä jätteiden hävittäminen aiheuta ongelmia. Tämä voi johtaa hiirten entistä yleisempään käyttöön ihoa herkistävien aineiden tunnistamisessa, millä puolestaan vähennetään entisestään marsujen käyttämistä ihoherkistyspotentiaalin testauksessa (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) 0.

MÄÄRITELMÄT

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA: DA -menetelmä on LLNA-menetelmän muunnos, jolla voidaan tunnistaa mahdollisia ihoa herkistäviä kemikaaleja tietyin rajoituksin. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA: DA -menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa LLNA-menetelmän tai marsutestin asemesta (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (14), vaan pikemminkin sitä, että määritysmenetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen (10) (11). Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia tietoja ovat

▼M3

muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden testiaineella tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisia kemikaaleja koskevat toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA: DA -menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA: DA -menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaalityyppien testaamiseen (katso 5 kohta)) ja mitä annosta on käytettävä.

5. LLNA: DA on *in vivo* -menetelmä, joten sillä ei lopeteta koe-eläinten käyttöä kosketusherkistyksen arvioinnissa. Sillä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen käytettävien eläinten määrää marsutesteihin verrattuna (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (14). LLNA: DA -menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti edistyneempi (vähemmän kipua ja kärsimystä), koska toisin kuin B.6 menetelmässä ja OECD:n testiohjeessa 406, LLNA: DA -menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkkyysreaktioiden tuottamista. Vaikka LLNA: DA -menetelmä onkin tietyllä tasolla edistyneempi kuin B.6 menetelmä tai OECD:n testiohje 406 (14), siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (esimerkiksi tiettyjen metallien testaus, väärät positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten aineiden osalta (6) (1 ja tämän liitteen B.42 luku) tai testiaineen liukoisuus). Määritystä häiritseviä (16) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406 (14)). Suositellaan, että LLNA-menetelmälle asetettuja rajoituksia (1 ja tämän liitteen B.42 luku) sovelletaan myös LLNA: DA -menetelmään (10). LLNA: DA -menetelmä ei välttämättä sovellu ATP-pitoisuuksiin vaikuttavien, esimerkiksi ATP-inhibiittoreina toimivien aineiden tai sellaisten aineiden testaukseen, jotka vaikuttavat solun sisäisen ATP:n täsmälliseen määrittämiseen (esimerkiksi ATP:tä hajottavat entsyymit, solun ulkopuolinen ATP imusolmukkeessa). Tällaisia tunnettuja rajoituksia lukuun ottamatta aineet on testattava LLNA: DA -menetelmällä, elleivät kyseisten aineiden ominaisuudet vaikuta LLNA: DA -menetelmän tarkkuuteen. Myös positiivisten rajatulosten mahdollisuus on otettava huomioon, kun saadaan stimulaatioindeksiksi (SI) välillä 1,8–2,5 (katso 31–32 kohta). Tämä perustuu 44 aineen validointitietokantaan, jossa aineiden SI $\geq$ 1,8 (katso 6 kohta) ja jossa LLNA: DA -menetelmällä on tunnistettu oikein kaikki 32 herkistystä aiheuttavaa LLNA-ainetta mutta tunnistettu väärin kolme niistä 12 muusta kuin herkistystä aiheuttavasta LLNA-aineesta, joiden SI-arvo on 1,8–2,5 (positiivinen rajatulos) (10). Koska samaa tulosjoukkoa on käytetty SI-arvojen määrittämiseen ja testin ennakoivien ominaisuuksien laskemiseen, esitetyissä tuloksissa voidaan yliarvioida todellisia ennakoivia ominaisuuksia.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

6. LLNA: DA -menetelmän perusperiaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfosyyttien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat testiaineen annostelualueen. Tämä proliferaatio on suhteessa käytettyyn annokseen ja allergeenin voimakkuuteen ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistyksen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä proliferaatiota pelkästään kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan keskimääräiseen proliferaatioon. Kunkin testiryhmän keskimääräisen proliferaation ja

▼M3

sitä vastaavan kontrolliryhmän keskimääräisen proliferaation suhde (SI) määritetään, ja sen on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin 1,8, jotta testiaine olisi syytä arvioida tarkemmin mahdollisesti ihoherkistystä aiheuttavaksi. Tässä määritysmenetelmässä kuvatut menettelyt perustuvat ATP-pitoisuuden mittaamiseen bioluminesenssin avulla (sen tiedetään korreloivan elävien solujen määrää) (17), millä määritetään solujen proliferaation lisääntyminen dreneeraavissa korvalehden imusolmukkeissa (18) (19). Bioluminesenssimenetelmässä lusiferaasientsyymi katalysoi valon muodostusta (luminesenssia) ATP:sta ja lusiferiinista. Reaktio tapahtuu seuraavan kaavan mukaisesti:

$$ATP + Lusiferiini + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oksilusiferiini + AMP + PP_i + CO_2 + Valo$$

ATP	ATP
Luciferin	lusiferiini
O_2	O_2
Luciferase	lusiferaasi
Oxyluciferin	oksilusiferiini
AMP	AMP
PP_i	PP_i
CO_2	CO_2
Light	valo

Emittoituneen valon valovoima on suoraan verrannollinen ATP-pitoisuuteen, ja se mitataan luminometrillä. Lusiferiini-lusiferaasi-määritysmenetelmä on herkkä ATP-pitoisuuden määritysmenetelmä, jota käytetään erilaisissa käyttökohteissa (20).

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Tähän testiin paras eläinlaji on hiiri. LLNA: DA -määritysmenetelmän validointitutkimukset on tehty yksinomaan CBA/J-kannalla, joten sen käyttöä suositellaan (12) (13). Määritysmenetelmässä käytetään nuoria täysikasvuisia naarashiiriä, jotka eivät ole poikineet eivätkä ole tiineenä. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painoerojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA: DA -vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä yhteishäkeissä (21), ellei hiirien pitämiselle erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamerkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliuosten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana, tai ne voidaan laimentaa ennen annostelua. Liukenemattomat kemikaalit, kuten lääkinnällisissä laitteissa yleisesti käytetyt kemikaalit, on uutettava erittäin voimakkaasti asianmukaiseen liuottimeen, jotta saataisiin testausta varten esiin kaikki uuttuvat ainesosat ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

▼M3

Luotettavuuden tarkistus

11. Määritysmenetelmän toimivuus osoitetaan positiivisten kontrollikemikaalien avulla. Herkistystesteissä käytettävän aineen vasteena on saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen. Vasteen on oltava aineelle tyypillinen. Samanaikaisesti on käytettävä positiivista kontrollikemikaalia, koska sillä osoitetaan, että laboratoriolla on riittävä pätevyys kunkin määritysmenetelmän käyttöön. Sen avulla voidaan myös arvioida laboratorioidenvälistä ja laboratorionsisäistä uusittavuutta ja vertailtavuutta. Jotkut sääntelyviranomaiset vaativat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämistä kaikissa tutkimuksissa. Käyttäjien olisikin otettava yhteyttä asiasta vastaaviin viranomaisiin ennen LLNA: DA -määritysmenetelmän käyttöönottoa. Tämän takia suositellaan, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään aina näytteiden kanssa samanaikaisesti, jotta ei tarvitsisi tehdä uusia eläinkokeita sellaisten vaatimusten täyttämiseksi, jotka aiheutuvat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä vain silloin tällöin (katso 12 kohta). Positiivisen kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA: DA -vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan negatiiviseen kontrolliryhmään verrattuna stimulaatioindeksin, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin 1,8. Positiivisen kontrollikemikaalin annospitoisuus on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi SI > 10 on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanelialdehydi (CAS-numero 101-86-0) ja 25-prosenttinen eugenoli (CAS-numero 97-53-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.

12. Vaikka positiivisen kontrolliryhmän samanaikaista käyttöä suositellaan, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin testaus ajoittain (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA: DA -menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka käyttävät LLNA: DA -menetelmää vähintään kerran kuukaudessa), joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA DA -menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä, jotka suoritetaan kohtuullisen ajanjakson (alle yhden vuoden) aikana.

13. Samanaikaista positiivista kontrolliryhmää olisi käytettävä aina, kun LLNA: DA -menettelyjä muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu). Tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava, jotta voidaan päättää, onko kerättävä uusi määritystietoja positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.

14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivisen kontrollikemikaalin tutkimusta ei suoriteta samanaikaisesti vaan vain ajoittain, negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyys voivat vaarantua, jos samanaikaista positiivista kontrollia ei testata ajoittain tehtyjen positiivisten kontrollitestien välillä. Jos esimerkiksi saadaan väärä negatiivinen tulos, kun positiivinen kontrolli ei ole ollut aina samanaikaisesti mukana, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyn yksittäisen tutkimuksen ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn yksittäisen tutkimuksen tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä testiaineen kanssa samanaikaisesti tai vain ajoittain. Olisi myös harkittava pienemmän eläinmäärän käyttämistä testiaineen kanssa samanaikaisesti tehtävää positiivista kontrolliryhmää varten, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että hiiriä voidaan käyttää vähemmän (22).

▼M3

15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit olisi mieluiten testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi asetoni:oliiviöljy, 4:1 v/v), voi joidenkin säännösten mukaan olla tarpeen testata aine myös muussa kuin vakiokantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa (23)). Jos positiivista kontrollikemikaalia testataan samanaikaisesti eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, on samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia varten käytettävä erillistä kantaja-ainekontrollia.

16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia aineita voidaan myös vertailuaineita käyttää osoittamaan, että testimenetelmällä voidaan osoittaa asianmukaisesti tämäntyyppisten aineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi oltava seuraavat ominaisuudet:

— samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavalla aineryhmällä

— tunnetut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— sopivuutta tukevia tietoja LLNA: DA -menetelmästä

— sopivuutta tukevia tietoja muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä.

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota; lisäksi käytetään samanaikaisesti määritettävää negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (joka määritetään samanaikaisesti tai joka on määritetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsäännöllisesti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.

18. Annostaso ja kantaja-aine on valittava lähteissä (2) ja (24) esitettyjen suositusten perusteella. Annostasot valitaan yleensä sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ja niin edelleen. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) sekä rakennetta ja fysikaaliskemiallisia ominaisuuksia koskevat tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa niin, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys kuitenkin vältetään (24) (25). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, voi olla tarpeen tehdä esitesti (katso 21–24 kohta).

19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä. Se on valittava siten, että testiaine liukenee siihen mahdollisimman helposti ja aineen konsentraatio annosteluun sopivassa liuoksessa tai suspensiossa on mahdollisimman suuri. Suositeltavat kantaja-aineet ovat asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v), N,N-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (6), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävin tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta tai kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemista edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). Pelkkiä vesiliuoksia on siis syytä välttää.

▼M3

20. Yksittäisiä hiirten imusolmukkeita prosessoimalla voidaan arvioida eläintenvälistä vaihtelua ja verrata tilastollisesti testiaineella ja kantaja-aineella käsiteltyjen ryhmien tuloksia (katso 33 kohta). Positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentäminen voi olla mahdollista, mutta vain siinä tapauksessa, että tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (22). Tietyt sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Yksittäisiä eläimiä koskevien tietojen säännöllisellä keräämisellä edistetään eläinten hyvinvointia, koska siten vältetään päällekkäiset testaukset, jotka ovat tarpeen, jos sääntelyviranomaisten on tarkasteltava tietyllä tavalla (esimerkiksi eläimistä saatuja mittaustietoja yhdistämällä) saatuja testiainetuloksia myöhemmin muiden vaatimusten (esimerkiksi yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot) perusteella.

Testiä edeltävä kartoitus

21. Jos ei ole tietoja, joiden perusteella päätetään suurin testattava annos (katso 18 kohta), on LLNA: DA -menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostaso selvitettävä ennen päätestiä. Siten saadaan apua enimmäisannoksen valintaan varsinaista LLNA: DA -tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan enimmäisannoksen on vastattava sataa prosenttia nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.

22. Kartoitustesti suoritetaan varsinaista LLNA: DA -tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden proliferaatiota ei arvioida ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai annostelukohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 8). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (25). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta), päivänä 7 (24 tuntia ennen lopettamista) ja päivänä 8. Päivänä 8 korvan paksuus voidaan määrittää myös mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humaanisti. Paikallinen ärsytys on erittäin voimakas, jos eryteemapisteytyksen arvo $\geq$ 3 ja/tai korvan paksuuntuminen $\geq$ 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä (26) (27). Suurin varsinaiseen LLNA: DA -tutkimukseen valittava annos on kartoitusta varten määritetyn konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2

▼M3

Havainto	Pisteet
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Paitsi korvien paksuuden tilastollisesti merkittävää yli 25 prosentin kasvua (26) (27), myös tilastollisesti merkittävää käsiteltyjen hiirten korvien paksuuden lisääntymistä kontrollihiiriin verrattuna on käytetty ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi LLNA-menetelmässä (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tilastollisesti merkittävää paksuuntumista voi esiintyä silloinkin, kun korvan paksuuntuminen on alle 25 prosenttia, mutta sen ei katsota liittyvän spesifisesti erittäin voimakkaaseen ärsytykseen (30) (31) (32) (33) (34).

24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat kokonaisvaltaisessa arvioinnissa olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (35) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA. DA -menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haukkominen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 8 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta kivusta ja kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti (36).

Varsinaisen tutkimuksen aikataulu

25. Määritysmenetelmän aikataulu on seuraava:

— *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Kunkin korvan takaosaan annostellaan 1-prosenttista natriumlauryylisulfaattivesiliuosta (NLS) NLS-liuokseen upotetulla siveltimellä niin että kunkin korvan takaosa peittyy neljällä tai viidellä sivellyksellä. Yhden tunnin kuluttua NLS-käsittelystä kunkin korvan takaosaan annostellaan 25 µl testiaineen, kantaja-aineen tai positiivisen kontrollikemikaalin (samanaikaisen tai hiljattain tehdyn, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.

— *Päivät 2, 3 ja 7:* Toistetaan päivänä 1 suoritettu 1-prosenttisella NLS-vesiliuoksella tehty alustava käsittely ja testiaineen annostelu.

— *Päivät 4, 5 ja 6:* Ei käsittelyä.

— *Päivä 8:* Kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Noin 24–30 tunnin kuluttua päivänä 7 tehdyn annostelun aloittamisesta eläimet lopetetaan humaanisti. Hiiren kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvalehden imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet upotetaan fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja poistamiseen liittyvät tiedot ja kaaviot esitetään lähteessä (22). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa edelleen sisällyttämällä tutkimussuunnitelmaan täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

▼M3

Solususpensioiden valmistus

26. Kunkin hiiren imusolmukeparien soluista valmistetaan yksisolususpensio asettamalla imusolmukkeet kahden objektilasin väliin ja painamalla niitä kevyesti imusolmukkeiden murskaamiseksi. Tämän jälkeen varmistetaan, että kudos on levinnyt objektilaseille ohuesti, ja objektilasit irrotetaan toisistaan varovasti. Molemmilla objektilaseilla oleva kudos suspendoidaan PBS-liuokseen niin, että kumpaakin objektilasia pidetään kallistettuna petrimaljan yläpuolella ja huuhdellaan PBS-liuoksella samalla, kun kudosta raaputetaan objektilasista soluraaputtimella. Negatiivisen kontrolliryhmän eläinten imusolmukkeet ovat pieniä, joten vaihe on suoritettava huolellisesti SI-arvoihin mahdollisesti vaikuttavien artefaktojen välttämiseksi. Molemmat objektilasit on huuhdeltava yhteensä 1 ml:lla PBS-liuosta. Imusolmukeparien soluista petrimaljaan valmistettu suspensio homogenoidaan kevyesti soluraaputtimella. Tämän jälkeen imusolmukeparien soluista valmistetusta suspensiosta otetaan 20 µl:n mittausnäyte mikropipetillä niin, ettei näytteeseen tule mukaan silmämääräisesti havaittavaa kalvoa. Suspensio sekoitetaan 1,98 ml:aan PBS-liuosta, jolloin saadaan 2 ml:n näyte. Tämän jälkeen valmistetaan toinen 2 ml:n näyte samalla menettelyllä niin, että kustakin eläimestä saadaan kaksi näytettä.

Solujen proliferaation määritys (lymfosyyttien ATP-pitoisuuden mittaaminen)

27. Imusolmukkeiden ATP-pitoisuuden kasvua mitataan lusiferiini/lusiferaasimenetelmällä käyttämällä ATP-määrityskittiä, jolla mitataan bioluminesenssia suhteellisina valoyksikköinä (Relative Luminescence Unit, RLU). Määritys tehdään aikana, joka ulottuu imusolmukkeiden eläimestä irrottamisesta ATP-pitoisuuden mittaamiseen. Sen on oltava kunkin eläimen osalta sama noin 30 minuutin tarkkuudella, sillä ATP-pitoisuuden katsotaan laskevan vähitellen sen jälkeen, kun eläin on kuollut (12). Näin ollen menettely, joka käynnistyy korvalehden imusolmukkeiden irrottamisesta ja päättyy ATP-mittaukseen, olisi saatava päätökseen 20 minuutin sisällä etukäteen määritettyyn määräaikaan mennessä, joka on sama kaikille eläimille. ATP:n luminesenssi on mitattava kustakin 2 ml:n näytteestä. Kullakin eläimellä tehdään siis yhteensä kaksi ATP-mittausta. Tämän jälkeen määritetään ATP:n keskimääräinen luminesenssi, jota käytetään myöhemmin tehtävissä laskelmissa (katso 30 kohta).

HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

28. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualueen paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmissa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, liian voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyttävyydestä ja jotka on lopetettava (36).

Ruumiinpainot

29. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humaanin lopettamisen yhteydessä.

TULOSTEN LASKEMINEN

30. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan keskimääräisenä SI:nä. Sl-arvo saadaan jakamalla testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista RLU-arvoista laskettu keskiarvo liuotin/kantaja-ainekontrollin vastaavalla tuloksella. Kantaja-ainekontrolliryhmien SI:n keskiarvo on 1.

▼M3

31. Tulos katsotaan positiiviseksi, kun SI ≥ 1,8 (10). Rajatuloksen (SI-arvo 1,8–2,5) positiivisuuden määrittämiseksi voidaan kuitenkin tarkastella myös annos-vastesuhteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuottimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikemikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (2) (3) (37).

32. Jos positiivisen rajavasteen SI on 1,8–2,5, käyttäjät voivat tulosten positiivisuuden vahvistamiseksi tarkastella SI-arvojen lisäksi myös muita tietoja, kuten annos-vastesuhdetta, merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta tai liian voimakkaasta ärsytyksestä ja tarvittaessa tilastollista merkittävyyttä (10). Lisäksi on syytä ottaa huomioon testiaineen ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistystä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita huomionarvoisia seikkoja käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (4).

33. Kun tietoja kerätään erikseen kustakin hiirestä, tietojen perusteella voidaan analysoida tilastollisesti mahdollista annosvasteen olemassaoloa ja sen voimakkuutta. Tilastoanalyysissä voidaan muun muassa arvioida annos-vastesuhdetta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu samaan aikaan tehtyyn liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään). Tilastollisina analyyseina voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamsin testiä, joilla arvioidaan annos-vasteen suuntauksia, sekä Dunnettin testiä, jolla pareja vertaillaan toisiinsa. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastoanalyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssien mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määritystulosten muuntamista tai non-parametrista tilastoanalyysia. Joka tapauksessa tutkijan on mahdollisesti tehtävä SI-laskelmia ja tilastoanalyyseja sekä käyttäen tiettyjä määrityspisteitä koskevia tietoja (niin sanotut käyrän ulkopuolella olevat vasteet) että ilman niitä.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

34. Mittaustulokset on esitettävä taulukkona, josta käyvät ilmi eläinkohtaiset RLU-arvot, ryhmän eläinkohtaisten RLU-arvojen keskiarvo, siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaiseen liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Testiraportti

35. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),

— jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

— tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

▼**M3**

Koe-eläimet

— CBA-hiirten alkuperä,

— eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,

— eläinten määrä ja ikä,

— eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

— ATP-määrityskitin alkuperä, eränumero ja valmistajan laadunvarmistus-/laadunvalvontatiedot,

— tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,

— perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina kartoitustestin tulokset, jos sellainen on tehty),

— käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),

— tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,

— toksisuuden määritysmenetelmät,

— tulosten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,

— tiedot tutkimussuunnitelmasta poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimuksen suunnitteluun ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

— yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,

— testauslaboratorion samanaikaisesti ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisesti tehtyjen negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) kontrollien tulokset,

— jos mukana ei ollut samanaikaista positiivista kontrollia, viimeisimmän yksittäisen positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivista kontrollia koskevista tiedoista, joiden perusteella positiivista kontrollia ei tarvitse tehdä joka kerta.

Tulokset

— kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe),

— toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna annostelualueen ihoärsytys, jos sellaista esiintyy, erikseen kullekin eläinyksilölle,

— eläinten lopettamisen ja ATP-mittauksen ajankohta kunkin eläimen osalta,

— taulukko yksittäisten hiirten RLU-arvoista ja SI-arvoista kunkin käsitellyn annosryhmän osalta,

— kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisen RLU-arvon keskimääräinen virhetermi ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vasteiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle,

▼M3

— laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläintenvälinen vaihtelu sekä testiaineella että kontrolliaineella käsitellyissä ryhmissä,

— annos-vastesuhde,

— tarvittaessa tilastoanalyysit.

Tulosten pohdinta

— tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastoanalyysit sekä johtopäätös siitä, voidaanko testiainetta pitää ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

(1) OECD (2010). *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol*. 34, s. 999–1002.

(3) Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. ja Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol*. 34, s. 985–997.

(4) Basketter, D. A., Gerberick, G. F. ja Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 36, s. 327–333.

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

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf

(7) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 258–273.

(8) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, a. 274–286.

(9) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. ja Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34, s. 249–257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd, based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH-julkaisunumero 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm

▼M3

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf.

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. ja Ito, M. (2008). Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 58, s. 1–10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. ja Yuasa, A. (2008). Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 58, s. 11–26.

(14) OECD (1992). *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoittessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*. 46, s. 1896–1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 55, s. 90–96.

(17) Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. ja Fletcher J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*. 160, s. 81–88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. ja Matsumoto, S. (1984). Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*. 72, s. 127–132.

(19) Dexter, S. J., Cámara, M., Davies, M. ja Shakesheff, K. M. (2003). Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.* 24, s. 27–34.

(20) Lundin A. (2000). Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*. 305, s. 346–370.

(21) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf

(23) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*. 238, s. 71–89.

(24) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*. 93, s. 13–31.

(25) OECD (2002). *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

(26) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.

(27) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

(28) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.* 21, s. 195–206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 153, s. 83–94.

(30) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.

(31) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol*. 22, s. 491–506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*. 212, s. 60–68.

(33) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.

(34) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec, D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*. 115, s. 1023–1028.

(35) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm

(36) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

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

(38) OECD (2005). *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (38).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testiaineryhmällä, iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vasteen vaihteluvälillä.

Väärä negatiivinen: Aine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen.

Väärä positiivinen: Aine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen.

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratorioidenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin eri (pätevät) laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samoja testiaineita. Laboratorioidenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja se osoittaa, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (38).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin pätevä laboratoriohenkilöstö voi (kyseisessä laboratoriossa) saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (38).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation sattumanvaraisten näytteiden arvoista.

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitomenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on uusittavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa tutkimussuunnitelmaa. Luotettavuus arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus (38).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta tietylle kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samanaikaisesti kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M3

B.51. **IHOHERKISTYS: PAIKALLINEN IMUSOLMUKEMÄÄRITYSMENETELMÄ: BRDU-ELISA**

JOHDANTO

1. Kemikaalien testausta koskevia OECD:n suuntaviivoja ja EU:n testimenetelmiä tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvointiin liittyvien kysymysten perusteella. Ensimmäinen, hiirten ihoherkistyksen määrittämisessä käytettävä testimenetelmä (B.42) eli paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä (Local Lymph Node Assay, LLNA; OECD:n testiohje 429) on tarkistettu (1 ja tämän liitteen B.42 luku). LLNA-menetelmän validointia koskevat yksityiskohtaiset tiedot ja yleiskatsaus siihen liittyneestä työstä on julkaistu (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). LLNA-menetelmässä lymfosyyttien proliferaatio määritetään radioisotoopilla leimatun tymidiinin tai jodin avulla. Siksi määritysmenetelmän käyttö on rajattua paikoissa, joissa radioaktiivisten aineiden hankkiminen, käyttö tai hävittäminen on ongelmallista. LLNA: BrdU-ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritysmenetelmä) on LLNA-testimenetelmän muunnos, jossa ei käytetä radioisotooppeja ja jossa lymfosyyttien proliferaatio määritetään ELISA-testijärjestelmässä käyttämällä ei-radioaktiivisesti merkattua 5-bromi-2-deoksiuridiinia (BrdU) (CAS-numero 59-14-3). Kansainvälinen riippumaton tieteellinen vertaisarviointityöryhmä on arvioinut LLNA: BrdU-ELISA -testimenetelmä, validoinut sen ja katsonut, että sillä voidaan määrittää ihoa herkistäviä ja muita kuin herkistäviä kemikaaleja tietyin rajoituksin (10) (11) (12). Tämä testimenetelmä on suunniteltu kemikaalien (aineiden ja seosten) ihoherkistyspotentiaalin arvioimiseen eläimillä. Tämän liitteen B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 käytetään marsutestejä, erityisesti marsuilla tehtävää maksimointitestiä ja Bühlerin testiä (13). LLNA-menetelmällä (tämän liitteen B.42 luku; OECD:n testiohje 429) ja sen kahdella muuhun kuin radioaktiivisuuteen perustuvalla mukautuksella eli LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä (tämän liitteen B.51 luku; OECD:n testiohje 442 B) ja LLNA: DA -menetelmällä (tämän liitteen B.50 luku; OECD:n testiohje 442 A) voidaan kaikilla vähentää testeihin käytettävien eläinten määrää. Näin ollen ne ovat eläinten käytön osalta edistyneempiä kuin B.6 luvussa ja OECD:n testiohjeessa 406 (13) tarkoitetut marsutestit.

2. Kuten LLNA-menetelmässä, myös LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä tutkitaan ihoherkistyksen induktiovaihetta ja tuotetaan annosvasteen arviointiin sopivia kvantitatiivisia tuloksia. Koska ihoa herkistäviä aineita voidaan tunnistaa ilman radioaktiivista DNA-merkkiainetta, työssä ei altistuta radioaktiivisuudelle, eikä jätteiden hävittäminen aiheuta ongelmia. Tämä voi johtaa hiirten entistä yleisempään käyttöön ihoa herkistävien aineiden tunnistamisessa, millä puolestaan vähennetään entisestään marsujen käyttämistä ihoherkistyspotentiaalin testauksessa (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13).

MÄÄRITELMÄT

3. Sovellettavat määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä on mukautettu LLNA-menetelmä mahdollisten ihoa herkistävien kemikaalien tunnistamiseksi tietyin rajoituksin. Tämä ei välttämättä merkitse sitä, että LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää pitäisi käyttää kaikissa tapauksissa LLNA-menetelmän tai marsutestin asemesta (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13), vaan pikemminkin sitä, että määritysmenetelmä on yhtä hyvä ja sitä voidaan käyttää vaihtoehtona, jossa positiivisia ja negatiivisia tuloksia ei yleensä enää tarvitse varmistaa uudelleen (10) (11). Testilaboratorion on otettava huomioon kaikki testiaineesta saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen tekemistä. Tällaisia

▼M3

tietoja ovat muun muassa testiaineen tunnistetiedot ja kemiallinen rakenne, sen fysikaaliskemialliset ominaisuudet, muiden aineella tehtyjen *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset sekä rakenteellisesti samankaltaisten kemikaalien toksikologiset tiedot. Tietojen perusteella on määritettävä, voidaanko LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää käyttää kyseisen aineen testaamiseen (ottaen huomioon, että LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä ei sovellu tiettyjen kemikaalityyppien testaamiseen (katso 5 kohta)) ja mitä annosta on käytettävä.

5. LLNA: BrdU-ELISA on *in vivo* -menetelmä, joten sen käyttö ei merkitse koe-eläinten käytön loppumista kosketusherkistyksen arvioinnissa. Sillä voidaan kuitenkin vähentää tähän tarkoitukseen käytettävien eläinten määrää marsutesteihin verrattuna (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406) (13). LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä käytetty tapa testata kosketusherkistystä eläimillä on myös huomattavasti edistyneempi, koska toisin kuin B.6 menetelmässä ja OECD:n testiohjeessa 406, LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä ei edellytetä tarkoituksellista ihon yliherkkyysreaktioiden tuottamista. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä ei myöskään edellytä adjuvantin käyttöä, toisin kuin marsuilla tehtävä maksimointitesti (tämän liitteen B.6 luku, 13). Näin ollen LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä vähennetään eläinten kärsimystä. Vaikka LLNA: BrdU-ELISA -menetelmä onkin tietyllä tasolla edistyneempi kuin B.6 menetelmä tai OECD:n testiohje 406 (13), siihen liittyy tiettyjä rajoituksia, joiden vuoksi voi olla tarpeen käyttää B.6 menetelmää tai OECD:n testiohjetta 406 (esimerkiksi tiettyjen metallien testaus, väärät positiiviset löydökset joidenkin ihoa ärsyttävien aineiden, esimerkiksi pinta-aktiivisten aineiden osalta (6) (1 ja tämän liitteen B.42 luku) tai testiaineen liukoisuus). Häiritseviä (15) funktionaalisia ryhmiä sisältävien kemikaaliluokkien tai aineiden yhteydessä voi olla tarpeen käyttää marsutestejä (B.6 menetelmä; OECD:n testiohje 406 (13)). LLNA-menetelmälle asetettuja rajoituksia (1 ja tämän liitteen B.42 luku) on sovellettava myös LLNA: BrdU-ELISA -menetelmään (10). Tällaisia tunnistettuja rajoituksia lukuun ottamatta mitä tahansa kemikaaleja pitäisi voida testata LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä, elleivät kyseisten kemikaalien ominaisuudet vaikuta LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän tarkkuuteen. Myös positiivisten rajatulosten mahdollisuus on otettava huomioon, kun saadaan stimulaatioindeksiksi (SI) 1,6–1,9 (katso 31–32 kohta). Tämä perustuu 43 aineen validointitietokantaan, jossa aineiden SI ≥ 1,6 (katso 6 kohta) ja jossa LLNA: BrdU-ELISA -menetelmällä on tunnistettu oikein kaikki 32 herkistystä aiheuttavaa LLNA-ainetta mutta tunnistettu väärin kaksi niistä 11 muusta kuin herkistystä aiheuttavasta LLNA-aineesta, joiden SI-arvo on 1,6–1,9 (positiivinen rajatulos) (10). Koska samaa tulosjoukkoa on käytetty SI-arvojen määrittämiseen ja testin ennakoivien ominaisuuksien laskemiseen, esitetyissä tuloksissa voidaan yliarvioida todellisia ennakoivia ominaisuuksia.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

6. LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän perusperiaate on, että ihoa herkistävät aineet aiheuttavat lymfosyyttien proliferaatiota imusolmukkeissa, jotka dreneeraavat testiaineen annostelualueen. Tämä proliferaatio on suhteessa käytettyyn annokseen ja allergeenin voimakkuuteen ja tarjoaa yksinkertaisen keinon ihoherkistyksen mittaamiseksi kvantitatiivisella tavalla. Proliferaatio mitataan vertaamalla kussakin testiryhmässä tapahtuvaa keskimääräistä soluproliferaatiota kantaja-aineella käsitellyssä kontrolliryhmässä tapahtuvaan keskimääräiseen soluproliferaatioon. Kunkin testiryhmän keskimääräisen soluproliferaation ja sitä vastaavan kontrolliryhmän keskimääräisen soluproliferaation suhde (SI) määritetään, ja sen on oltava yhtä suuri tai suurempi kuin 1,6, jotta testiaineen mahdollista ihoherkistyspotentiaalia olisi syytä

▼M3

arvioida tarkemmin. Tässä kuvatut menetelmät perustuvat korvalehden dreneeraavien imusolmukkeiden solujen lisääntymisen määrittämiseen BrdU-pitoisuuden mittaamisen avulla. BrdU on tymidiinin analogi ja inkorporoituu lisääntyvien solujen DNA:han samalla tavalla. BrdU:n inkorporoitumista mitataan ELISA-menetelmällä, jossa käytetään BrdU-spesifistä vasta-ainetta, joka leimataan myös peroksidaasilla. Kun lisätään peroksidaasi-entsyymin substraatti, peroksidaasi reagoi substraatin kanssa ja muodostaa värillisen tuotteen, jonka määrä määritetään mittaamalla absorbanssi tietyllä aallonpituudella käyttämällä kuoppalevyjen lukulaitetta.

MÄÄRITYSMENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

7. Tähän testiin paras eläinlaji on hiiri. LLNA: BrdU-ELISA -määritysmenetelmän validointitutkimukset on tehty yksinomaan CBA/JN-kannalla, joten sen käyttöä suositellaan (10) (12). Määritysmenetelmässä käytetään nuoria täysikasvuisia naarashiiriä, jotka eivät ole poikineet eivätkä ole tiineenä. Testin alussa eläinten on oltava 8–12 viikon ikäisiä, ja eläinten painoerojen on oltava vähäisiä eli enintään 20 prosenttia keskipainosta. Muita kantoja tai uroseläimiä voidaan käyttää, jos tietoja tuotetaan riittävästi sen osoittamiseksi, että LLNA: BrdU-ELISA -vasteessa ei esiinny merkitseviä koe-eläinkantaan tai sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

8. Hiiret on pidettävä yhteishäkeissä (16), ellei hiirien pitämiselle erillisissä häkeissä esitetä riittäviä tieteellisiä perusteluja. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 celsiusastetta. Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70 prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, on kuitenkin pyrittävä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa on käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Eläinten valmistelu

9. Eläimet valitaan satunnaistetusti, merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan (ei kuitenkaan korvamerkeillä), ja pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testiaineen annostelun aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Ennen käsittelyn alkua kaikki eläimet on tutkittava sen varmistamiseksi, ettei niillä ole havaittavia ihovaurioita.

Annosteluliuosten valmistelu

10. Kiinteät kemikaalit on liuotettava tai sekoitettava liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja tarvittaessa laimennettava ennen niiden annostelua hiiren korvaan. Nestemäiset kemikaalit voidaan annostella laimentamattomana tai ennen annostelua laimennettuina. Liukenemattomia kemikaaleja, kuten lääkinnällisissä laitteissa yleisesti käytettyjä kemikaaleja, on pyrittävä uuttamaan erittäin voimakkaasti asianmukaiseen liuottimeen, jotta kaikki uuttuvat ainesosat tulisivat esiin ennen annostelua hiirten korviin. Testiaineet on valmistettava päivittäin, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Luotettavuuden tarkistus

11. Positiivisia kontrollikemikaaleja käytetään, jotta voidaan osoittaa määritysmenetelmän toimivuus. Herkistystesteissä käytettävän aineen vasteena on menetelmässä saatava aikaan riittävä ja toistettavissa oleva herkistyminen, jonka vastetaso on aineelle tyypillinen. Positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä testissä samanaikaisesti testikemikaalin kanssa suositellaan, koska sillä osoitetaan, että laboratoriolla on riittävä pätevyys kuhunkin määritysmenetelmään, ja sen avulla voidaan arvioida laboratorionsisäistä ja laboratorioidenvälistä uusittavuutta ja vertailtavuutta. Myös tietyt sääntelyviranomaiset vaativat positiivisten kontrollikemikaalien käyttämistä kaikissa tutkimuksissa. Käyttäjien olisikin otettava yhteyttä asiasta vastaaviin viranomaisiin ennen LLNA: BrdU-ELISA -määritysmenetelmän käyttöönottoa.

▼M3

Tämän takia suositellaan positiivisen kontrollikemikaalin käyttöä samanaikaisesti rutiininomaisesti, jotta ei tarvitsisi uusia eläinkokeita sellaisten vaatimusten täyttämiseksi, jotka johtuvat siitä, että positiivista kontrollikemikaalia käytetään vain ajoittain (katso 12 kohta). Positiivisen kontrollikemikaalin on tuotettava positiivinen LLNA: BrdU-ELISA -vaste altistustasolla, jonka odotetaan antavan stimulaatioindeksin, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin 1,6 verrattuna negatiiviseen kontrolliryhmään. Positiivisen kontrollikemikaalin annostaso on valittava siten, että se ei aiheuta liian voimakasta ihoärsytystä tai koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja että induktio on toistettavissa mutta ei liian suuri (esimerkiksi SI > 14 on liian suuri). Suositeltavia positiivisia kontrollikemikaaleja ovat 25-prosenttinen heksyylikanelialdehydi (CAS-numero 101-86-0) ja 25-prosenttinen eugenoli (CAS-numero 97-53-0) asetonin ja oliiviöljyn seoksessa (4:1 v/v). Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita positiivisia kontrollikemikaaleja, jotka täyttävät edellä mainitut kriteerit.

12. Vaikka samanaikaisen positiivisen kontrolliryhmän käyttöä suositellaan, joissakin tapauksissa positiivisen kontrollikemikaalin ajoittainen testaus (enintään kuuden kuukauden välein) voi riittää LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää säännöllisesti käyttävissä laboratorioissa (eli sellaisissa, jotka käyttävät LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää vähintään kerran kuukaudessa) ja joilla on aiempia positiivisen kontrollikemikaalin määritystietoja, jotka osoittavat laboratorion valmiuden saada aikaan uusittavissa olevia ja täsmällisiä tuloksia positiivisilla kontrollikemikaaleilla. Riittävä LLNA: BrdU-ELISA -menetelmää koskeva pätevyys voidaan osoittaa tuottamalla positiivisella kontrollikemikaalilla toistuvasti samantasoisia positiivisia tuloksia vähintään kymmenessä riippumattomassa testissä, jotka suoritetaan kohtuullisen ajanjakson kuluessa (alle yhden vuoden aikana).

13. Samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia on käytettävä aina, kun LLNA: BrdU-ELISA -menettelyä muutetaan (esimerkiksi kun koulutettu henkilökunta vaihtuu, testimenetelmän materiaalit ja/tai reagenssit vaihtuvat, testimenetelmässä käytettävät laitteet vaihtuvat tai koe-eläinten alkuperä vaihtuu), ja tällaiset muutokset on kirjattava laboratorioraportteihin. Muutosten vaikutusta aiemmin saatujen aiempien määritystietojen asianmukaisuuteen on tarkasteltava, jotta voidaan päättää, onko kerättävä uusi määritystietokanta positiivisen kontrollikemikaalin tulosten yhdenmukaisuuden osoittamiseksi.

14. Tutkijoiden on otettava huomioon, että jos positiivisen kontrollikemikaalin tutkimusta ei suoriteta samanaikaisesti vaan vain ajoittain, positiivisen kontrollikemikaalin kunkin säännöllisen tutkimuksen välillä ilman vastaavaa positiivista kontrollikemikaalia aikaan saatujen negatiivisten tutkimustulosten asianmukaisuus ja hyväksyttävyys voivat vaarantua. Jos esimerkiksi saadaan väärä negatiivinen tulos, kun positiivinen kontrolli ei ole ollut aina samanaikaisesti mukana, positiivisen kontrollikemikaalin viimeisen hyväksytyn yksittäisen tutkimuksen ja positiivisen kontrollikemikaalin hylätyn yksittäisen tutkimuksen tuloksen välisenä aikana saadut testiaineen negatiiviset tulokset voivat olla kyseenalaisia. Näiden tulosten seurauksia on tarkasteltava huolellisesti päätettäessä positiivisten kontrollikemikaalien käyttämisestä aina testiaineen rinnalla tai vain ajoittain Lisäksi on huomioitava, että testiaineen rinnalla käytettävää positiivista kontrolliryhmää varten olisi käytettävä vähemmän eläimiä, jos se on tieteellisesti perusteltua ja jos laboratorio osoittaa laboratoriokohtaisten aiempien tietojen perusteella, että hiiriä voidaan käyttää vähemmän (17).

15. Vaikka positiiviset kontrollikemikaalit on testattava kantaja-aineessa, jonka tiedetään antavan aina samanlaisen vasteen (esimerkiksi asetoni:oliiviöljy, 4:1 v/v), joidenkin säännösten mukaan testaus muussa kuin standardikantaja-aineessa (kliinisesti/kemiallisesti relevantissa aineessa) saattaa myös olla tarpeen (18). Jos samanaikaista positiivista kontrollikemikaalia testataan eri kantaja-aineessa kuin testiainetta, sitä varten on käytettävä erillistä kantaja-aineella käsiteltyä kontrollia.

▼M3

16. Arvioitaessa tiettyyn kemikaaliluokkaan kuuluvia tai tietyn vastetason aikaansaavia testiaineita vertailuaineilla voidaan myös osoittaa, että testimenetelmä toimii asianmukaisesti, kun halutaan osoittaa tämäntyyppisten testiaineiden ihoherkistyspotentiaali. Vertailuaineilla olisi silloin oltava seuraavat ominaisuudet:

— samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavalla aineryhmällä

— tunnetut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— sopivuutta tukevia tietoja LLNA: DA -menetelmästä

— sopivuutta tukevia tietoja muista eläinmalleista ja/tai ihmisistä.

TESTIMENETTELY

Koe-eläinten määrä ja annostasot

17. Kussakin annostasoryhmässä on oltava vähintään neljä eläintä, ja testiaineesta on käytettävä vähintään kolmea konsentraatiota. Lisäksi käytetään negatiivista kontrolliryhmää, joka käsitellään vain testiaineen kantaja-aineella, sekä positiivista kontrolliryhmää (joka määritetään samanaikaisesti tai joka on määritetty hiljattain, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat). Positiivisesta kontrolliryhmästä on tarvittaessa testattava useita annoksia, etenkin jos positiivista kontrollikemikaalia testataan epäsäännöllisesti. Kontrolliryhmän eläimiä on kohdeltava samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niitä ei käsitellä testiaineella.

18. Annostason ja kantaja-aineen valinnan on perustuttava lähteissä 2 ja 19 esitettyihin suosituksiin. Peräkkäiset annostasot valitaan yleensä sopivasta konsentraatiosarjasta, esimerkiksi sarjasta 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ja niin edelleen. Käytettävälle konsentraatiosarjalle on esitettävä asianmukaiset tieteelliset perustelut. Kaikki käytettävissä olevat toksikologiset tiedot (esimerkiksi akuutti toksisuus ja ihoärsytys) ja rakenteelliset ja fysikaaliskemialliset tiedot kyseisestä testiaineesta (ja/tai rakenteellisesti vastaavista aineista) on tarvittaessa otettava huomioon kolmen peräkkäisen konsentraation valinnassa niin, että suurin konsentraatio edustaa maksimialtistusta, mutta koko elimistöön kohdistuva toksisuus ja/tai liian voimakas paikallinen ihoärsytys kuitenkin vältetään (19) (20 ja tämän liitteen B.4 luku). Jos tällaisia tietoja ei ole käytettävissä, testiä edeltävä kartoitus voi olla tarpeen (katso 21–24 kohta).

19. Kantaja-aine ei saa vaikuttaa testituloksiin tai vääristää niitä. Se on valittava siten, että testiaine liukenee siihen mahdollisimman helposti ja aineen konsentraatio annosteluun sopivassa liuoksessa tai suspensiossa on mahdollisimman suuri. Suositeltavat kantaja-aineet ovat asetoni:oliiviöljy (4:1 v/v), *N,N*-dimetyyliformamidi, metyylietyyliketoni, propyleeniglykoli ja dimetyylisulfoksidi (6), mutta muitakin kantaja-aineita voidaan käyttää riittävin tieteellisin perustein. Joissakin tilanteissa voi olla tarpeen käyttää lisäkontrolliaineena kliinisesti perusteltua liuotinta taikka kaupallista valmistetta, jona testiainetta markkinoidaan. Erityisesti on varmistettava, että hydrofiiliset testiaineet sisällytetään sellaiseen kantaja-ainejärjestelmään, joka vettää ihon eikä valu heti pois, lisäämällä asianmukaisia liukenemista edistäviä aineita (esimerkiksi 1-prosenttinen Pluronic® L92). Pelkkiä vesiliuoksia on siis syytä välttää.

▼M3

20. Prosessoimalla yksittäisten hiirten imusolmukkeita voidaan arvioida eläintenvälistä vaihtelua ja vertailla tilastollisesti testiaineen ja kantaja-aineella käsitellyn ryhmän tuloksia (katso 33 kohta). Positiivisen kontrolliryhmän hiirten määrän vähentäminen voi olla mahdollista, mutta vain siinä tapauksessa, että tietoja kerätään yksittäisistä eläimistä (17). Tietyt sääntelyviranomaiset vaativat, että tietoja on kerättävä yksittäisistä eläimistä. Yksittäisiä eläimiä koskevien tietojen keräämisellä edistetään eläinten hyvinvointia, koska siten vältetään päällekkäiset testaukset, jotka ovat tarpeen, jos sääntelyviranomaisten on tarkasteltava tietyllä tavalla (esimerkiksi eläimistä saatuja mittaustietoja yhdistämällä) saatuja testiainetuloksia myöhemmin muiden vaatimusten (esimerkiksi yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot) perusteella.

Testiä edeltävä kartoitus

21. Jos suurimman testattavan annoksen määrittämiseksi ei ole saatavilla tietoja (katso 18 kohta), on testiä ennen kartoitettava LLNA: BrdU-ELISA -menetelmän testeissä käytettävä asianmukainen annostaso. Siten autetaan enimmäisannoksen valinnassa varsinaista LLNA: BrdU-ELISA -tutkimusta varten, kun tietoja koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden (katso 24 kohta) ja/tai liian voimakkaan paikallisen ihoärsytyksen (katso 23 kohta) aiheuttavasta konsentraatiosta ei ole saatavilla. Testattavan enimmäisannoksen tason on vastattava sadan prosentin pitoisuutta nestemäisen testiaineen osalta tai suurinta mahdollista konsentraatiota kiinteiden tai suspendoitujen aineiden osalta.

22. Testiä edeltävä kartoitus suoritetaan varsinaista LLNA: BrdU-ELISA -tutkimusta vastaavissa olosuhteissa, kuitenkin niin, että imusolmukkeiden soluproliferaatiota ei arvioida, ja kussakin annosryhmässä voidaan käyttää vähemmän eläimiä. Kussakin annosryhmässä olisi hyvä käyttää yhtä tai kahta eläintä. Kaikkia hiiriä tarkkaillaan päivittäin koko elimistöön kohdistuvan toksisuuden tai annostelukohdassa esiintyvän paikallisen ärsytyksen kliinisten merkkien havaitsemiseksi. Eläinten paino kirjataan ennen testaamista ja ennen eläinten lopettamista (päivä 6). Kunkin hiiren molemmista korvista tutkitaan eryteeman merkit, ja ne pisteytetään taulukon 1 mukaisesti (20 ja tämän liitteen B.4 luku). Korvan paksuus mitataan paksuusmittarilla (esimerkiksi digitaalisella mikrometrillä tai Peacock Dial -paksuusmittarilla) päivänä 1 (ennen annosta), päivänä 3 (noin 48 tunnin kuluttua ensimmäisestä annoksesta) ja päivänä 6. Päivänä 6 korvan paksuus voidaan myös määrittää mittaamalla korvan lävistämiseen tarvittava massa sen jälkeen, kun eläimet on lopetettu humaanisti. Paikallinen ärsytys on erittäin voimakas, jos eryteemapisteytyksen arvo $\geq$ 3 ja/tai korvan paksuuntuminen $\geq$ 25 prosenttia minä tahansa mittauspäivänä (21) (22). Suurin varsinaiseen LLNA: BrdU-ELISA -tutkimukseen valittava annos on kartoitusta varten määritetyn konsentraatiosarjan (katso 18 kohta) suurin annos, joka ei enää aiheuta koko elimistöön kohdistuvaa toksisuutta ja/tai liian voimakasta paikallista ihoärsytystä.

Taulukko 1

Eryteemapisteytys

Havainto	Pisteet
Ei eryteemaa	0
Hyvin lievä eryteema (tuskin havaittava)	1
Selkeästi erottuva eryteema	2

▼M3

Havainto	Pisteet
Keskivakava–vakava eryteema	3
Vakava eryteema (voimakas punoitus)–karsta, joka estää eryteeman pisteytyksen	4

23. Sen lisäksi, että käytetään korvien paksuuden lisääntymistä yli 25 prosenttia (21) (22), myös tilastollisesti merkittävää käsiteltyjen hiirten korvan paksuuden kasvua kontrollihiiriin verrattuna on käytetty ärsyttävien aineiden määrittämiseksi LLNA-menetelmässä (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Vaikka tilastollisesti merkittävää kasvua voi esiintyä silloinkin, kun korva paksuuntuu alle 25 prosenttia, sen ei katsota liittyvän erityisesti hyvin voimakkaaseen ärsytykseen (25) (26) (27) (28) (29).

24. Seuraavat kliiniset havainnot voivat yhdennetyn arvioinnin osana olla osoituksena koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta (30) ja voivat näin ollen olla osoituksena suurimmasta annostasosta, jota varsinaisessa LLNA: BrdU-ELISA -menetelmässä voidaan käyttää: muutokset hermoston toiminnassa (esimerkiksi karvojen jäykistyminen, ataksia, vapina ja kouristukset); muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi aggressiivisuus, muutokset turkin hoidossa, aktiivisuustason huomattava muuttuminen); muutokset hengityksessä (hengityksen säännöllisyyden ja syvyyden muutokset, kuten hengenahdistus, hengen haukkominen ja rahina) sekä muutokset ravinnon ja veden kulutuksessa. Arvioinnissa on huomioitava myös letargian ja/tai passiivisuuden merkit, vähäistä tai hetkittäistä kipua suuremman kivun ja kärsimyksen mahdolliset kliiniset merkit tai eläimen painon yli viiden prosentin laskeminen päivästä 1 päivään 6 sekä kuolleisuus. Kuolevat eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta kivusta ja kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti (31).

Varsinaisen tutkimuksen testiaikataulu

25. Määritysmenetelmän aikataulu on seuraava:

— *Päivä 1:* Määritetään ja kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Kunkin korvan takaosaan annostellaan 25 µl testiaineen, kantaja-aineen tai positiivisen kontrollikemikaalin (rinnakkaisen tai hiljattain tehdyn, laboratorion toimintatavan mukaisesti, ottaen huomioon 11–15 kohdat) sopivaa laimennosta.

— *Päivät 2 ja 3:* Toistetaan päivänä 1 toteutettu annostelu.

— *Päivä 4:* Ei käsittelyä.

— *Päivä 5:* Ruiskutetaan 0,5 ml (5 mg/hiiri) BrdU-liuosta (10 mg/ml) intraperitoneaalisesti.

— *Päivä 6:* Kirjataan kunkin koe-eläimen paino ja tehdään mahdollisia kliinisiä havaintoja. Noin 24 tunnin (24 h) kuluttua BrdU-injektiosta eläimet lopetetaan humaanisti. Hiiren kummastakin korvasta leikataan irti dreneeraavat korvalehden imusolmukkeet, ja kunkin eläimen imusolmukkeet prosessoidaan erikseen fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS). Imusolmukkeiden tunnistukseen ja irrotukseen liittyvät tiedot ja kaaviot esitetään lähteessä (17). Paikallista ihovastetta voidaan seurata varsinaisessa tutkimuksessa tarkemmin niin, että tutkimussuunnitelmaan sisällytetään täydentäviä parametreja, kuten korvan eryteeman pisteytys tai korvan paksuutta koskevat mittaustulokset (saadaan joko paksuusmittarilla tai ruumiinavauksen yhteydessä tehtävillä korvan lävistämiseen tarvittavan massan mittauksilla).

▼M3

Solususpensioiden valmistus

26. Kunkin hiiren imusolmukeparien soluista valmistetaan suspensio, jossa kaikki solut ovat irrallaan muista (yksisolususpensio), hajottamalla kudos mekaanisesti painamalla se varovaisesti ruostumattoman terässeulan läpi (silmäkoko 200 μm) tai käyttämällä muuta yksisolususpension valmistamiseksi hyväksyttyä tekniikkaa (esimerkiksi käyttämällä kertakäyttöistä muovista survinta imusolmukkeiden murskaamiseen ja painamalla ne sitten nylonseulan läpi (silmäkoko 70)). Yksisolususpension valmistustapa on tässä määritysmenetelmässä erittäin tärkeä, ja menettely on opeteltava etukäteen. Negatiivisen kontrolliryhmän eläinten imusolmukkeet ovat pieniä, joten vaihe on suoritettava huolellisesti SI-arvoihin mahdollisesti vaikuttavien artefaktojen välttämiseksi. Kussakin menettelyssä yksisolususpension tilavuus on saatettava määritetyn optimoidun tilavuuden mukaiseksi (noin 15 ml). Optimoitu tilavuus perustuu negatiivisen kontrolliryhmän keskimääräiseen absorbanssiin välillä 0,1–0,2.

Solujen proliferaation määritys (lymfosyyttien DNA:n BrdU-pitoisuuden mittaaminen)

27. BrdU mitataan ELISA-menetelmällä käyttämällä kaupallisesti saatavilla olevaa välineistöä (esimerkiksi Roche Applied Science, Mannheim, Saksa, kataloginumero 11 647 229 001). Tasapohjaisen kuoppalevyn kuoppiin lisätään 100 μl imusolmukesolususpensiota kolmoismäärityksinä. Solususpension fiksaation ja denaturaation jälkeen jokaiseen kuoppaan lisätään anti-BrdU-vasta-aine ja sen annetaan reagoida. Tämän jälkeen anti-BrdU-vasta-aine poistetaan huuhtelemalla ja lisätään reaktion substraatti. Vapautuvan kromogeenin absorbanssi mitataan 370 nm:ssä ja 492 nm:n vertailuaallonpituudella. Määritysmenetelmän testiolosuhteet on kaikissa yhteyksissä optimoitava (katso 26 kohta).

HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

28. Kustakin hiirestä on päivittäin havainnoitava huolellisesti mahdolliset kliiniset merkit joko annostelualueen paikallisesta ärsytyksestä tai koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti erikseen kustakin hiirestä. Seurantasuunnitelmissa on esitettävä myös perusteet, joiden avulla voidaan nopeasti tunnistaa hiiret, joissa havaitaan merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta, liian voimakkaasta paikallisesta ihoärsytyksestä tai ihosyövyttävyydestä ja jotka on lopetettava (31).

Ruumiinpainot

29. Kuten 25 kohdassa todetaan, kukin eläin on punnittava erikseen testin alussa ja aikataulun mukaisesti humaanin lopettamisen yhteydessä.

TULOSTEN LASKEMINEN

30. Kunkin käsittelyryhmän tulokset ilmoitetaan keskimääräisenä SI:nä. Sl-arvo saadaan jakamalla testiaineryhmän ja positiivisen kontrolliryhmän hiirikohtaisista BrdU-merkki-indekseistä laskettu keskiarvo liuottimen/kantaja-aineen kontrolliryhmän vastaavalla tuloksella. Kantaja-ainekontrollien SI:n keskiarvo on 1.

BrdU-merkki-indeksi määritellään seuraavasti:

$$\text{BrdU-merkki-indeksi} = (ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{ref})$$

jossa: em = emissioaallonpituus; ja ref = referenssiaallonpituus.

▼M3

31. Tulos katsotaan positiiviseksi, kun SI ≥ 1,6 (10). Rajatuloksen (SI-arvo 1,6–1,9) positiivisuuden määrittämiseksi voidaan kuitenkin tarkastella myös annosvasteen voimakkuutta, tilastollista merkitsevyyttä sekä liuottimen/kantaja-aineen ja positiivisen kontrollikemikaalin vasteiden yhdenmukaisuutta (3) (6) (32).

32. Jos positiivisen rajavasteen SI on 1,6–1,9, käyttäjät voivat tulosten positiivisuuden vahvistamiseksi tarkastella SI-arvojen lisäksi myös muita tietoja, kuten annosvasteen voimakkuutta, merkkejä koko elimistöön kohdistuvasta toksisuudesta tai erittäin voimakkaasta ärsytyksestä ja tarvittaessa tilastollista merkittävyyttä (10). Lisäksi on syytä ottaa huomioon testiaineen erilaiset ominaisuudet, mukaan luettuina mahdolliset rakenteelliset yhtäläisyydet tunnettuihin ihoherkistystä aiheuttaviin aineisiin, sen hiirelle mahdollisesti aiheuttama erittäin voimakas ihoärsytys ja havaitun annosvasteen luonne. Näitä ja muita näkökohtia käsitellään yksityiskohtaisesti lähteessä (4).

33. Kun tiedot kerätään erikseen kustakin hiirestä, voidaan niiden perusteella analysoida tilastollisesti mahdollista annosvasteen voimakkuutta ja sen tasoa. Tilastoarvioinnissa voidaan myös arvioida annosvasteen voimakkuutta ja tehdä asianmukaisesti mukautettuja vertailuja testiryhmillä (esimerkiksi pareittain annoksen saaneen ryhmän vertailu samanaikaisesti tehtyyn liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään). Tilastollisina analyyseina voidaan käyttää esimerkiksi lineaarista regressiota tai Williamin testiä, joilla arvioidaan annos-vastekehitystä, sekä Dunnettin testiä, jolla pareja vertaillaan toisiinsa. Tutkijan on otettava asianmukaisen tilastoanalyysimenetelmän valinnassa huomioon varianssien mahdolliset erot ja muut vastaavat ongelmat, jotka saattavat edellyttää määritystulosten muuntamista tai non-parametrista tilastoanalyysia. Tutkijan on kuitenkin mahdollisesti tehtävä SI-laskelmia ja tilastoanalyyseja sekä käyttäen tiettyjä määrityspisteitä koskevia tietoja (niin sanotut käyrän ulkopuolella olevat vasteet) että ilman niitä.

MITTAUSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Mittaustulokset

34. Tulokset on esitettävä taulukkona, josta käyvät ilmi eläinkohtaiset BrdU-merkki-indeksin arvot, ryhmän eläinkohtaisten BrdU-merkki-indeksien keskiarvo, siihen liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe) sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen SI samanaikaiseen liuotin-/kantaja-ainekontrolliryhmään verrattuna.

Loppuraportti

35. Loppuraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— tunnistetiedot (esimerkiksi CAS- ja EC-numerot, jos tiedossa; alkuperä, puhtaus, tunnetut epäpuhtaudet, eränumero),

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esimerkiksi haihtuvuus, stabiilisuus, liukoisuus),

— jos kyseessä on seos, sen koostumus ja ainesosien suhteelliset osuudet.

Liuotin/kantaja-aine

— tunnistetiedot (puhtaus, tarvittaessa konsentraatio, käytetty tilavuus),

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

▼M3

Koe-eläimet

— CBA-hiirten alkuperä,

— eläinten mikrobiologinen tila, jos se on tiedossa,

— eläinten määrä ja ikä,

— eläinten alkuperä, koe-eläintilat, ruokavalio ja niin edelleen.

Testiolosuhteet

— ELISA-välineistön alkuperä, erän numero ja valmistajan laadunvarmistus-/laadunvalvontatiedot (vasta-aineen herkkyys ja spesifisyys sekä osoitusraja),

— tiedot testiaineen valmistelusta ja annostelusta,

— perustelut annostasojen valinnalle (mukaan luettuina ennen testiä mahdollisesti suoritetun kartoituksen tulokset),

— käytetyt kantaja- ja testiaineiden konsentraatiot ja annostellun testiaineen kokonaismäärä,

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan luettuina ruokavalion tyyppi/alkuperä, veden alkuperä),

— tiedot käsittely- ja näytteenottoaikatauluista,

— toksisuuden mittausmenetelmät,

— tutkimusten positiivisuuden tai negatiivisuuden arviointiperusteet,

— tiedot menettelystä poikkeamisesta ja selvitys siitä, miten poikkeaminen vaikuttaa tutkimussuunnitelmaan ja tuloksiin.

Luotettavuuden tarkistus

— yhteenveto viimeisimmän luotettavuustarkistuksen tuloksista, mukaan luettuina tiedot käytetystä testiaineesta, konsentraatiosta ja kantaja-aineesta,

— testauslaboratorion samaan aikaan ja/tai aiemmin tehtyjen positiivisten ja samanaikaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) kontrollien tulokset,

— jos testissä ei ollut samanaikaista positiivista kontrollia, viimeisimmän positiivisen kontrollin päivämäärä ja laboratorioraportti sekä yksityiskohtainen selvitys laboratorion aiemmista positiivista kontrollia koskevista tiedoista, joiden perusteella samanaikaista positiivista kontrollia ei tarvitsisi käyttää.

Tulokset

— kunkin hiiren paino annostelun alussa ja aikataulun mukaisen humaanin lopettamisen yhteydessä sekä kunkin annosryhmän keskimääräinen virhetermi ja asiaan liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta tai keskiarvon keskivirhe),

— toksisuuden ilmeneminen ajan funktiona ja toksisuuden merkit, mukaan luettuna mahdollinen annostelualueen ihoärsytys, erikseen kullekin eläinyksilölle,

— taulukko yksittäisten hiirten BrdU-merkki-indekseistä ja kunkin käsittelyryhmän SI-arvoista,

— kunkin käsittelyryhmän hiirikohtaisten BrdU-merkki-indeksien keskimääräinen virhetermi ja siihen liittyviin muuttujiin liittyvä virhetermi (esimerkiksi keskihajonta ja keskiarvon keskivirhe) sekä käyrän ulkopuolella olevien vasteiden analyysin tulokset kullekin käsittelyryhmälle,

▼M3

— laskettu SI ja asianmukaisesti määritetty vaihteluväli, jossa otetaan huomioon eläintenvälinen vaihtelu, testiaineella ja kontrolliaineella käsitellyissä ryhmissä,

— annosvasteen voimakkuus,

— tarvittaessa tilastoanalyysit.

Tulosten pohdinta

— tulosten lyhyt kommentointi, annos-vasteanalyysi ja tarvittaessa tilastoanalyysi sekä johtopäätös siitä, onko testiainetta pidettävä ihoherkistystä aiheuttavana.

LÄHDELUETTELO

(1) OECD (2010). Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Chamberlain, M. ja Basketter, D. A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 999–1002.

(3) Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. ja Loveless, S. E. (1996). The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 34, s. 985–997.

(4) Basketter, D. A., Gerberick, G. F. ja Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.* 36, s. 327–33.

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

(6) ICCVAM (1999). The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH-julkaisunumero 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf

(7) Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 258–273.

(8) Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 274–286.

(9) Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N., Stokes, W. S. (2001). ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 34(3), s. 249–257.

(10) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH-julkaisunumero 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm

▼M3

(11) ICCVAM (2009). Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. ja Hoshuyama, S. (2005). Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.* 25, s. 129–134.

(13) OECD (1992). Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. ja Wendel, A. (2008). Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.* 46, s. 1896–1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. ja Mehling, A. (2009). Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 55, s. 90–96.

(16) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7. painos. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009). Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH-julkaisunumero 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa

http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf

(18) McGarry, H. F. (2007). The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.* 238, s. 71–89.

(19) Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes E. W. ja Basketter, D. A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.* 93, s. 13–31.

(20) OECD (2002). Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

(21) Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. ja DeGeorge, G. L. (2007). Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist* 96, s. 235.

(22) ICCVAM (2009). Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

(23) Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. ja Meade, B. J. (1998). Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.* 21, s. 195–206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. ja Vohr, V. W. (1998). An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, s. 83–94.

(25) Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1998). A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.* 8, s. 245–256.

▼**M3**

(26) Hayes, B. B. ja Meade, B. J. (1999). Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.* 22, s. 491–506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. ja Vohr, H. W. (2005). A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.* 212, s. 60–68.

(28) Vohr, H. W. ja Ahr, H. J. (2005). The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.* 79, s. 721–728.

(29) Patterson, R. M., Noga, E. ja Germolec D. (2007). Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect. 115, s. 1023–1028.

(30) ICCVAM (2009). Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Saatavilla osoitteessa http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm.

(31) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

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

(33) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14. OECD, Pariisi. Saatavilla osoitteessa http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M3**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-tekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (33).

Vertailuaine: Herkistävä tai muu kuin herkistävä aine, jota käytetään testiaineen vertailustandardina. Vertailuaineella on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testiaineryhmällä, iii) tunnetut fysikaaliskemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vasteen vaihteluvälillä.

Väärä negatiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein negatiiviseksi tai inaktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on positiivinen tai aktiivinen (33).

Väärä positiivinen: Testiaine on testimenetelmässä määritetty väärin perustein positiiviseksi tai aktiiviseksi, vaikka se itse asiassa on negatiivinen tai inaktiivinen (33).

Vaarallisuus: Mahdollisuus kielteiseen terveys- tai ympäristövaikutukseen. Kielteinen vaikutus edellyttää altistumista vähintään tietyllä tasolla.

Laboratorioidenvälinen uusittavuus: Se, missä määrin eri (pätevät) laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samaa testiainetta. Laboratorioidenvälinen uusittavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (33).

Laboratorionsisäinen uusittavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina (33).

Käyrän ulkopuolella oleva vaste: Käyrän ulkopuolella olevalla vasteella tarkoitetaan havaintoa, joka poikkeaa merkittävästi muista populaation sattumanvaraisten näytteiden arvoista.

Laadunvarmistus: Hallintomenettely, jossa testausta suorittavista henkilöistä riippumattomat henkilöt arvioivat laboratorion testausstandardien, vaatimusten ja kirjanpitomenettelyjen noudattamista ja tiedonsiirron tarkkuutta.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Se arvioidaan laskemalla uusittavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (33).

Ihoherkistys: Immunologinen prosessi, joka aiheutuu herkän yksilön paikallisesta altistamisesta tietylle kemialliselle allergeenille, joka aiheuttaa iholla immuunivasteen, joka voi johtaa kosketusherkistykseen.

Stimulaatioindeksi (SI): Testiaineen ihoärsytyspotentiaalin arvioimiseksi laskettu arvo, jolla esitetään käsiteltyjen ryhmien soluproliferaation ja samanaikaisen kantaja-aineella käsitellyn kontrolliryhmän soluproliferaation välinen suhde.

Testiaine (testikemikaali): Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M4

B.52 AKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ – AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 436 (2009). Ensimmäinen akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskeva testiohje nro 403 hyväksyttiin vuonna 1981, ja sitä on sen jälkeen tarkistettu (katso tämän liitteen luku B.2 (1)). Myrkyllinen hengitettynä -altistusta koskevan akuutin toksisuusluokan (ATC) menetelmän kehittäminen (2) (3) (4) katsottiin tarpeelliseksi sen jälkeen, kun tarkistettu akuutin toksisuusluokan menetelmä oli hyväksytty myrkyllinen suun kautta -altistusta varten (tämän liitteen luku B.1 b) (5). Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevan akuutin toksisuusluokan testimenetelmän takautuva arviointi osoitti, että menetelmä sopii käytettäväksi luokitukseen ja merkintöihin liittyviin tarkoituksiin (6). Myrkyllisyyttä hengitettynä koskevan akuutin toksisuusluokan testimenetelmän avulla kiinteitä kohdepitoisuuksia voidaan käyttää vaiheittain testikemikaalin myrkyllisyyden luokittelemiseksi. Keskeinen tutkittava ominaisuus on kuolleisuus, mutta vakavasta kivusta tai tuskasta kärsivät tai kuolemaisillaan olevat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla kärsimyksen minimoimiseksi. Ohjeita eläinkokeiden humaaneista lopettamiskriteereistä on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (7).

2. Tämän testimenetelmän mukaisten tutkimusten toteuttamista ja tulosten tulkintaa koskevat ohjeet ovat OECD:n ohjeasiakirjassa GD 39, jossa käsitellään akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevaa testausta (8).

3. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat lisäyksessä 1 ja ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

4. Testimenetelmä antaa tietoa vaarallisista ominaisuuksista, ja sen avulla testikemikaali voidaan määrittää ja luokitella akuuttia myrkyllisyyttä aiheuttavien kemikaalien luokittelua koskevan asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaisesti (9). Jos tarvitaan LC_{50}-arvojen piste-estimaatteja tai pitoisuus-vasteanalyyseja, on käytettävä tämän liitteen luvun B.2 (1) mukaista testimenetelmää. Lisätietoja testimenetelmän valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 39 (8). Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu erikoismateriaalien, kuten huonosti liukenevien isometristen tai kuituisten materiaalien tai teollisesti valmistettujen nanomateriaalien testaukseen.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Ennen tämän testimenetelmän mukaista testausta testauslaboratorion on hankittava kaikki saatavilla olevat tiedot testattavasta kemikaalista, mukaan luettuina olemassa olevat tutkimukset, joissa olevien tietojen ansiosta lisätestit voidaan jättää mahdollisesti tekemättä, jotta eläinten käyttö voidaan minimoida. Tietoihin, joista voi olla apua sopivimman lajin, kannan, sukupuolen, altistustavan ja asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus sekä saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista. Tällä testimenetelmällä ei tule testata pitoisuuksia, joiden odotetaan aiheuttavan vakavaa kipua ja kärsimystä syövyttävien ([1]) tai vaikeasti ärsyttävien vaikutusten vuoksi [katso ohjeasiakirja GD 39 (8)].

([1]) Syövyttävyyden arviointi voi perustua asiantuntijan lausuntoon, ja näyttönä voidaan käyttää esimerkiksi ihmisistä ja eläimistä saatuja tietoja, olemassa olevia (*in vitro* -) tietoja, kuten tämän liitteen lukua B.40 (10) ja B.40a tai OECD:n testiohjetta nro 435 (12), pH-arvoja, tietoja samanlaisista kemikaaleista tai muita asiaankuuluvia tietoja.

▼M4

TESTIN PERIAATE

6. Testin periaatteena on, että testikemikaalin akuutista myrkyllisyydestä hengitettynä kerätään riittävästi tietoa vaiheittaisen menettelyn avulla neljän tunnin pituisen altistusjakson aikana, jotta kemikaali voidaan luokitella. Myös muunpituisia altistuksia voidaan soveltaa tiettyihin sääntelytarkoituksiin. Jokaisessa määritetyn pitoisuuden vaiheessa testataan kolme eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, montako eläintä on kuollut ja/tai kuolemaisillaan, kaksi vaihetta voi riittää testikemikaalin akuutin myrkyllisyyden arvioimiseksi. Jos on näyttöä siitä, että toinen sukupuoli on toista herkempi, testiä voidaan jatkaa vain herkemmällä sukupuolella. Aiemman vaiheen tuloksen perusteella määritellään seuraava vaihe, joka on jokin seuraavista:

a) Lisätestausta ei tarvita.

b) On testattava kolme eläintä kumpaakin sukupuolta.

c) On testattava vain kuusi eläintä herkemmästä sukupuolesta, eli toksisuusluokan alarajan estimaattien on perustuttava kuuteen eläimeen testipitoisuusryhmää kohti sukupuolesta riippumatta.

7. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (7) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

8. On käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Suositeltavin laji on rotta, ja jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

9. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Altistuspäivänä on käytettävä 8–12 viikon ikäisiä nuoria aikuisia eläimiä, joiden ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia aiemmin altistettujen samanikäisten eläinten keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Eläimet on totutettava myös testilaitteistoon vähän ennen testausta, sillä se vähentää uuteen ympäristöön tutustumisesta aiheutuvaa stressiä.

Eläinten hoito

10. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin

▼M4

tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

Inhalaatiokammiot

11. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistumistapa on vain nasaalisesti (tähän termiin kuuluvat myös altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti ja koko kehon kautta tapahtuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

12. Altistuksen kestoksi suositellaan kiinteää aikaa, joka on neljä tuntia, pois luettuna tasapainotilan saavuttamiseen kuluva aika. Muunpituiset altistukset voivat olla tarpeen tiettyjen vaatimusten täyttämiseksi, mutta tämä on perusteltava tutkimusraportissa [katso ohjeasiakirja GD 39 (8)]. Eläimille, joita altistetaan aerosoleille koko kehon kammioissa, on järjestettävä oma häkki sen estämiseksi, etteivät muut häkissä olevat eläimet niele testikemikaalia, kun ne hoitavat toistensa turkkia. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

13. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti.

Hiukkaskokojakauma

14. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–4 μm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (8) (13) (14). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset, kuidut ja hygroskooppiset materiaalit (joiden koko kasvaa hengitystie-elimistön kosteassa ympäristössä) voivat olla vaatimusta suurempia.

▼M4

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

15. Jotta ilmakehään saadaan testikemikaalista sopiva pitoisuus ja hiukkaskoko, voidaan käyttää kantaja-ainetta. Pääsääntöisesti on käytettävä vettä. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti vaaditun hiukkaskokojakauman saavuttamiseksi, mutta se on tehtävä varovasti, jotta testikemikaali ei hajoa tai muutu. Jos mekaanisen prosessin oletetaan muuttaneen testikemikaalin koostumusta (esimerkiksi kitkan vuoksi liiallisen jauhamisen aiheuttamat hyvin korkeat lämpötilat), testikemikaalin koostumus on varmennettava analyyttisesti. Riittäviä varotoimia on noudatettava, jotta testikemikaali ei kontaminoidu. Murenemattomia raemateriaaleja, jotka on tarkoituksella valmistettu sellaisiksi, ettei niitä voi hengittää, ei tarvitse testata. Hankauskoe on tehtävä sen osoittamiseksi, ettei raemaisen materiaalin käsittelyssä synny hengitettäviä hiukkasia. Jos hankauskoe tuottaa hengitettäviä hiukkasia, on tehtävä sisäänhengityksen kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä koskeva testi.

Verrokkieläimet

16. Samanaikaista negatiivista (ilma-) verrokkiryhmää ei tarvita. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineverrokkiryhmää on käytettävä ainoastaan silloin, kun saatavilla ei ole aiempia tietoja sisäänhengityksen kautta aiheutuvasta myrkyllisyydestä. Jos kantaja-aineessa valmistellun testikemikaalin myrkyllisyystutkimus osoittaa, ettei kemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa, että kantaja-aine on myrkytön testattuna pitoisuutena, joten kantaja-aineverrokkia ei tarvita.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

17. Ilman virtausta kammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai stabiiliuden) seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia parametreja, joita tarvitaan ilmakehän tuottamiseen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisen altistuksen kammioissa niissä tapauksissa, kun altistusjärjestelmän läpi kulkeva ilmavirtaus ei riitä tuottamaan dynaamista testikemikaali-ilmakehän virtaa. On tiettyjä menetelmiä, joita voidaan käyttää osoittamaan, ettei valituissa toimintaolosuhteissa tapahdu uudelleenhengittämistä (8) (15). Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

18. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava vähintään kolmesti enintään neljä tuntia kestävien altistusten osalta ja tunneittain lyhyempien altistusten osalta. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

▼M4

Testikemikaali: nimellispitoisuus

19. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: varsinainen pitoisuus

20. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit. Tutkimusraportissa on ilmoitettava tavoitepitoisuus, nimellinen pitoisuus ja todellinen pitoisuus, mutta tilastollisissa analyyseissa käytetään vain todellisia pitoisuuksia tappavien pitoisuuksien arvoja laskettaessa.

21. Jos mahdollista, on käytettävä yksi erä testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin tietyssä määrin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

22. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana, ja sitä on tarkkailtava jatkuvasti ja/tai ajoittain analyysimenetelmän mukaisesti. Jos näytteitä otetaan ajoittain, kammion ilmakehästä on otettava näytteitä vähintään kahdesti neljän tunnin tutkimuksen aikana. Jos se ei ole mahdollista vähäisen ilmanvirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, koko altistusjakson ajalta voidaan ottaa yksi näyte. Jos näytteiden välillä ilmenee suurta vaihtelua, seuraavia pitoisuuksia testattaessa on otettava neljä näytettä kutakin altistusta kohti. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan, mikä otetaan huomioon t_{95}-ajan saavuttamiseen tarvittavissa ajoissa. Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

▼M4

23. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin, joten jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai komponentin (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

24. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kahdesti jokaisen neljän tunnin mittaisen altistuksen aikana käyttämällä kaskadierotinta tai jotain toista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, kyseistä muuta laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (8)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä tietojen epävarmuus on pyrittävä minimoimaan, jotta altistusta ei tarvitse toistaa. Höyryjen osalta on määritettävä hiukkaskoko, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyrykammiossa, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia (katso 14 kohta).

MENETTELY

Päätutkimus

25. Jokaisessa vaiheessa käytetään kolmea eläintä kumpaakin sukupuolta tai kuutta eläintä herkemmästä sukupuolesta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Aloitusannoksena käytettävä pitoisuus valitaan 1–4 kiinteästä pitoisuustasosta. Aloituspitoisuuden on oltava sellainen, että se todennäköisimmin aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia joillekin eläimistä, joille testikemikaalia on annettu. Kaasujen, höyryjen ja aerosolien testausmalleissa testataan CLP-luokkien 1–4 raja-arvoilla, jotka ovat kaasujen osalta 100, 500, 2 500 ja 20 000 ppm/4h (lisäys 2), höyryjen osalta 0,5, 2, 10 ja 20 mg/l/4h (lisäys 3) ja aerosolien osalta 0,05, 0,5, ja 1,5 mg/l/4h (lisäys 4). Luokka 5, jota ei käytetä asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (9), koskee pitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin kyseiset rajapitoisuudet. Jokaisen aloituspitoisuuden osalta sovelletaan vastaavaa testausmallia. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleiden eläinten lukumäärän mukaan testimenettelyssä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti, kunnes luokitus voidaan tehdä.

26. Altistusryhmien välinen aika määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Eläinten altistusta seuraavalla pitoisuudella on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Kunkin pitoisuustason välissä on suositeltavaa pitää kolmen tai neljän päivän mittainen tauko, jotta voidaan tarkkailla, ilmenevätkö myrkyllisyyden merkit viipeellä. Aikaväliä voidaan tarvittaessa mukauttaa esimerkiksi epävarmojen vasteiden yhteydessä.

▼M4

Rajatesti

27. Rajatestiä käytetään silloin, kun testikemikaalin tiedetään tai oletetaan olevan periaatteessa myrkytön eli aiheuttavan toksisen vasteen vain lakisääteistä rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla. Tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä voidaan hankkia samanlaisia testattuja kemikaaleja koskevista tiedoista, jolloin on otettava huomioon niiden komponenttien identiteetti ja prosenttiosuus, joilla tiedetään olevan toksikologista merkitystä. Tilanteissa, joissa tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tai sitä ei ole lainkaan tai jos testikemikaalin oletetaan olevan myrkyllinen, on toteutettava päätutkimus [lisäohjeita on ohjeasiakirjassa GD 39 (8)].

28. Normaalissa menettelyssä kolme eläintä kumpaakin sukupuolta tai kuusi eläintä herkemmästä sukupuolesta altistetaan pitoisuuksille, jotka ovat kaasujen osalta 20 000 ppm, höyryjen osalta 20 mg/l ja pölyjen/sumutteiden osalta 5 mg/l (mikäli saavutettavissa), mikä katsotaan tässä testimenetelmässä rajatestiksi. Aerosolien testauksessa ensisijaisena tavoitteena tulee olla hengitettävän hiukkaskoon (MMAD 1–4 μm) saavuttaminen. Useimpien kemikaalien osalta tämä on mahdollista, kun niiden pitoisuus on 2 mg/l. Aerosolien testaamista suurempina pitoisuuksina kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos hengitettävä hiukkaskoko voidaan saavuttaa [katso GD 39 (8)]. GHS-järjestelmän (16) mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä GHS-järjestelmän luokan 5 (16), jota ei käytetä asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (9), mukaista testausta tulee harkita vain, jos on erittäin todennäköistä, että tällaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden suojelemisessa, ja se on perusteltava tutkimusraportissa. Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen rajatestiä on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että rajatestin edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

HAVAINNOT

29. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti altistumisjakson aikana. Altistuksen jälkeen kliinisiä havaintoja on tehtävä vähintään kahdesti altistuspäivän aikana tai useammin, jos eläinten vaste käsittelyyn antaa siihen aihetta, ja vähintään kerran päivässä sen jälkeen yhteensä 14 päivän ajan. Havaintojakson pituus ei ole kiinteä, vaan se on määritettävä kliinisten merkkien luonteen ja alkamisajankohdan sekä toipumisajan pituuden perusteella. Ne ajankohdat, jolloin myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat ja häviävät, ovat tärkeitä varsinkin, jos myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat viipeellä. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti jokaisesta eläimestä erikseen. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet ja/tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti eläinten hyvinvointiin liittyvien periaatteiden vuoksi. Kun tutkitaan myrkyllisyyden kliinisiä merkkejä, on kiinnitettävä huomiota siihen, ettei altistusmenettelystä johtuvaa huonoa ulkonäköä ja ohimeneviä muutoksia hengityksessä pidetä erehdyksessä merkkeinä kemikaaliin liittyvästä myrkyllisyydestä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon (7). Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

▼M4

30. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Mikäli mahdollista, paikallisten ja systeemisten vaikutusten väliset erot on merkittävä muistiin. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta.

Eläinten painot

31. Kunkin eläimen paino on kirjattava kerran sopeutumisvaiheen aikana, altistuspäivänä ennen altistusta (päivä 0) ja vähintään päivinä 1, 3 ja 7 (ja myöhemmin viikoittain) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä, jos se tapahtuu päivän 1 jälkeen. Ruumiinpaino on tunnetusti erittäin tärkeä myrkyllisyyden indikaattori, joten eläimiä, joiden paino on jatkuvasti vähintään 20 prosenttia pienempi ennen tutkimusta mitattuihin arvoihin verrattuna, on seurattava tarkasti. Elossa olevat eläimet punnitaan ja lopetetaan humaanisti altistumisen jälkeisen jakson lopussa.

Patologia

32. Kaikki koe-eläimet, myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetut ja tutkimuksesta poistetut, avataan. Jos avausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

33. Myös tutkimussuunnitelmaan ennalta sisällytettyjen lisätutkimusten käyttöä voidaan harkita tutkimuksen tulkinnallisen arvon lisäämiseksi. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi eloonjääneiden rottien keuhkojen painon punnitus ja/tai todisteiden hankkiminen ärsyttävyydestä hengitysteiden mikroskooppitutkimuksella. Tutkittaviin elimiin voi sisältyä myös vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet ja elimet, joissa tiedetään tai oletetaan olevan kemikaalin aiheuttamia vaikutuksia. Koko hengityselimistön mikroskooppitutkimus voi antaa hyödyllistä tietoa veden kanssa reagoivista testikemikaaleista, kuten hapoista ja hygroskooppisista testikemikaaleista.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

34. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot ruumiinpainoista ja ruumiinavaustuloksista on esitettävä. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin testiryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, myrkyllisyyden oireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, myrkyllisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

▼M4

Testiraportti

35. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— tiedot ruoan ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— kuvaus inhalaatiokammiosta sekä sen mitat ja tilavuus

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilmanlähde, tulo- ja poistoilman käsittely sekä ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti järjestelmässä (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän ajallinen yhtenäisyys/stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— tiedot hapen ja hiilidioksidin mittauslaitteistosta, jos tarpeen

▼M4

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuusmuutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.), tilavuusyksiköt (esimerkiksi ppm, ppb jne.) voidaan ilmoittaa sulkeissa

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät. Yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä. Jos mekaaniset prosessit ovat voineet muuttaa kemiallista koostumusta, on ilmoitettava analyysien tulokset testikemikaalin koostumuksen vahvistamiseksi.

— kuvaus (mieluiten kaavio) testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— vastetiedot ja pitoisuustaso jokaisesta eläimestä (ts. eläimet, joissa oli merkkejä myrkyllisistä vaikutuksista, ja tiedot kuolleisuudesta sekä vaikutusten luonteesta, vaikeusasteesta, alkamisajankohdasta ja kestosta) (taulukkomuodossa)

— tutkimuksen aikana kerätyt tiedot yksittäisten eläinten ruumiinpainoista, kuolinpäivä ja -aika, jos se tapahtui ennen suunniteltua lopetusta, kunkin eläimen myrkyllisyysoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen

▼M4

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— CLP-luokitus ja LC_{50}-raja-arvo.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (esimerkiksi rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittelemiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallisesta vaikutustavasta (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (7) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Tämän liitteen luku B.2 – Akuutti myrkyllisyys hengitettynä.

2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.

3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.

4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129–134.

5) Tämän liitteen luku B.1 b: Akuutti myrkyllisyys hengitettynä – akuutin toksisuuden luokittelua koskeva menetelmä

6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

10) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

11) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihmisihomallitesti.

12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.

15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 2

Kaasut: jokaisen aloituspitoisuuden (PPM/4 H) yhteydessä noudatettava menettely

Yleisiä huomioita ([1])

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 2 a: Aloituspitoisuus on 100 ppm.

Lisäys 2 b: Aloituspitoisuus on 500 ppm.

Lisäys 2 c: Aloituspitoisuus on 2 500 ppm.

Lisäys 2 d: Aloituspitoisuus on 20 000 ppm.

Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

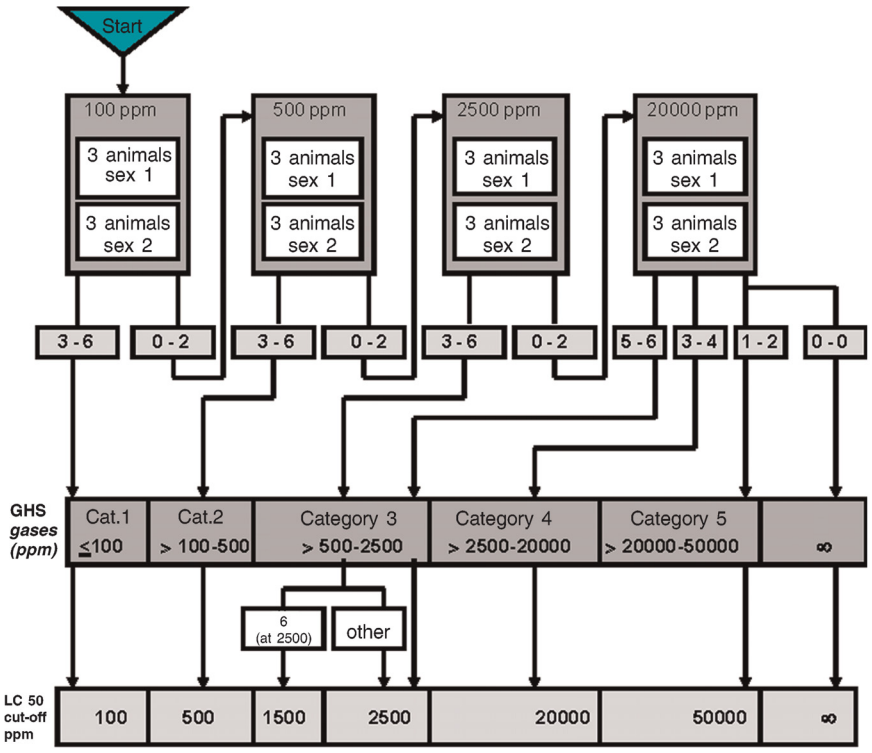
([1]) Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

▼M4

Lisäys 2 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

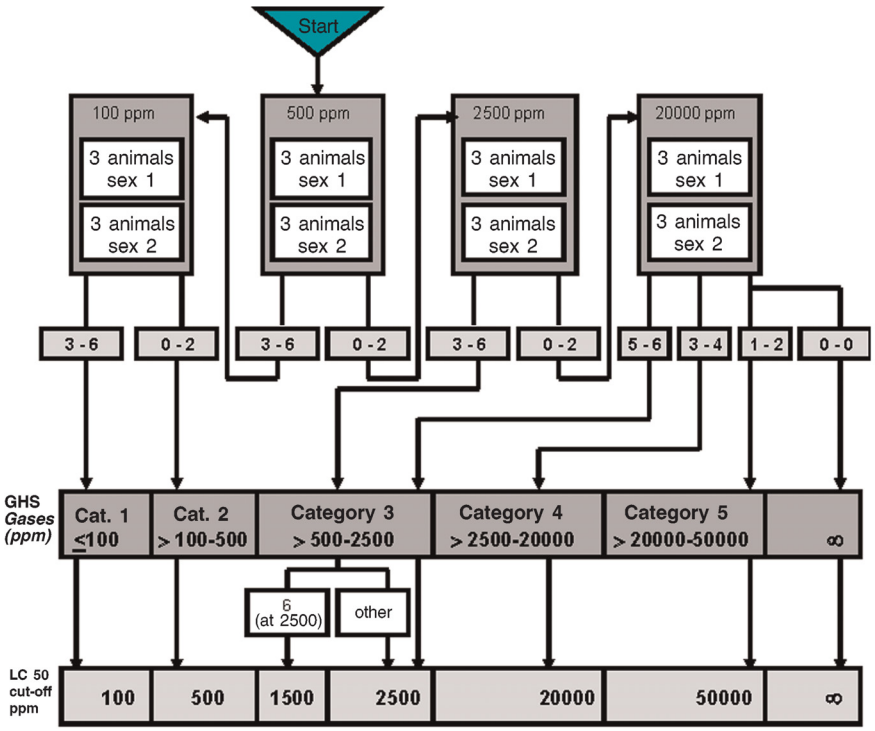
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 2 b

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

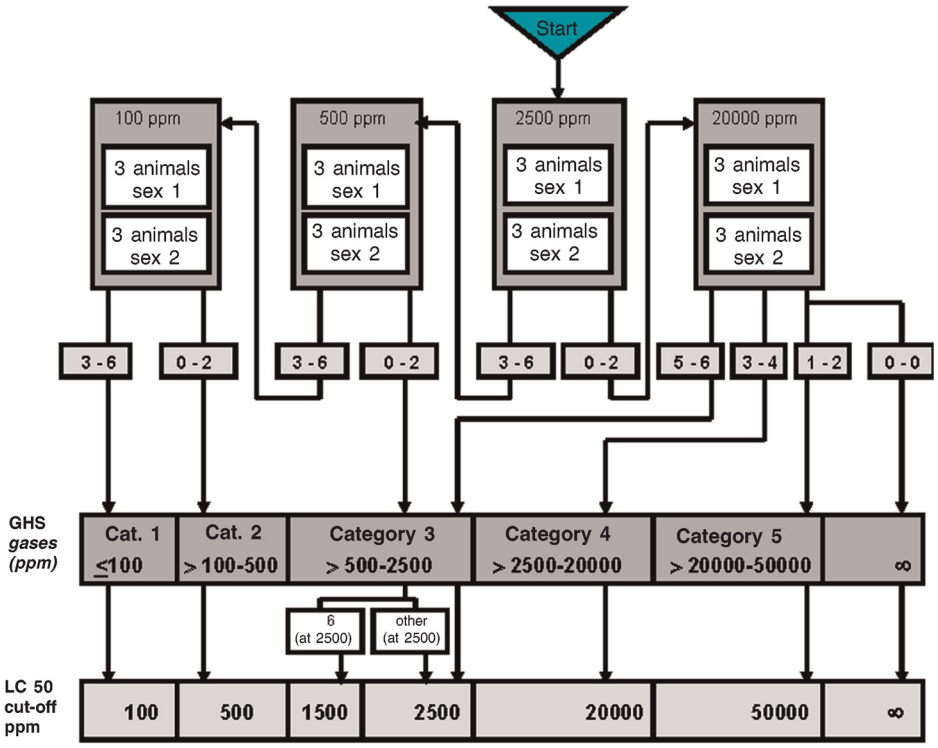
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 2 c

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

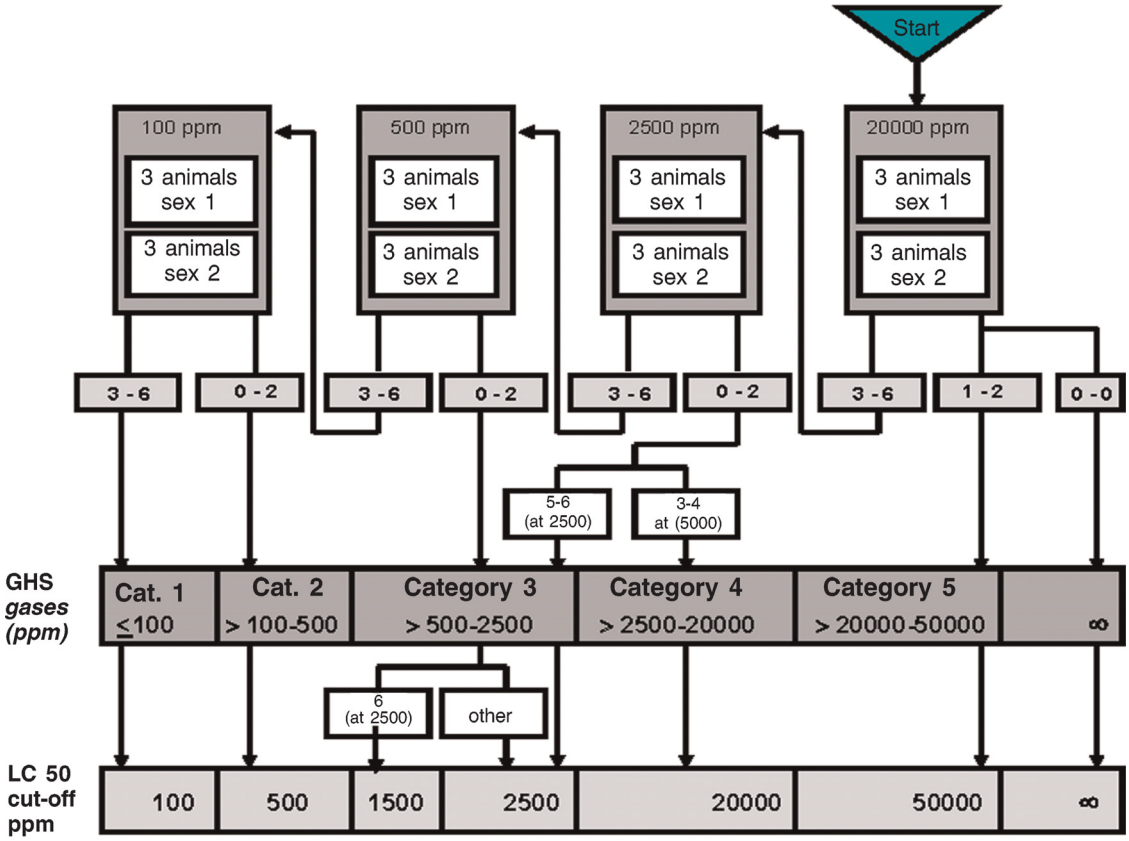
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 2 d

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼**M4**

Lisäys 3

Höyryt: jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä noudatettava menettely (mg/l/4h)

Yleisiä huomioita ([1])

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 3 a: Aloituspitoisuus on 0,5 mg/l.

Lisäys 3 b: Aloituspitoisuus on 2,0 mg/l.

Lisäys 3 c: Aloituspitoisuus on 10 mg/l.

Lisäys 3 d: Aloituspitoisuus on 20 mg/l.

Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

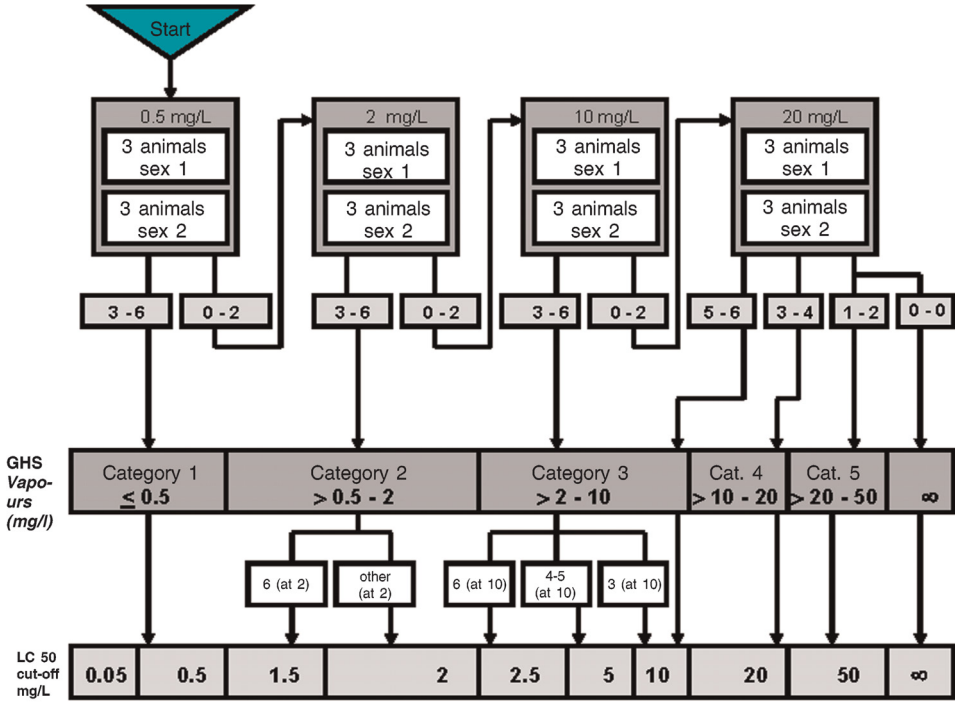
([1]) Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

▼M4

Lisäys 3 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours



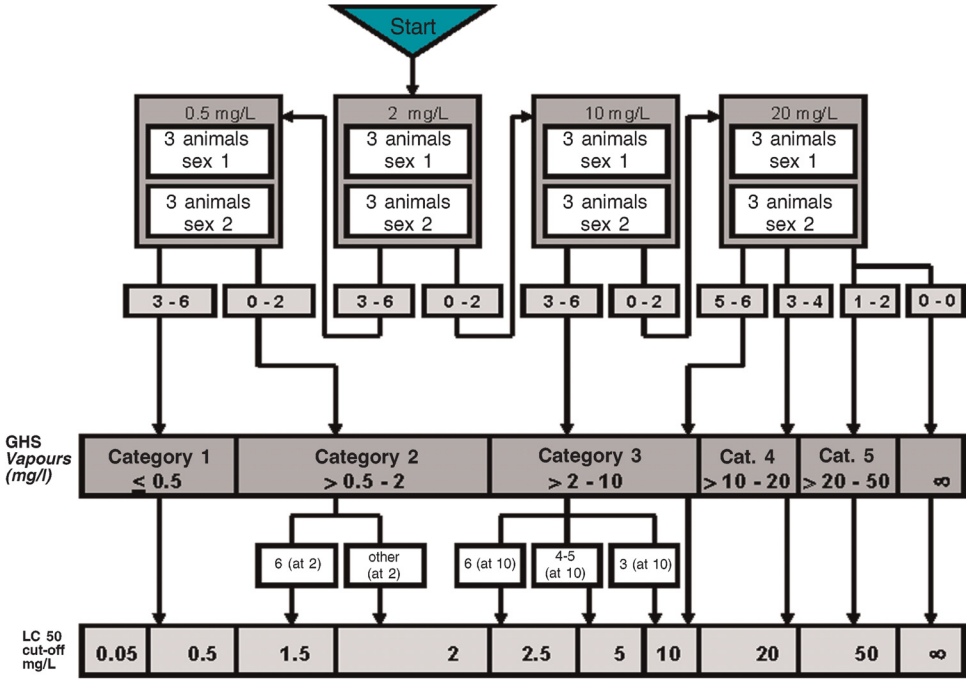
- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 3 b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

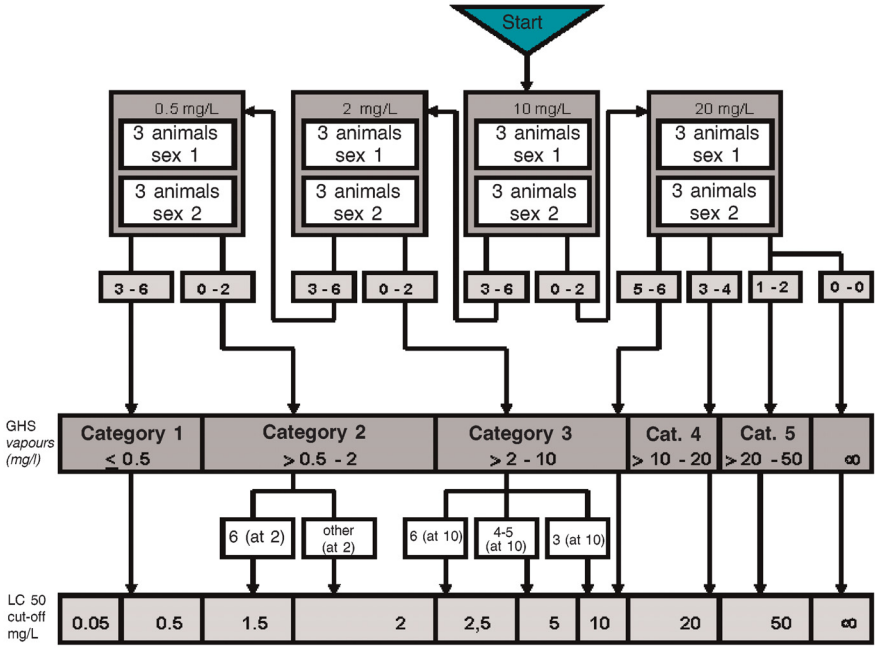
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 3 c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



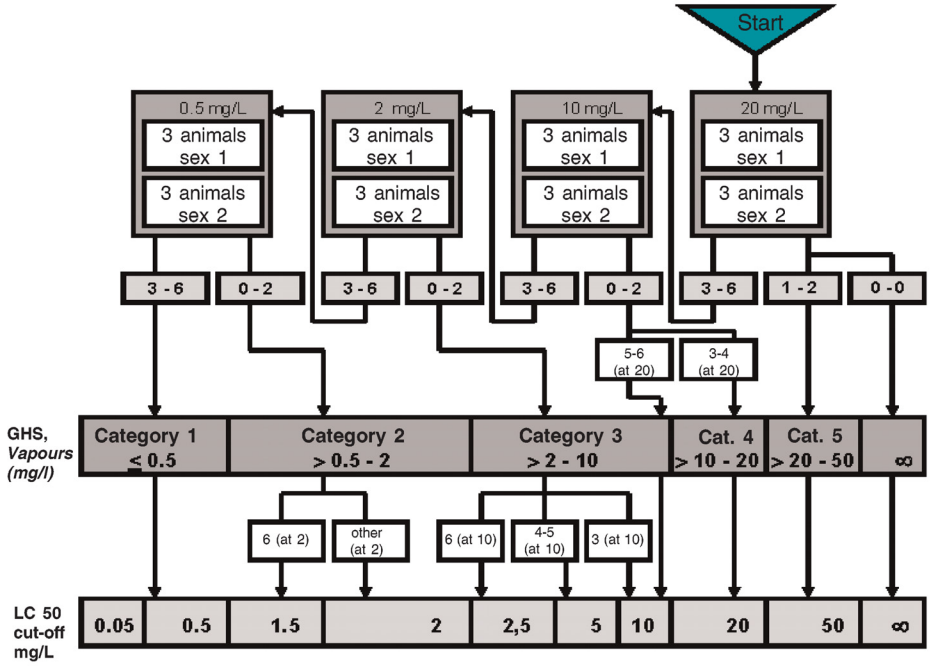
- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step
- 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 3 d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

▼**M4**

Lisäys 4

Aerosolit: jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä noudatettava menettely (mg/l/4h)

Yleisiä huomioita ([1])

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 4 a: Aloituspitoisuus on 0,05 mg/l.

Lisäys 4 b: Aloituspitoisuus on 0,5 mg/l.

Lisäys 4 c: Aloituspitoisuus on 1 mg/l.

Lisäys 4 d: Aloituspitoisuus on 5 mg/l.

Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

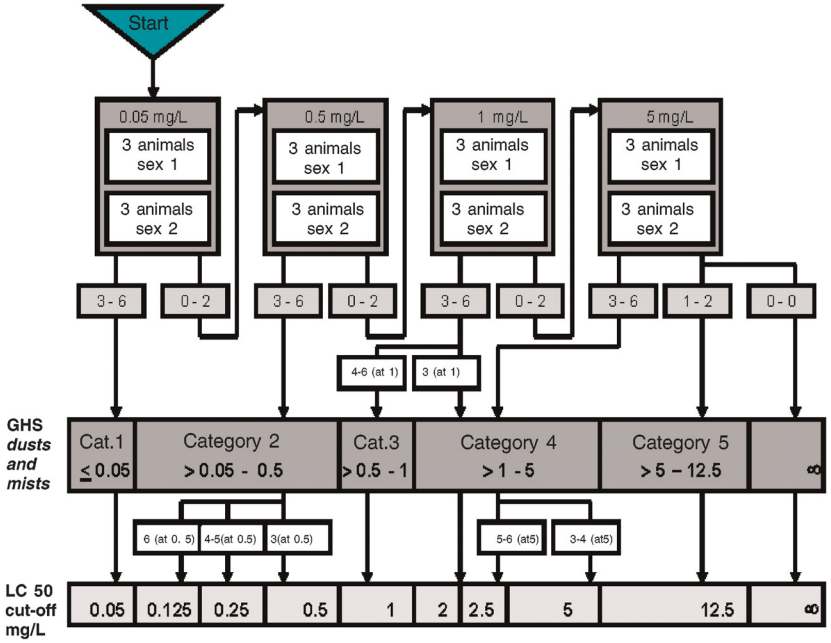
([1]) Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

▼M4

Lisäys 4 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,05 mg/L/4h for aerosols



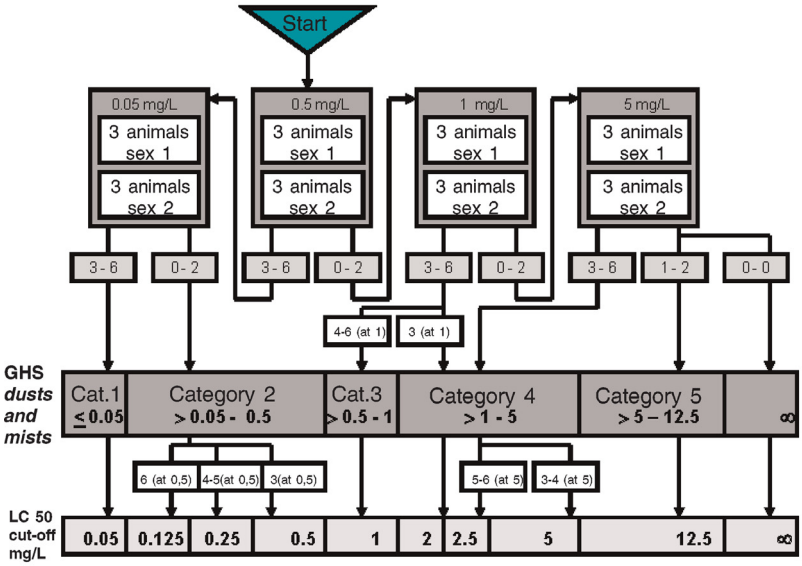
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 4 b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

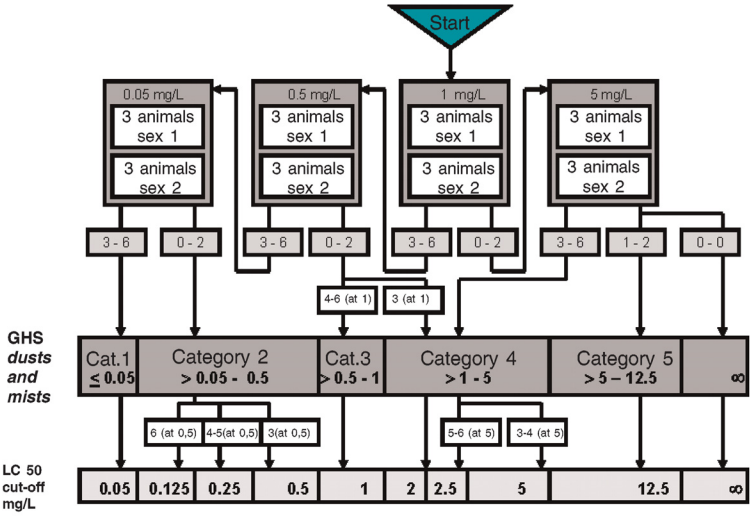
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 4 c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



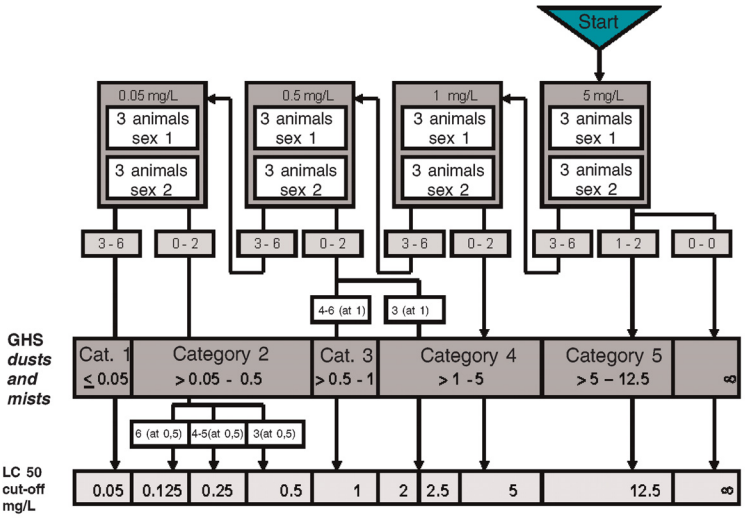
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Lisäys 4 d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6 : Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)”

▼M5

B.53. HERMOSTONKEHITYKSEEN KOHDISTUVIA MYRKYLLISYYSVAIKUTUKSIA KOSKEVA TUTKIMUS

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 426 (2007); OECD:n lisääntymis- ja kehitystoksisuutta käsittelevä työryhmä käsitteli Kööpenhaminassa kesäkuussa 1995 tarvetta päivittää voimassa olevia OECD:n lisääntymis- ja kehitystoksisuutta koskevia testiohjeita ja laatia uusia ohjeita päätetapahtumille, joita ei vielä ole käsitelty (1). Työryhmä suositteli, että testiohje hermostonkehitykseen kohdistuvasta neurotoksisuudesta laaditaan Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston ohjeiden perusteella. Näitä ohjeita on sittemmin tarkistettu (2). Kööpenhaminassa pidettiin kesäkuussa 1996 toinen kuulemiskokous, jossa sihteeristölle annettiin ohjeita hermostonkehitykseen kohdistuvaa neurotoksisuutta koskevien uusien testiohjeiden laadinnasta, mukaan lukien keskeiset näkökohdat, kuten eläinlajin valinta, annostelujakso, testausajankohta, arvioitavat päätetapahtumat ja tuloksien arviointia koskevat kriteerit. Yhdysvaltojen ohjeet neurotoksisuutta koskevasta riskiarvioinnista julkaistiin vuonna 1998 (3). OECD:n asiantuntijakomitean kokous ja International Life Science Institute -organisaation Risk Science Institute -tiedeinstituutin työryhmä kokoontui lokakuussa 2000, ja asiantuntijoiden kuulemiskokous pidettiin Tokiossa vuonna 2005. Näissä kokouksissa käsiteltiin nykyisen testiohjeen tieteellisiä ja teknisiä kysymyksiä, ja kokouksien suositukset (4)(5)(6)(7) otettiin huomioon tämän testimenetelmän kehittämisessä. Lisätiedot tämän testimenetelmän toteutuksesta, tulkinnasta ja terminologiasta sisältyvät lisääntymistoksisuuden testaamista ja arviointia koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan 43 (8) ja neurotoksisuuden testaamista koskevaan ohjeasiakirjaan 20 (9).

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT

2. Useiden kemikaalien tiedetään aiheuttavan ihmisten ja muiden lajien hermostonkehitykselle myrkyllisyysvaikutuksia (10)(11)(12)(13). Hermostonkehitykselle mahdollisesti aiheutuvien myrkyllisyysvaikutusten määrittelyä voidaan tarvita kemikaalin myrkyllisen vaikutusten arviointiin. Tutkimukset hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksia on suunniteltu siten, että niillä tarjotaan tietoja, myös annos-vastesuhteen kuvauksia, sellaisista mahdollisista toiminnallisista ja morfologisista vaikutuksista poikasten kehittyvään hermostojärjestelmään, jotka voivat aiheutua kemikaalille altistumisesta kohdussa ja varhaisessa kehitysvaiheessa.

3. Tutkimus hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksista voidaan suorittaa erillisenä tutkimuksena, joka sisällytetään tutkimukseen lisääntymiselle ja/tai täysikasvuisille eläimille aiheutuvista myrkyllisyysvaikutuksista (kuten testimenetelmät B.34 (14), B.35 (15) ja B.43 (16)), tai se voidaan lisätä tutkimukseen syntymää edeltävistä myrkyllisyysvaikutuksista (esim. testimenetelmä B.31 (17)). Jos tutkimus hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksista sisällytetään toiseen tutkimukseen, on tärkeää säilyttää kummankin tutkimustyypin yhtenäisyys. Kaikissa testeissä olisi noudatettava voimassa olevaa lainsäädäntöä taikka viranomaisten tai instituutioiden antamia ohjeita koe-eläinten käytöstä tutkimuksissa (kuten 18).

4. Koelaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen suorittamista. Näihin sisältyvät kemikaalin tunnistetiedot ja rakenne, sen fysikokemialliset ominaisuudet, kaikkien muiden kemikaalilla *in vivo* tai *in vitro* suoritettujen toksisuuskokeiden tulokset, rakenteellisesti samanlaisten aineiden toksikologiset tiedot ja kemikaalin odotettu käyttötapa. Nämä tiedot ovat välttämättömiä kaikkien asianosaisten vakuuttamiseksi siitä, että kokeella on merkitystä ihmisten terveyden suojelulle ja että sen avulla voidaan valita sopiva aloitusannos.

▼M5

TESTIN PERIAATE

5. Testikemikaali annostellaan eläimille tiineys- ja imetysaikana. Emoja testataan tiineisiin ja imettäviin naaraisiin aiheutuvien vaikutusten arvioimiseksi ja mahdollisesti vertailutietojen tarjoamiseksi (emot poikasiin verrattuna). Poikaset valitaan poikueista sattumanvaraisesti neurotoksisuuden arviointia varten. Arviointiin sisältyy näkyvien neurologisten ja käytösmuutosten havainnointi, mukaan lukien arviointi fyysisestä kehityksestä, käytöksen kehityksestä, motorisesta aktiviteetista, motorisesta ja aistien toiminnasta sekä oppimisesta ja muistista; myös aivojen painoa ja neuropatologiaa syntymän jälkeisen kehityksen ja kypsän iän aikana arvioidaan.

6. Jos testimenetelmä toteutetaan erillisenä tutkimuksena, myös muita kussakin ryhmässä käytettävissä olevia eläimiä voidaan käyttää tiettyihin hermostoperäisiin käyttäytymisoireisiin liittyviin, neuropatologisiin, neurokemiallisiin tai sähköfysiologisiin tutkimuksiin. Näin voidaan täydentää tässä testimenetelmässä suositelluista tutkimuksista saatuja tietoja (16)(19)(20)(21). Täydentävät tutkimukset voivat olla erityisen hyödyllisiä, kun empiiriset havainnot tai ennakoidut vaikutukset taikka menettely/vaikutustapa osoittavat kemikaalin neurotoksisuuden olevan tietyn tyyppistä. Näitä täydentäviä toimenpiteitä voidaan soveltaa emoihin ja poikasiin. Lisäksi voidaan käyttää *ex vivo*- tai *in vitro* -menettelyjä, kunhan ne eivät vaikuta *in vivo* -menettelyjen yhtenäisyyteen.

TESTIN VALMISTELU

Eläinlajin valinta

7. Suositeltavin testieläinlaji on rotta, mutta muita lajeja voidaan käyttää tarvittaessa. On kuitenkin pantava merkille, että tässä testimenetelmässä määritetyt tiineysajan ja synnytyksen jälkeiset päivät ovat ominaisia yleisesti käytetyille rottakannoille, joten eri lajeja tai epätavallisia kantoja käytettäessä olisi valittava vertailukelpoiset päivät. Toisen lajin käyttöä olisi perusteltava toksikologisilla, farmakokineettisillä ja/tai muilla tiedoilla. Perusteluun olisi sisällyttävä lajispesifisten syntymän jälkeisiin hermostoperäisiin käytösoireisiin liittyvien ja neuropatologisten arviointien saatavuus. Jos aiemmassa testissä ilmeni ongelmia, siinä käytettyä lajia/kantaa olisi harkittava tarkemmin. Eri rottakantojen käyttöön liittyvien tehokkuuskriteerien vuoksi on todistettava, että valitun kannan hedelmällisyys ja vaste on riittävä. Muiden lajien käytön luotettavuutta ja herkkyyttä hermostonkehitykseen kohdistuvien myrkyllisyysvaikutuksien havaitsemiseksi tulee dokumentoida.

Koe-eläinten häkit ja eläinten ruokinta

8. Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla 22 ± 3 °C. Vaikka suhteellisen kosteuden pitäisi olla vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Valaistussyklin suuntaa on myös mahdollista muuttaa ennen parittelua ja tutkimuksen keston ajaksi, jotta toimintaa ja käytöstä koskevia päätetapahtumia voidaan arvioida pimeän aikana (punaisessa valossa), eli silloin kuin eläimet ovat tavanomaisesti aktiivisia (22). Kaikkiin valaistussykliin tehtäviin muutoksiin olisi sisällyttävä riittävä sopeutumisaika, jotta eläimet voivat mukautua uuteen sykliin. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon ja veden tyyppi olisi ilmoitettava ja kummankin epäpuhtaudet olisi analysoitava.

▼M5

9. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Parituksen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Kun parituksen voidaan todeta tapahtuneen tai viimeistään tiineyden 15. päivänä kukin pariutunut naaras siirretään omaan synnytys- tai poikimishäkkiinsä. Häkit on sijoitettava siten, että niiden sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Paritetuille eläimille on annettava synnytyksen lähestyessä asianmukaiset ja etukäteen määritellyt pesäntekoaineet. On tiedossa, että epäasianmukainen käsittely tai tiineyden aikainen stressi voivat johtaa haitallisiin vaikutuksiin, kuten sikiön menetykseen sekä sikiön ja vastasyntyneen kehityksen muutoksiin. Jotta sikiön menettäminen muista kuin altistukseen liittyvistä syistä estettäisiin, tiineiden eläinten tarpeetonta käsittelyä sekä ulkoisten tekijöiden, kuten melun, aiheuttamaa stressiä pitäisi välttää.

Eläinten valmistelu

10. Olisi käytettävä terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin ja joita ei ole aiemmin käytetty testeihin, ellei tutkimusta sisällytetä toiseen tutkimukseen (ks. 3 kohta). Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Kullekin eläimelle olisi annettava oma tunnistenumero ja se olisi merkittävä sillä. Eläinten tulee olla kaikissa testiryhmissä samanpainoisia ja -ikäisiä niin tarkasti kuin on käytännössä mahdollista ja olla tutkittavan lajin ja kannan normaaleissa rajoissa. Kullakin annostasolla tulee käyttää nuoria täysikasvuisia naaraita, jotka eivät ole synnyttäneet. Sisarusten pariutumista tulee välttää, ja tämän varmistamisesta olisi huolehdittava. Tiineyspäivä 0 on se päivä, jolloin vaginan tulpitus ja/tai sperma havaitaan. Riittävä sopeutumisaika (esim. kahdesta kolmeen päivään) pitäisi varmistaa, kun toimittajalta ostetaan eläimiä, joiden tiineyttä valvotaan. Paritetut naaraat olisi jaettava satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmään, ja eläimet olisi jaettava mahdollisuuksien mukaan tasaisesti molempiin ryhmiin (jotta kaikki ryhmät jaetaan tasaisesti, suositellaan satunnaista ositettua menettelyä, kuten sellaista, joka perustuu ruumiinpainoon). Samoin on meneteltävä saman uroksen hedelmöittämien naaraiden kohdalla.

TESTIN SUORITTAMINEN

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

11. Kussakin testi- ja kontrolliryhmässä pitäisi olla tarpeeksi monta testikemikaalille altistettua tiineenä olevaa naarasta, jotta varmistetaan, että neurotoksisuuden arviointia varten saadaan tuotettua riittävä määrä poikasia. Kutakin annostasoa varten suositellaan 20 poikuetta. Rinnakkaisia ja porrastettuja ryhmiä koskevat annostussuunnitelmat sallitaan, jos kunkin ryhmän poikueiden kokonaismäärät saavutetaan ja rinnakkaiskokeita varten käytetään asianmukaisia tilastollisia malleja.

12. Syntymän jälkeisenä päivänä, jäljempänä ‘SJP’, 4 tai sitä ennen (synnytyspäivä on syntymän jälkeinen päivä 0) kunkin poikueen kokoa olisi mukautettava poistamalla ylimääräiset poikaset satunnaisella valinnalla, jotta kaikkien poikueiden koko on sama (23). Poikueen koko ei saisi ylittää käytetyn jyrsijäkannan keskimääräistä poikuekokoa (8–12). Poikueessa olisi oltava — mahdollisimman suuressa määrin — yhtä monta koiras- ja naaraspuolista poikasta. Poikasten valikoiva poistaminen esimerkiksi ruumiinpainon perusteella ei ole tarkoituksenmukaista. Poikueiden yhdenmukaistamisen jälkeen (karsinta) ja ennen toiminnallisten päätetapahtumien testaamista kukin vieroitusta edeltävään tai sitä seuraavaan testiin tarkoitettu poikanen olisi tunnistettava yksilöllisesti käyttäen mitä tahansa inhimillistä keinoa poikasen tunnistamiseksi (esim. 24).

▼M5

Eläinten jakaminen toiminnallisiin ja käyttäytymistä mittaaviin testeihin, aivojen paino ja neuropatologiset arvioinnit

13. Testimenetelmässä käytetään erilaisia tapoja jakaa kohdussa ja imettämisen aikana altistetut eläimet toiminnallisia ja käyttäytymistä mittaavia testejä, sukukypsyyttä ja aivojen painon määrittelyä sekä neuropatologista arviointia varten (25). Muita hermostoperäisiin käytösoireisiin (kuten sosiaalinen käyttäytyminen), neurokemiaan tai neuropatologiaan liittyviä testejä voidaan lisätä tapauskohtaisesti sillä edellytyksellä, että alkuperäisten vaadittujen testien luotettavuutta ei vaaranneta.

14. Poikaset valitaan kustakin annosryhmästä ja niistä tehdään tutkittavien ominaisuuksien arviointi syntymän jälkeisenä päivänä 4. Poikaset valitaan siten, että kustakin poikueesta valitaan mahdollisuuksien mukaan kumpaakin sukupuolta jokaiseen annosryhmään niin, että ne ovat tasapuolisesti edustettuina kaikissa testeissä. Motorista aktiviteettia koskevassa testissä olisi testattava samaa uros- ja naaraspari kaikissa vieroitusta edeltävissä ikäryhmissä (ks. 35 kohta). Kaikkien muiden testien osalta voidaan valita samoja tai erillisiä uros- ja naarapareja erilaisiin käyttäytymistä mittaaviin testeihin. Kognitiivisia toimintoja mittaaviin vastavieroitettuja ja täysikasvuisia vertaileviin testeihin voidaan joutua valitsemaan eri poikaset. Näin vältetään se, että ikä ja aikaisempi opetus häiritsevät näitä mittauksia (26)(27). Vieroitusajankohdalla (syntymän jälkeinen päivä 21) poikaset, joita ei ole valittu testeihin, voidaan lopettaa inhimillisellä tavalla. Kaikki poikasten valintaan liittyvät muutokset olisi raportoitava. Tilastollisen mittayksikön pitäisi olla poikue (tai emo), ei poikanen.

15. On erilaisia tapoja valita poikaset vieroitusta edeltäviin ja sitä seuraaviin tutkimuksiin, kognitiivisiin testeihin, patologisiin tutkimuksiin jne. (ks. kuva 1 yleisestä suunnittelusta ja liite 1 valintatapoja koskevista esimerkeistä). Suositellut eläinten vähimmäismäärät kussakin annosryhmässä vieroitusta edeltäviä ja sitä seuraavia tutkimuksia varten ovat seuraavat:

Kliiniset havainnot ja ruumiinpaino	Kaikki eläimet
Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Aivojen paino (fiksaation jälkeen) SJP 11–22	10/sukupuoli (1/poikue)
Aivojen paino (ilman fiksaatiota) ~ SJP 70	10/sukupuoli (1/poikue)
Neuropatologia (immersio- tai perfuusiofiksaatio) SJP 11–22	10/sukupuoli (1/poikue)
Neuropatologia (perfuusiofiksaatio) SJP ~ 70	10/sukupuoli (1/poikue)
Sukukypsyys	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Muut kehitykseen liittyvät tuntomerkit (vapaaehtoinen)	Kaikki eläimet
Käytöksen kehitys	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Motorinen aktiviteetti	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Motorinen ja aistien toiminta	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Oppiminen ja muisti	10/sukupuoli ([a]) (1/poikue)

([a]) Kognitiivista toimintaa koskevien testien herkkyydestä riippuen suuremman eläinmäärän tutkimista olisi harkittava, esimerkiksi enintään 1 koiras- ja 1 naaraspuolinen eläin poikuetta kohti (eläinten valinta, ks. liite 1) (lisäohjeistus otoskoosta annetaan OECD:n ohjeasiakirjassa 43 (8)).

▼M5

Annostasot

16. On käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja rinnakkaista kontrolliryhmää. Annostasojen välit määritetään siten, että toksiset vaikutukset saadaan porrastettua. Mikäli testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, se olisi valittava siten, että emoille aiheutetaan joitain myrkytysoireita (esim. kliinisiä löydöksiä, ruumiinpainon väheneminen (ei yli 10 prosenttia) ja/tai todisteet annostusta rajoittavasta toksisuudesta kohde-elimessä). Korkeinta annostasoa voidaan rajoittaa niin, että se on 1 000 mg/painokilo/vrk. On myös joitain poikkeustapauksia. Esimerkiksi odotettavissa oleva ihmisten altistuminen voi merkitä, että tarvitaan korkeampaa annostasoa. Vaihtoehtoisesti olisi tehtävä esitutkimuksia tai alustavia raja-annostutkimuksia sellaisen suurimman käytettävän annoksen määrittämiseksi, jonka pitäisi aiheuttaa emoille vähiten myrkyllisyysvaikutuksia. Jos testikemikaalin on todettu aiheuttavan sikiönkehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia tavanomaisessa kehitystoksisuutta koskevassa tutkimuksessa tai esitutkimuksessa, suurimman annostason pitäisi olla suurin annos, joka ei aiheuta liikaa myrkyllisiä vaikutuksia poikasissa tai kohdussa taikka vastasyntyneiden kuolemaa tai epämuodostumia, jotka riittäisivät estämään neurotoksisuuden asianmukaisen arvioinnin. Pienimmän annostason tavoitteena pitäisi olla se, että sillä ei aiheuteta mitään emoihin tai kehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia, mukaan lukien neurotoksisuus. Annostasot valitaan asteittain alenevasti. Näin osoitetaan mahdollinen annosvaste ja haitaton vaikutustaso (NOAEL) tai lähellä havaitsemisrajaa olevat annokset, joiden perustella voidaan määrittää vertailukohtana oleva annos. Vähintään kaksinkertaiset ja enintään nelinkertaiset annostasojen välit ovat usein optimaaliset, kun asetetaan alenevat annostasot. Usein on parempi lisätä neljäs annosryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi yli kymmenkertaisia annosvälejä).

17. Annostasojen valinnassa olisi otettava huomioon kaikki aikaisemmat toksisuustiedot sekä tiedot testikemikaalin tai sen kanssa samantyyppisten materiaalien metaboloitumisesta ja toksikokineettisistä ominaisuuksista. Näillä tiedoilla voidaan myös tukea sen osoittamista, että annostus on valittu oikein. Annosten antamista suoraan poikasille olisi harkittava altistus- ja farmakokineettisten tietojen perusteella (28)(29). Ennen kuin tehdään tutkimuksia suorasta annostuksesta, olisi harkittava huolellisesti etuja ja haittoja (30).

18. Rinnakkaisen kontrolliryhmän pitäisi olla joko plaseboa saava kontrolliryhmä tai kantaja-ainetta saava kontrolliryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Kaikille ryhmille annetaan tavanomaisesti tilavuudeltaan sama määrä joko testikemikaalia tai kantaja-ainetta eläimen painon perusteella. Jos annostelun helpottamiseksi käytetään kantaja-ainetta tai muuta lisäainetta, on syytä selvittää: sen vaikutus imeytymiseen, jakautumiseen, metaboloitumiseen tai elimistössä säilymiseen; vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka saattavat muuttaa sen toksisia ominaisuuksia; sekä vaikutukset koe-eläinten ravinnon ja juoman kulutukseen tai ravitsemustilaan. Kantaja-aine ei saisi aiheuttaa vaikutuksia, jotka voivat olla esteenä tutkimuksen tulkinnalle, eikä sillä saisi olla toksisia hermostoperäisiä käyttäytymiseen kohdistuvia vaikutuksia tai vaikutuksia lisääntymiseen tai kehitykseen. Jos käytetään uutta kantaja-ainetta, kantaja-ainetta saavan kontrolliryhmän lisäksi tutkimukseen sisällytetään plaseboa saava kontrolliryhmä. Kontrolliryhmän tai -ryhmien eläimiä tulee käsitellä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä.

▼M5

Antotapa

19. Testikemikaalia tai kantaja-ainetta olisi annettava ihmisten altistumiselle asianmukaisinta reittiä. Tämä perustuu koe-eläinten metaboloitumisesta ja jakautumisesta saatavilla olevaan tietoon. Ainetta annetaan tavallisesti suun kautta (esim. letkulla, ravinnon tai juomaveden välityksellä), mutta myös muuta reittiä voidaan käyttää (esim. ihon tai inhalaation kautta). Tämä riippuu ominaisuuksista taikka odotettavissa olevista tai tunnetuista ihmisen altistusreiteistä (lisäohjeita annetaan ohjeasiakirjassa 43 (8)). Valitusta antoreitistä olisi esitettävä perustelu. Testiaine annetaan päivittäin suunnilleen samaan aikaan.

20. Kunkin eläinyksilön annoksen pitäisi yleensä perustua viimeisimpään eläimen ruumiin painon määritykseen. Annoskoon määrittämisessä on kuitenkin toimittava erityisen huolellisesti viimeisen tiineyskolmanneksen aikana. Jos testikemikaalia saaneissa emoissa havaitaan kuitenkin liian suuria myrkyllisyysvaikutuksia, nämä eläimet on lopetettava inhimillisellä tavalla.

21. Testikemikaalia tai kantaja-ainetta olisi annosteltava vähintään päivittäin paritelluille naaraille munasolun kohdun seinämään kiinnittymisestä lähtien (tiineyspäivä 6) koko imetyksen ajan (SJP 21), jotta poikaset altistetaan testikemikaalille syntymää edeltävän ja sen jälkeisen neurologisen kehityksen aikana. Ikää, jolloin annostus aloitetaan sekä annostuksen kestoa ja tiheyttä voidaan mukauttaa, jos on näyttöä, jolla tuetaan ihmisten altistumisen suhteen asianmukaisempaa koejärjestelyä. Annostuksen kestoa olisi mukautettava toisiin lajeihin nähden, jotta altistuminen aivojen kehityksen varhaisessa vaiheessa (joka vastaa ihmisen aivojen syntymää edeltävää ja varhaista syntymän jälkeistä kasvuvaihetta) varmistetaan. Annostelu voidaan aloittaa tiineyden alkamisajankohdasta (tiineyspäivä 0). On kuitenkin kiinnitettävä huomiota siihen mahdollisuuteen, että testikemikaali voi päättää tiineyden, ennen kuin munasolu kiinnittyy kohdun seinämään. Tiineyspäivänä 6 aloitetulla annostuksella vältettäisiin tämä riski, mutta kehitysvaiheita tiineyspäivän 0 ja 6 välillä ei katettaisi. Jos laboratorio hankkii aikaparitettuja eläimiä, ei ole käytännöllistä aloittaa annostusta tiineyspäivänä 0, vaan asianmukainen aloituspäivä on tiineyspäivä 6. Koelaboratorion olisi mukautettava annostusta testiaineen vaikutuksia koskevien asianmukaisten tietojen, aikaisempien kokemusten ja logististen näkökohtien perusteella. Tähän voi sisältyä annostuksen jatkaminen vieroituksen jälkeen. Annostelua ei suoriteta synnytyspäivänä niille eläimille, joiden synnytys on kesken. Yleisesti oletetaan, että poikaset altistuvat äidinmaidon kautta, mutta poikasille suoraan annettavia annoksia olisi harkittava tapauksissa, joissa poikasten jatkuvasta altistuksesta puuttuu näyttöä. Näyttö jatkuvasta altistuksesta voidaan saada esimerkiksi farmakokineettisistä tiedoista, poikasiin kohdistuvasta toksisuudesta tai biomarkkereiden muutoksista (28).

TARKKAILU

Emojen tarkkailu

22. Kaikkien emojen terveydentilaa, sairastuneisuutta ja kuolleisuutta olisi seurattava ainakin kerran päivässä.

23. Käsittelytoimenpide- ja havaintojaksojen aikana olisi tehtävä säännöllisesti yksityiskohtaisempia kliinisiä havaintoja (ainakin kahdesti tiineysajan annosten antamisjaksolla ja kahdesti imetysajan annosten antamisjaksolla) käyttäen ainakin kymmentä emoa annostasoa kohti. Koulutettujen teknikoiden, jotka eivät ole tietoisia eläinten käsittelytiedoista, olisi tarkkailtava eläimiä niiden häkin ulkopuolella. Heidän pitäisi soveltaa standardoituja menettelyitä, joita käytetään eläinten stressin ja tarkkailijan ennakkokäsitysten vähimmäistämiseksi ja tarkkailijoiden välisen luotettavuuden maksimoimiseksi. On suositeltavaa, että havainnot tietyssä tutkimuksessa tekee sama teknikko, kun tämä on mahdollista.

▼M5

24. Havaitut oireet on kirjattava. Myös havaittujen oireiden voimakkuus on kirjattava mahdollisuuksien mukaan. Kliinisiä havaintoja on tehtävä muun muassa ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, mahdollisten eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toiminnan muutoksista (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeavuudet hengityksessä ja/tai ilman haukkominen, kaikki virtsaamiseen tai ulostamiseen liittyvät epätavalliset oireet).

25. Myös kaikki kehon asentoon, aktiivisuustasoon (esimerkiksi vakioalueen vähentynyt tai lisääntynyt tutkiminen) ja liikekoordinaatioon liittyvät epätavalliset vasteet on kirjattava. Muutokset käynnissä (esimerkiksi vaappuminen ja ataksia), asennossa (esimerkiksi selän köyristäminen) ja käsittelyyn, paikkaan tai muihin ympäristön ärsykkeisiin liittyvässä reaktiivisuudessa sekä klooniset tai tooniset liikkeet, kouristukset tai vapina, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, epätavalliset pään liikkeet, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi pureminen tai ylenmääräinen nuoleminen, itsensä silpominen, takaperin käveleminen, ääntely) tai aggressiivisuus on kirjattava.

26. Myrkytysoireet olisi kirjattava, mukaan lukien oireiden alkamispäivä, vuorokaudenaika, voimakkuus ja kesto.

27. Eläimet punnitaan tutkimuksen aikana annosteluajankohdalla ainakin viikoittain, synnytyspäivänä tai sen lähellä ja syntymän jälkeisenä päivänä 21 (vieroitus). Emot olisi punnittava letkuruokintatutkimuksia varten ainakin kahdesti viikossa. Annoksia olisi mukautettava kunkin painonmäärityksen ajankohdalla tarpeen mukaan. Ravinnonkulutusta olisi mitattava viikoittain vähintään tiineyden ja imetyksen aikana. Vedenkulutusta olisi mitattava ainakin viikoittain, jos eläin altistuu veden välityksellä.

Poikasten tarkkailu

28. Kaikkien poikasten myrkytysoireita, sairastuneisuutta ja kuolleisuutta seurataan ainakin kerran päivässä.

29. Käsittelytoimenpide- ja havaintojaksojen aikana olisi tehtävä yksityiskohtaisempia kliinisiä havaintoja poikasista. Koulutettujen teknikoiden, jotka eivät ole tietoisia eläinten käsittelytiedoista, olisi tarkkailtava poikasia (ainakin yksi poikanen/sukupuoli/poikue). Heidän pitäisi käyttää standardoituja menettelyitä tarkkailijan ennakkokäsitysten vähimmäistämiseksi ja tarkkailijoiden välisen luotettavuuden enimmäistämiseksi. On suositeltavaa, että havainnot tekee sama teknikko, kun tämä on mahdollista. Vähintään 24 ja 25 kohdassa kuvattuja päätetapahtumia olisi tarkkailtava, kun se on asianmukaista tarkkailtavassa kehitysvaiheessa.

30. Kaikki poikasten myrkytysoireet olisi kirjattava mukaan lukien oireiden alkamispäivä, vuorokaudenaika, voimakkuus ja kesto.

Fyysiset ja kehitystä koskevat tuntomerkit

31. Muutokset vieroitusta edeltävissä kehitystä koskevissa tuntomerkeissä (esim. korvalehden avautuminen, silmien avautuminen, etuhampaan puhkeaminen) korreloivat merkittävästi ruumiinpainon kanssa (30)(31). Ruumiinpaino voi olla fyysisen kehityksen paras indikaattori. Kehitystä koskevien tuntomerkkien määrittäminen on tämän vuoksi suositeltavaa ainoastaan, kun on ennalta näyttöä, että näillä tuloksilla tarjotaan lisätietoja. Näiden parametrien arvioinnin ajoitus esitetään taulukossa 1. Oletetuista vaikutuksista ja ensimmäisten määritysten tuloksista riippuen voi olla suositeltavaa lisätä muita ajankohtia tai tehdä määrityksiä muissa kehitysvaiheissa.

▼M5

32. Fyysisen kehityksen arvioinnissa on suositeltavaa käyttää syntymän jälkeisen iän sijasta yhdynnän jälkeistä ikää (33). Jos poikasia testataan vieroituspäivänä, on suositeltavaa, että testi tehdään ennen varsinaista vieroitusta, jotta vältetään vieroitukseen liittyvän stressin aiheuttama häiritsevä vaikutus. Lisäksi mitään vieroituksen jälkeistä poikasten testiä ei pitäisi suorittaa vieroituksen jälkeisen kahden päivän aikana.

Taulukko 1

Fyysisten ja kehitystä koskevien tuntomerkkien sekä toiminnallisten ja käyttäytymistä mittaavien tulostapahtumien arvioinnin ajoittaminen ([a])

Ikäväli / Päätetapahtumat	Ennen vieroitusta ([b])	Kasvuiässä ([b])	Nuoret täysikasvuiset ([b])
Fyysiset ja kehitystä koskevat tuntomerkit			
Ruumiinpaino ja kliiniset havainnot	viikoittain ([c])	vähintään kahden viikon välein	vähintään kahden viikon välein
Aivojen paino	SJP 22 ([d])		lopettamisen yhteydessä
Neuropatologia	SJP 22 ([d])		lopettamisen yhteydessä
Sukukypsyys	—	tarvittaessa	—
Muut kehitystä koskevat tunnusmerkit ([e])	tarvittaessa	—	—
Toiminnalliset ja käyttäytymistä mittaavat tulostapahtumat			
Käytöksen kehitys	ainakin kaksi määritystä		
Motorinen aktiviteetti (mukaan lukien tottuminen)	1–3 kertaa ([f])	—	kerran
Motorinen ja aistien toiminta	—	kerran	kerran
Oppiminen ja muisti	—	kerran	kerran

([a]) Tähän taulukkoon sisältyvät vähimmäismäärät niistä kerroista, kun määritys olisi suoritettava. Oletetuista vaikutuksista ja ensimmäisten määritysten tuloksista riippuen voi olla suositeltavaa lisätä muita ajankohtia (esim. ikääntyneet eläimet) tai tehdä määrityksiä muissa kehitysvaiheissa.

([b]) On suositeltavaa, ettei poikasia testata vieroituksen jälkeisen kahden päivän aikana (ks. 32 kohta). Kasvuiässä olevien eläinten testien ikäsuositukset ovat: oppiminen ja muisti = SJP 25 ± 2; motorinen ja aistien toiminta = SJP 25 ± 2. Nuorten täysikasvuisten eläinten suositusikä on SJP 60–70.

([c]) Ruumiinpaino olisi mitattava ainakin kahdesti viikossa, kun poikaset saavat annokset suoraan, ja annoksia mukautetaan ajankohdalla, jolloin painonnousu on nopeaa.

([d]) Aivojen painoa ja neuropatologiaa voidaan arvioida tarvittaessa aiemmin (esim. SJP 11) (ks. 39 kohta).

([e]) Ruumiinpainon lisäksi muut kehitystä koskevat tunnusmerkit (esim. silmien avautuminen) olisi tarvittaessa kirjattava (ks. 31 kohta).

([f]) Ks. 35 kohta.

33. Elävät poikaset lasketaan ja niiden sukupuoli määritetään esim. silmämääräisesti tai mittaamalla peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys (34)(35). Poikueen kukin poikanen olisi punnittava erikseen syntymähetkellä tai pian sen jälkeen ainakin viikoittain koko imetyksen ajan vähintään kerran kahdessa viikossa sen jälkeen. Kun sukukypsyyttä arvioidaan, eläimen ikä ja ruumiinpaino olisi määriteltävä emättimen avautuessa (36) tai esinahan erotessa terskasta (37) ainakin yhdestä uros- ja naarapuolisesta eläimestä poikuetta kohti.

▼M5

Käytöksen kehitys

34. Valikoitujen käyttäytymistapojen kehittyminen määritellään ainakin yhden poikasen/sukupuolen/poikueen osalta asianmukaisen ikävälin aikana, ja samoja poikasia käytetään kaikkina testipäivinä kustakin arvioinnin kohteena olevasta käyttäytymistavasta. Mittauspäivät jaetaan tasaisesti kyseiselle ajanjaksolle. Tällä tavoin määritellään kyseisen käyttäytymistavan kehityksen normaalit tai käsittelyyn liittyvät muutokset (38). Seuraavat ovat esimerkkejä käytöstavoista, joiden kehittymistä voitaisiin arvioida: oikaisurefleksi, ylöspäin suuntautuva liike ja motorinen aktiviteetti (38)(39)(40).

Motorinen aktiviteetti

35. Motorista aktiviteettia olisi seurattava (41)(42)(43)(44)(45) vieroitusta edeltävällä ajanjaksolla ja täysikasvuisen iässä. Kun testi suoritetaan vieroituksen aikana, ks. 32 kohta. Testin olisi kestettävä riittävän pitkään, jotta voidaan osoittaa testijakson sisäinen sopeutuminen, kun kyseessä ovat altistamattomat kontrollit. Motorisen aktiviteetin käyttö käytöksen kehityksen arviointia varten on erittäin suositeltavaa. Jos sitä käytetään käytöksen kehityksen testaamiseen, testissä käytetään samoja eläimiä kaikkien vierotusta edeltävien testijaksojen osalta. Testejä pitäisi suorittaa tarpeeksi usein testijakson sisäisen sopeutumiskehityksen arviointia varten (44). Tämä saattaa edellyttää kolmea tai useampaa ajankohtaa vieroituspäivään mennessä ja se mukaan lukien (esim. SJP 13, 17, 21). Samojen eläinten tai saman poikueen eläinten testi olisi suoritettava myös täysikasvuisilla lähellä tutkimuksen päättymisajankohtaa (esim. SJP 60–70). Tutkimuksia lisäpäivinä voidaan suorittaa tarpeen mukaan. Motorista toimintaa olisi valvottava toimintaa mitattavalla automaattilaitteella, jolla voidaan selvittää toiminnan vähentyminen ja lisääntyminen (eli laitteen mittaaman lähtötilanteen ei pitäisi olla niin alhainen, että toiminnan vähentymisen havaitseminen estetään, eikä niin suuri, että estetään toiminnan lisääntymisen havaitseminen). Kutakin laitetta olisi testattava vakiomuotoisilla menettelyillä, jotta toiminnan luotettavuus varmistetaan mahdollisuuksien mukaan laitteiden ja tutkimuspäivien osalta. Testiryhmiä olisi tasapainotettava mahdollisuuksien mukaan laitteisiin nähden. Kukin eläin olisi testattava erikseen. Testiryhmiä olisi tasapainotettava testiajankohtiin nähden, jotta vältetään häiritsemästä toiminnan vuorokausirytmiä. Olisi pyrittävä varmistamaan, että testiolosuhteiden muutokset ovat mahdollisimman vähäiset ja että ne eivät liity järjestelmällisesti käsittelyyn. Muuttujat, jotka voivat vaikuttaa moniin käyttäytymistä, myös motorista aktiviteettia, koskeviin määrityksiin, ovat äänitaso, testihäkin koko ja muoto, lämpötila, suhteellinen kosteus, valaistusolosuhteet, hajut, kotihäkin tai uuden testihäkin käyttö ja ympäristön häiriötekijät.

Motorinen ja aistien toiminta

36. Motorista ja aistien toimintaa olisi tarkasteltava yksityiskohtaisesti ainakin kerran, kun eläin on kasvuiässä ja kerran, kun se on nuori täysikasvuinen eläin (esim. SJP 60–70). Jos testi suoritetaan vieroitusaikana, ks. 32 kohta. Olisi suoritettava riittävä testi, jotta sensorisesta toiminnasta (esim. somatosensorinen, vestibulaarinen) ja motorisesta toiminnasta (esim. voimakkuus, koordinaatio) varmistetaan riittävä määrällinen näytteenotto. Muutamia esimerkkejä motorisesta ja aistien toiminnasta ovat ojentajalihaksen työntövoimarefleksi (46), suoristusrefleksi (47)(48), akustinen säpsähdysvaste (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) ja herätepotentiaalit (55).

▼M5

Oppimisen ja muistin testaaminen

37. Assosiatiivista oppimista ja muistia koskeva testi olisi suoritettava vieroituksen jälkeen (esim. 25 ± 2 päivää) ja nuorilla täysikasvuisilla eläimillä (SJP 60 ja vanhempi). Kun testi suoritetaan vieroituksen aikana, ks. 32 kohta. Samaa tai eri testiä (testejä) voidaan käyttää näissä kahdessa kehitysvaiheessa. Vastavieroitettujen ja täysikasvuisten rottien oppimista ja muistia koskevien testien valinnan osalta sallitaan jonkin verran joustavuutta. Testit olisi kuitenkin suunniteltava siten, että täytetään kaksi kriteeriä. Ensinnäkin oppimista olisi arvioitava joko usean toistetun oppimista mittaavaan kokeen tai jakson kuluessa tapahtuneena muutoksena tai yhdestä kokeesta muodostuvissa testeissä, kun kyseessä on olosuhde, joka ohjaa oppimisen ei-assosiatiivisia vaikutuksia. Toiseksi testiin (testeihin) pitäisi sisältyä jonkinlainen (lyhytaikaisen tai pitkäaikaisen) muistin mittaaminen alkuperäisen oppimisen (oppimistuloksen) lisäksi, mutta muistin mittaamista ei voida raportoida, jos samasta testistä saadut oppimistuloksen mittaamistoimet puuttuvat. Jos oppimista ja muistia koskeva yksi tai useampi testi osoittaa testikemikaalin vaikutuksen, voidaan harkita täydentäviä testejä, joilla suljetaan pois sensoristen, motivationaalisten ja/tai motoristen valmiuksien muutoksiin perustuvat vaihtoehtoiset tulkinnat. Edellisen kahden kriteerin lisäksi suositellaan, että oppimista ja muistia mittaava testi valitaan sen perusteella, miten sen herkkyys osoitetaan tarkasteltavan kemikaalin luokan perusteella, jos tällaisia tietoja on saatavilla lähteissä. Jos tietoja ei ole, seuraavassa on esimerkkejä testeistä, joita voidaan tehdä edellä mainittujen kriteerien täyttämiseksi: passiivinen välttäminen (43)(56)(57), viivästynyt asettuminen asentoon (delayed-matching-to-position), kun kyseessä ovat täysikasvuiset rotat (58) ja kun kyseessä on imeväisikäinen rotta (59), hajuihin totuttaminen (43)(60), Morrisin vesisokkelo (61)(62)(63), Bielin tai Cincinnatin sokkelo (64)(65), säteittäinen sokkelo (66), T-sokkelo (43) ja aikataululla valvotun käytöksen omaksuminen ja säilyttäminen (26)(67)(68). Täydentäviä testejä kuvataan vastavieroitettuja (26)(27) ja täysikasvuisia rottia (19)(20) koskevissa lähteissä.

Post mortem -tutkimus

38. Emot voidaan lopettaa poikasten vieroituksen jälkeen.

39. Poikasten neuropatologinen arviointi suoritetaan käyttäen kudoksia, jotka ovat peräisin eläimiltä, jotka lopetetaan inhimillisesti syntymän jälkeisenä päivänä 22 tai aikaisemmin syntymän jälkeisenä päivänä 11–22 taikka tutkimuksen loppuvaiheessa. SJP 22:een mennessä lopetettujen poikasten aivokudoksia olisi arvioitava; testin loppuvaiheessa lopetettujen eläinten keskushermoston kudoksia ja ääreishermoston kudoksia olisi arvioitava. SJP 22:een mennessä lopetettujen eläinten näytteet voidaan fiksoida upottamistai perfuusiotekniikalla. Tutkimuksen loppuvaiheessa lopetettujen eläinten näytteet olisi fiksoitava perfuusion avulla. Kaikissa kudosnäytteiden fiksointia koskevissa toimenpiteissä eläinten perfuusiosta kudosnäytteiden dissektioon, kudosten käsittelyyn ja objektilasien värjäykseen olisi käytettävä sellaista tasapainottavaa mallia, että jokaiseen erään sisältyy edustavia näytteitä kustakin annosryhmästä. Lisäohjeita neuropatologiasta sisältyy OECD:n ohjeasiakirjaan 20 (9), ks. myös (103).

Kudosnäytteiden käsittely

40. Kaikki ruumiinavauksessa paljain silmin havaittavat poikkeavuudet on kirjattava. Otettujen kudosnäytteiden on katettava kaikki keskeiset hermoston alueet. Kudosnäytteet olisi säilytettävä sopivassa kiinnitysaineessa ja niitä olisi käsiteltävä julkaistujen standardimuotoisten histologisten menettelyjen mukaisesti (69)(70)(71)(103). Parafiinivalun käyttö on hyväksyttävää keskushermoston kudoksien ja ääreishermoston kudoksien osalta, mutta osmiumin käyttö fiksoinnin jälkeen yhdessä epoksivalun kanssa voi olla asianmukaista, kun tarvitaan suurempaa resoluutiota (esim. ääreishermoja varten,

▼M5

kun epäillään perifeeristä neuropatiaa, ja/tai ääreishermojen morfometrista analyysia varten). Morfometrista analyysia varten kerätty aivokudos olisi valettava sopivaan aineeseen kaikilla annostasoilla samaan aikaan. Näin vältetään kutistuneet artefaktit, jotka voivat liittyä pitkäaikaiseen säilytykseen fiksatiivissa (6).

Neuropatologinen tutkimus

41. Kvalitatiivisen tutkimuksen tavoitteena on:

i) täsmentää hermoston alueet, joilla esiintyy todisteita neuropatologisista muutoksista,

ii) täsmentää testiaineelle altistumisesta johtuvien neuropatologisten muutosten tyypit, ja

iii) määrittää neuropatologisten muutosten vakavuus.

Asianmukaisesti koulutettu patologi tutkii kudosnäytteistä otettuja edustavia histologisia leikkeitä mikroskoopilla neuropatologisia muutoksia koskevista todisteista. Kaikille neuropatologisille muutoksille olisi annettava yksilöllinen luokka, joka osoittaa muutoksen vakavuuden. Hekatoksyliini ja eosiiniväri voi olla riittävä inhimillisesti lopetettujen eläinten aivojen leikkeiden arviointia varten syntymän jälkeisenä päivänä 22 tai sitä ennen. Tutkimuksen loppuvaiheessa lopetettujen eläinten keskushermoston ja ääreishermoston kudosten leikkeille suositellaan kuitenkin myeliinivärjäystä (esim. luxol fast blue/cresyl violet) ja hopeavärjäystä (kuten Bielschowskyn tai Bodianin värjäys). Patologin ammatillisen harkinnan ja havaittujen muutosten tyypin perusteella muunlaisia värjäystekniikoita voidaan pitää asianmukaisena tietyntyyppisten muutosten tunnistamiseksi ja kuvaamiseksi (kuten GFAP-värjäys (gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini) tai lektiinihistokemia gliaalisten ja mikrogliaalisten muutosten arvioimiseksi (72), fluoro-jade -liuoksella värjääminen nekroosin havaitsemiseksi (73)(74), tai hermosolujen rappeutumiselle spesifiset hopeavärjäykset (75)).

42. Morfometrinen (kvantitatiivinen) arviointi olisi suoritettava, koska näillä tiedoilla voidaan auttaa havaitsemaan testeihin liittyvä vaikutus ja koska ne ovat hyödyllisiä tulkittaessa testeihin liittyviä aivojen painoa koskevia tai morfologisia muutoksia (76)(77). Hermokudoksesta olisi otettava näyte ja se olisi preparoitava morfometrista arviointia varten. Morfometrisiin arviointeihin voi sisältyä esim. aivojen tiettyjen alueiden lineaarinen tai areaalinen mittaaminen (78). Lineaarisiin tai areaalisiin mittauksiin on käytettävä homologisia leikkeitä, jotka on valittu tarkasti luotettavien mikroskooppisten tuntomerkkien perusteella (6). Stereologiaa voidaan käyttää täsmentämään käsittelyyn liittyvät vaikutukset, jotka kohdistuvat parametreihin, kuten erityisten neuroanatomisten alueiden volyymi tai solumäärä (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Aivot olisi tutkittava, jotta todisteet käsittelyyn liittyvistä neuropatologista muutoksista havaitaan, ja kaikista aivojen tärkeimmistä alueista (kuten hajukäämit, aivokuori, hippokampus, tyvitumakkeet, talamus, hypotalamus, keskiaivot (keskiaivojen katto, keskiaivojen peite ja pikkuaivovarret), aivosilta, ydinjatke, pikkuaivot) olisi otettava riittävät näytteet. Näin varmistetaan perusteellinen tutkimus. On tärkeää, että kaikkien eläinten leikkeet otetaan samasta tasosta. Tutkimuksen lopussa inhimillisesti lopetetuilta täysikasvuisilta eläimiltä olisi otettava näytteeksi selkäytimen ja ääreishermoston edustavat leikkeet. Tarkasteltaviin alueisiin olisi kuuluttava silmä, näköhermo ja verkkokalvo mukaan lukien, selkäydin kaularangan ja lannerangan kohdalta, taka- ja etujuuren hermosäikeet, proksimaalinen lonkkahermo, proksimaalinen säärihermo (polven kohdalta) ja säärihermon puoleiset pohjelihaksen haarat. Selkäytimestä ja ääreishermostosta on tehtävä poikittais- ja pitkittäisleikkeet.

▼M5

44. Neuropatologisessa arvioinnissa tarkastellaan, onko hermostolle aiheutuneista kehityshäiriöistä viitteitä (6)(85)(86)(87)(88)(89) solumuutoksien (esim. hermosolujen vakuolisaatio, rappeuma, kuolio) ja kudosmuutoksien (esim. glioosi, leukosyyttien infiltraatio, kystien muodostuminen) lisäksi. Tältä osin on tärkeää, että käsittelyyn liittyvät vaikutukset erotetaan normaalista kehityksestä, jonka tiedetään tapahtuvan lopetusajankohtaa vastaavassa kehitysvaiheessa (90). Esimerkkeihin merkittävistä muutoksista, jotka viittaavat kehitysvaurioihin, sisältyvät mutta eivät pelkästään:

— hajukäämien, aivojen tai pikkuaivojen kokonaiskoon tai muodon muutokset

— aivojen eri alueiden suhteellisen koon muutokset, mukaan lukien alueiden koon pienentyminen tai suurentuminen, joka aiheutuu normaalisti tilapäisten solupopulaatioiden menettämisestä tai pysyvyydestä taikka aksonaalisesta kuljetuksesta (esim. pikkuaivojen ulompi jyvässolukerros, aivokurkiainen)

— muutokset solun jakaantumisessa, liikkumisessa ja erilaistumisessa, mitä osoittavat liiallinen apoptoosi tai kuolio, klusterit tai hajallaan olevat populaatiot ektooppisia, disorientoituneita tai epämuodostuneita neuroneja, taikka muutokset aivokuoren rakenteiden eri kerrosten suhteellisessa koossa

— hermosolujen myeliinin kehittymisen muutokset mukaan lukien yleinen koon pienentyminen tai myelinoitujen rakenteiden muuttunut värjäys

— todisteet vesipäästä, erityisesti aivokammion laajentuminen, aivonesteviemärin ahtauma ja aivopuoliskojen ohentuminen.

Neuropatologisten muutosten annosvasteiden suhteen analyysi

45. Seuraavaa asteittaista menetelmää suositellaan kvalitatiivisia ja kvantitatiivisia neuropatologisia analyysejä varten. Ensinnäkin korkean annostason ryhmästä otettuja leikkeitä verrataan kontrolliryhmän leikkeisiin. Jos korkean annostason eläinten ryhmässä ei havaita neuropatologisia muutoksia, myöhempää analyysiä ei tarvita. Jos korkean annoksen ryhmässä havaitaan neuropatologisia muutoksia, keskisuuren ja pienen annoksen ryhmän eläimet tutkitaan. Jos korkean annoksen ryhmä tulee päätekohtaan kuoleman tai muun häiritsevän toksisuuden vuoksi, korkean annoksen ja keskisuuren annoksen ryhmiä olisi analysoitava neuropatologisista muutoksista. Jos pienemmän annoksen ryhmissä havaitaan neurotoksisuutta, niissä olisi tehtävä neuropatologinen analyysi. Jos käsittelyyn liittyviä neuropatologisia muutoksia havaitaan kvalitatiivisessa tai kvantitatiivisessa tutkimuksessa, esiintyvyyden annosriippuvuus, vaurioiden tai morfometristen muutosten esiintyvyys ja vakavuus määritellään kaikista annosryhmistä peräisin olevien eläinten arvioinnin perusteella. Kaikki alueet aivoissa, joissa havaitaan todisteita neuropatologisista muutoksista, olisi sisällytettävä tähän arviointiin. Jokaisen vauriotyypin osalta kunkin vakavuusasteen määrittelyyn käytetyt ominaispiirteet olisi määriteltävä, ja niissä olisi ilmoitettava yksityiskohdat, joita käytetään kunkin luokan erottamiseen. Kunkin vauriotyypin osalta sen yleisyys ja vakavuusaste olisi kirjattava ja olisi tehtävä tilastollinen analyysi annos-vastesuhteen luonteen arvioimiseksi. Koodattujen objektilasien käyttöä suositellaan (91).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

46. Tiedot olisi ilmoitettava erikseen ja esitettävä taulukkomuodossa, josta ilmenevät kunkin testiryhmän osalta muutostyypit, emojen ja poikasten määrä sukupuolittain sekä poikueiden määrä kutakin muutosta kohti. Jos poikasten syntymän jälkeinen suora altistaminen on suoritettu, olisi ilmoitettava altistusreitti, kesto ja altistusajankohta.

▼M5

Tulosten arviointi ja tulkinta

47. Tutkimuksessa hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksista tarjotaan tietoja toistuvasta altistumisesta kemikaalille kohdussa ja vastasyntyneen kehitysvaiheessa. Koska tutkimuksessa painotetaan yleisten ja hermostonkehitykseen vaikuttavien myrkyllisyysvaikutusten päätetapahtumia, tutkimustulosten perusteella voidaan jossain määrin erotella toisaalta ne hermoston kehitykseen kohdistuvat vaikutukset, joiden osalta emoilla ei ilmene myrkyllisyysvaikutuksia, sekä toisaalta ne vaikutukset, jotka ilmenevät ainoastaan tasoilla, jotka ovat myrkyllisiä myös emoille. Tutkimussuunnitelman, tilastoanalyysin ja tietojen biologisen merkitsevyyden välisten monimutkaisten yhteyksien vuoksi asiantuntijan on tulkittava asianmukaisesti tietoja hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksista (107)(109). Testitulosten tulkintaan olisi käytettävä painoarvoanalyysiä (20)(92)(93)(94). Käytöstä koskevia tai morfologisia löydöksiä, jos niitä on, sekä annosvasteita koskevaa näyttöä olisi käsiteltävä. Tähän olisi sisällyttävä tiedot kaikista tutkimuksista, jotka koskevat hermostonkehitykseen vaikuttavia myrkyllisyysvaikutuksia, mukaan lukien ihmisen epidemiologiset tutkimukset tai tapausselostukset ja eläimillä tehdyt kokeet (esim. toksikokineettiset tiedot, rakenne-aktiivisuustiedot, tiedot muista toksisuustutkimuksista). Tähän sisältyy testikemikaalin annosten välinen suhde ja kaikkien neurotoksisten vaikutusten olemassaolo tai puuttuminen, esiintyvyys ja laajuus kummankin sukupuolen osalta (20)(95).

48. Tietojen arviointiin pitäisi sisältyä pohdinta biologisesta ja tilastollisesta merkittävyydestä. Tilastoanalyysiä olisi pidettävä välineenä, joka ohjaa tietojen tulkintaa sen sijaan, että se määrittää sitä. Tilastollisen merkittävyyden puute ei saisi olla ainoa peruste päätelmälle siitä, että altistusvaikutus puuttuu, ja tilastollinen merkittävyys ei saisi olla ainoa peruste tehdä päätelmä altistusvaikutuksesta. Jotta mahdollisia vääriä negatiivisia havaintoja ei esitettäisi ja negatiivisilla kontrolleilla saatujen tulosten todistamiseen liittyvät hankaluudet vältettäisiin, olisi käsiteltävä käytettävissä olevia positiivisia ja aikaisempia kontrollitutkimuksien tietoja erityisesti, jos mitään altistukseen liittyviä vaikutuksia ei esiinny (102)(106). Väärien positiivisten löydöksien mahdollisuutta olisi pohdittava tietojen kaikkien tilastollisten arvioiden pohjalta (96). Arviointiin pitäisi sisältyä havaittujen neuropatologisten ja käyttäytymiseen liittyvien muutosten välinen mahdollinen suhde.

49. Kaikkia tuloksia olisi analysoitava käyttämällä koesuunnittelun kannalta asianmukaisimpia tilastollisia malleja (108). Parametrisen tai ei-parametrisen analyysin valintaa olisi perusteltava ottaen huomioon esimerkiksi tietojen laatu (onko niitä muunneltu) ja niiden jakelu sekä valitun tilastoanalyysin suhteellinen luotettavuus. Tutkimuksen tarkoituksen ja suunnittelun pitäisi ohjata tilastoanalyysien valintaa tyypin I (väärä positiivinen) ja tyypin II (väärä negatiivinen) virheiden vähimmäistämiseksi (96)(97)(104)(105). Hermostonkehitystä koskevissa tutkimuksissa, joissa käytetään useita poikasia kerrallaan synnyttäviä lajeja, joiden poikueesta testataan useita poikasia, poikue olisi sisällytettävä tilastolliseen malliin. Tarkoitus on välttää lisäämästä tyypin I virheiden määrää (98)(99)(100)(101). Tilastollisen mittayksikön pitäisi olla poikue, ei poikanen. Kokeet olisi suunniteltava siten, että samaan poikueeseen kuuluvia poikasia ei käsitellä erillisten havaintojen tavoin. Kaikkia päätetapahtumia, joita mitataan toistuvasti samalla kohteella, olisi analysoitava käyttämällä tilastollisia malleja, joissa otetaan huomioon, että kyseiset toimenpiteet eivät ole toisistaan riippuvaisia.

Tutkimusseloste

50. Tutkimusselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot, mukaan lukien lähde

▼M5

— valmisteen puhtaus ja tunnetut ja/tai oletetut epäpuhtaudet.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— perusteet kantaja-aineen valinnalle, jos se on muu kuin vesi tai fysiologinen keittosuolaliuos.

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji ja kanta sekä perustelu, jos se on muu kuin rotta

— koe-eläinten toimittaja

— eläinten lukumäärä, ikä testin alussa ja sukupuoli

— toimittaja, häkit, ravinto, vesi ja niin edelleen

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Testiolosuhteet:

— annostasojen valintaperusteet

— annostelureittiä ja ajankohtaa koskevat valintaperusteet

— selvitys annetuista annoksista, mukaan lukien selonteko kantaja-aineesta sekä annostellun aineen määrästä ja fysikaalisesta olomuodosta

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, saavutetusta pitoisuudesta, stabiiliudesta ja tasalaatuisuudesta

— emojen ja poikasten yksilölliseen tunnistamiseen käytetty menetelmä

— yksityiskohtainen kuvaus satunnaisottoa koskevasta menettelystä (menettelyistä), jota sovelletaan, kun emoja valitaan koeryhmiin, poikasia karsitaan ja ne jaetaan testiryhmiin

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin antotavasta

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun hengitysteiden altistukseen liittyvän testin testikemikaalin pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg/painokilo/vrk) tarvittaessa

— ympäristöolosuhteet

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden (esim. hanavesi, tislattu vesi) laadusta

— testin alku- ja päättymispäivä.

Havainnointi ja testausmenetelmät:

— yksityiskohtainen kuvaus menettelyistä, joita käytetään standardoimaan havainnot ja menettelyt sekä operatiiviset määritelmät pisteytykseen liittyville havainnoille

— luettelo kaikista käytetyistä testimenettelyistä ja perustelut niiden käytölle

— yksityiskohtaiset tiedot sovelletuista käyttäytymiseen/toimintaan liittyvistä, patologisista, neurokemiallisista ja sähköfysiologisista menettelyistä mukaan lukien yksityiskohtaiset tiedot automaattilaitteista

— laitteiden kalibrointia ja niiden vastaavuuden varmistamista koskevat menetelmät sekä koeryhmien tasapainottaminen testausmenettelyissä

— lyhyt perustelu, jossa selvitetään päätöksiä, joihin liittyy asiantuntija-arvio.

▼M5

Tulokset (yksittäiset ja yhteenveto, mukaan lukien tarvittaessa keskiarvo ja varianssi):

— eläinten lukumäärä tutkimuksen alussa ja tutkimuksen lopussa

— kutakin testimenetelmää varten käytettyjen eläinten ja poikueiden määrä

— kunkin eläimen tunnistenumero ja poikue, josta se on peräisin

— poikueen koko ja keskimääräinen syntymäpaino sukupuolittain eroteltuna

— ruumiinpainoa ja sen muutoksia koskevat tiedot, mukaan lukien emon ja poikasten ruumiinpaino lopetettaessa

— ravinnon ja tarvittaessa veden kulutus (esim. jos testikemikaalia annostellaan veden kautta)

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason perusteella, mukaan lukien toksisuusoireet tai kuolleisuus, ja tarvittaessa kuolinaika ja -syy

— yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste, kesto, oireiden alku, ajankohta ja myöhempi kehitys

— kunkin kehitystä koskevan päätetapahtuman tilanne (paino, sukukypsyys ja käytöksen kehitys) kunakin havainnointiaikana

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista hermostoperäisiin käyttäytymisoireisiin liittyvistä, toiminnallisista, neuropatologisista, neurokemiallista tai sähköfysiologisista löydöksistä sukupuolen perusteella, mukaan lukien niiden lisääntyminen ja vähentyminen kontrollitietojen perusteella

— ruumiinavauslöydökset

— aivojen paino

— havainnot hermostollisista oireista tai vaurioista mukaan lukien luonnollisesti esiintyvät sairaudet tai tilat

— kuvat esimerkkilöydöksistä

— morfometriassa käytettyjen leikkeiden homologian arviointiin käytetyt vähän tehoa kuluttavat kuvat

— tiedot absorboitumisesta ja metaboloitumisesta, mukaan lukien täydentävät tiedot erillisestä toksikokineettisestä tutkimuksesta, mikäli saatavissa

— tulosten tilastollinen käsittely, mukaan lukien tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset mallit ja tulokset riippumatta siitä, olivatko ne merkittävät

— luettelo tutkimushenkilöstöstä, mukaan lukien ammatillinen koulutus.

Tulosten tarkastelu:

— annos-vaste-tulokset sukupuolen ja ryhmän mukaan

— kaikkien muiden myrkyllisyysvaikutusten suhde testikemikaalin mahdollisesta neurotoksisuudesta tehtyihin johtopäätöksiin sukupuolen ja ryhmän perusteella

— toksikokineettisten tietojen vaikutus päätelmiin

— vaikutukset, jotka ovat samankaltaisia tunnettujen neurotoksisten aineiden kanssa

▼M5

— testimenettelyn luotettavuutta ja herkkyyttä tukevat tiedot (kuten positiiviset ja aikaisemmat kontrollitiedot)

— mahdolliset suhteet neuropatologisten ja toiminnallisten vaikutusten välillä

— haitaton tai vertailukohtana oleva annos emoille ja poikasille sukupuolen ja ryhmän perusteella.

Päätelmät:

— pohdinta tietojen yleisestä tulkinnasta tulosten perusteella, mukaan lukien johtopäätös siitä, aiheuttiko testikemikaali hermostonkehitykseen vaikuttavia myrkyllisyysvaikutuksia, ja haitattomasta vaikutustasosta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79–91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101–111.

(6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93–100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Saatavilla sivustolla: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Saatavilla sivustolla: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173–292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼**M5**

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188–197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Tämän liitteen B.34 luku ”Myrkkyjen vaikutus lisääntymiskykyyn (yhden sukupolven testi)”.

(15) Tämän liitteen B.35 luku ”Kaksi sukupolvea käsittävä lisääntymiskykyyn kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimus”.

(16) Tämän liitteen B.43 luku ”Neurotoksisuustutkimus jyrsijöillä”.

(17) Tämän liitteen B.31 luku ”Prenataalisen kehityksen aikaisten myrkyllisyysvaikutusten tutkimus”.

(18) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33).

(19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Available: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Saatavilla: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499–509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2–6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110–112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118–136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87–94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1–4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433–439.

▼M5

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449–457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383–390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350–365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579–586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298–303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489–95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896–920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, s. 67–100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53–66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, s. 37–82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117–129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247–260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599–609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405–411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661–669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589–591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, s. 287–351

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107–128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *TARGET Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, s. 181–211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199–211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25–30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *TARGET Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. s. 125–145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321–332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247–296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237–244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98–105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465–479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47–60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29–69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60–90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235–241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387–399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327–332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342–352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122–131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84–107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼**M5**

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291–304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123–130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365–372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545–561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745–755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417–432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305–310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262–268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707–710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51–61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113–121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294–298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, s. 3–41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70–74.

▼M5

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127–133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401–405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology.* Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113–126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21–27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329–335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165–172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221–228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587–90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345–352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296–313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205–210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295–301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266–287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288–325.

▼**M5**

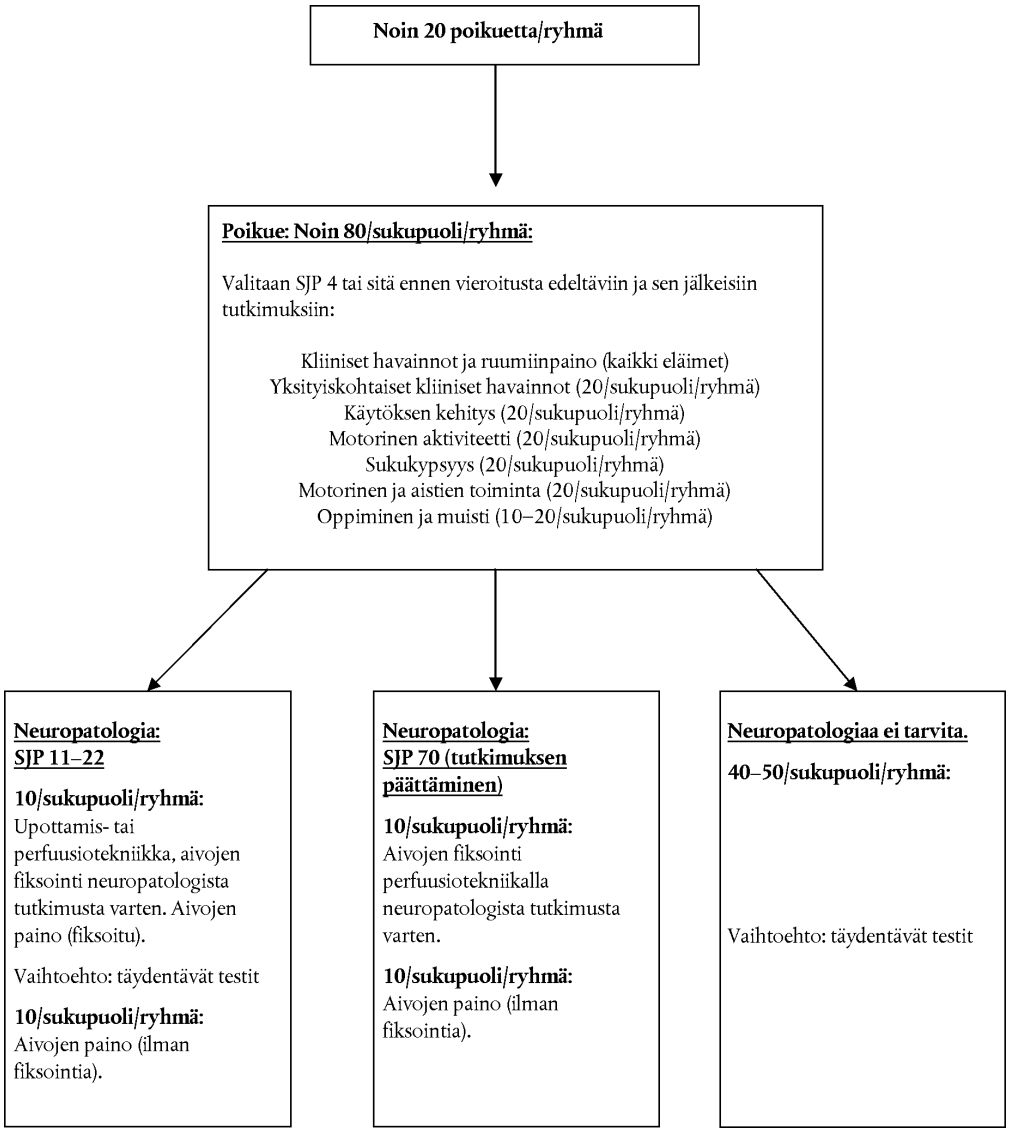
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326–348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349–381.

▼M5

Kuva 1

Toimintaan/käyttäytymisoireisiin liittyviä testejä, neuropatologista arviointia ja aivojen painoa koskeva yleinen testausjärjestelmä. Tämä kaavio perustuu 13–15 kohdan kuvaukseen (SJP = syntymän jälkeinen päivä). Eläinten valintaa koskevia esimerkkejä annetaan liitteessä 1



▼M5

Lisäys 1

1. Esimerkkejä eläinten mahdollisista jakamistavoista kuvataan ja esitetään taulukossa jäljempänä. Näillä esimerkeillä kuvataan sitä, että koe-eläinten valinta eri testimalleihin voidaan toteuttaa eri tavoin.

Esimerkki 1

2. Yhtä ryhmää — 20 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään käytöksen kehitystä koskevaan vieroitusta edeltävään testiin. Näistä eläimistä 10 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) lopetetaan inhimillisesti syntymän jälkeisenä päivänä 22. Aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään histopatologisessa tutkimuksessa. Lisäksi aivojen painoja koskevat tiedot kerätään käyttämällä jäljelle jääneiden 10 uroksen ja 10 naaraan irrotettuja aivoja annostasoa kohti.

3. Toista ryhmää — 20 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään toimintaa/käyttäytymistä koskevaan vieroituksen jälkeiseen testiin (yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen, motorisen aktiviteetin, akustisen säpsähdysvasteen ja kognitiivisen toiminnan testaaminen kasvuikäisten eläinten osalta) ja sukukypsyysiän arviointiin. Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) nukutetaan ja fiksoidaan perfuusiotekniikalla tutkimuksen päätösvaiheessa (arviolta syntymän jälkeinen päivä 70). Uuden fiksaation *in situ* jälkeen aivot poistetaan ja käsitellään neuropatologisessa tutkimuksessa.

4. Nuorten täysikasvuisten eläinten (esim. syntymän jälkeinen päivä 60–70) kognitiivisen toiminnan testaukseen käytetään kolmatta ryhmää, jossa on 20 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti). Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) lopetetaan tutkimuksen päättyessä ja aivot poistetaan ja punnitaan.

5. Jäljelle jääneet 20 eläintä/sukupuoli/ryhmä varataan mahdollisia täydentäviä kokeita varten.

Taulukko 1

Poikasten määrä [a]		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
1	5	20 urosta + 20 naarasta	Käytöksen kehitys
		10 urosta + 10 naarasta	SJP 22 aivojen paino/neuropatologia/morfometria
		10 urosta + 10 naarasta	SJP 22 aivojen paino
2	6	20 urosta + 20 naarasta	Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen aktiviteetti
		20 urosta + 20 naarasta	Sukukypsyys
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen ja aistien toiminta
		20 urosta + 20 naarasta	Oppiminen ja muisti (SJP 25)
		10 urosta + 10 naarasta	Nuoren täysikasvuisen yksilön aivojen paino/neuropatologia/morfometria ~ SJP 70

▼M5

Poikasten määrä ([a])		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
3	7	20 urosta + 20 naarasta	Oppiminen ja muisti (nuoret täysikasvuiset eläimet)
		10 urosta + 10 naarasta	Nuorten täysikasvuisten eläinten aivojen paino ~ SJP 70
4	8	—	Varalla olevat eläimet poikasten korvaamista tai täydentäviä kokeita varten

([a]) Tässä esimerkissä poikueet karsitaan 4 urokseen + 4 naaraaseen; urospuoliset poikaset numeroidaan yhdestä neljään ja naaraspuoliset poikaset viidestä kahdeksaan.

Esimerkki 2

6. Yhtä ryhmää — 20 poikasta/sukupuoli/annostasoa (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään käytöksen kehitystä koskevaan vieroitusta edeltävään testiin. Näistä eläimistä 10 pentua/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai yksi naaras poikuetta kohti) lopetetaan inhimillisesti syntymän jälkeisenä päivänä 11. Aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään histopatologisessa tutkimuksessa.

7. Toista ryhmää — 20 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään vieroituksen jälkeisiin testeihin (yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen, motorisen aktiviteetin ja sukukypsyysiän sekä motorisen ja aistien toiminnan arviointi). Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai yksi naaras poikuetta kohti) nukutetaan ja fiksoidaan perfuusiotekniikalla tutkimuksen päätösvaiheessa (arviolta syntymän jälkeinen päivä 70). Uuden fiksaation *in situ* jälkeen aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään neuropatologisessa tutkimuksessa.

8. Kasvuikäisten ja nuorten täysikasvuisten kognitiivisen toiminnan testaukseen käytetään 10 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai 1 naaras poikuetta kohti). Eri eläimiä käytetään, kun kognitiivista toimintaa testataan syntymisen jälkeisenä päivänä 23 ja nuorilla täysikasvuisilla eläimillä. Täysikasvuisena testatut 10 eläintä/sukupuoli/annostaso lopetetaan tutkimuksen päätösvaiheessa, niiden aivot poistetaan ja punnitaan.

9. Jäljelle jääneet 20 eläintä/sukupuoli/ryhmä, joita ei valittu kokeisiin, lopetetaan ja poistetaan vieroituksen yhteydessä.

Taulukko 2

Poikasten määrä ([a])		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
1	5	20 urosta + 20 naarasta	Käytöksen kehitys
		10 urosta + 10 naarasta	SJP 11 aivojen paino/neuropatologia/morfometria
2	6	20 urosta + 20 naarasta	Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen aktiviteetti
		20 urosta + 20 naarasta	Sukukypsyys
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen ja aistien toiminta
		10 urosta + 10 naarasta	Nuoren täysikasvuisen yksilön aivojen paino/neuropatologia/morfometria ~ SJP 70

▼M5

Poikasten määrä ([a])		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
3	7	10 urosta + 10 naarasta ([a])	Oppiminen ja muisti (SJP 23)
3	7	10 urosta + 10 naarasta ([b])	Oppiminen ja muisti (nuoret täysikasvuiset eläimet)
			Nuorten täysikasvuisten eläinten aivojen paino
4	8	—	Eläimet, jotka lopetetaan ja poistetaan syntymän jälkeisenä päivänä 21.

([a]) Tässä esimerkissä poikueet karsitaan 4 urokseen + 4 naaraaseen; urospuoliset poikaset numeroidaan yhdestä neljään ja naaraspuoliset poikaset viidestä kahdeksaan.

([b]) Eri poikasia käytetään kognitiiviseen testiin syntymän jälkeisenä päivänä 23 ja nuorten täysikasvuisten keskuudessa (esim. parilliset/parittomat poikueet yhteensä 20:sta).

Esimerkki 3

10. Yhtä ryhmää — 20 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään aivojen painon arviointiin ja neuropatologiseen arviointiin syntymän jälkeisenä päivänä 11. Näistä eläimistä 10 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai 1 naaras poikuetta kohti) lopetetaan inhimillisellä tavalla syntymän jälkeisenä päivänä 11 ja niiden aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään histopatologisessa tutkimuksessa. Lisäksi aivojen painoja koskevat tiedot kerätään käyttämällä jäljelle jääneiden 10 uroksen ja 10 naaraan irrotettuja aivoja annostasoa kohden.

11. Toista ryhmää — 20 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään käytöksen kehitystä (motorista aktiviteettia) koskeviin vieroituksen jälkeisiin kokeisiin (motorinen aktiviteetti ja sukukypsyysiän arviointi) sekä kasvuikäisten eläinten kognitiivisen toiminnan testaukseen.

12. Lisäksi toista ryhmää — 20 pentua/sukupuoli/annostasoa (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään motorista ja aistien toimintaa koskeviin kokeisiin (akustinen säpsähdysvaste) sekä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja varten. Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai yksi naaras poikuetta kohti) nukutetaan ja fiksoidaan perfuusiotekniikalla tutkimuksen päätösvaiheessa (arviolta syntymän jälkeinen päivä 70). Uuden fiksaation *in situ* jälkeen aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään neuropatologisessa tutkimuksessa.

13. Kasvuikäisten ja nuorten täysikasvuisten kognitiivisen toiminnan testaukseen käytetään 20 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti). Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai yksi naaras poikuetta kohti) lopetetaan tutkimuksen päättyessä ja niiden aivot poistetaan ja punnitaan.

Taulukko 3

Poikasten määrä ([a])		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
1	5	10 urosta + 10 naarasta	SJP 11 aivojen paino/neuropatologia/morfometria
		10 urosta + 10 naarasta	SJP 11 aivojen paino
2	6	20 urosta + 20 naarasta	Käytöksen kehitys (motorinen aktiviteetti)
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen aktiviteetti
		20 urosta + 20 naarasta	Sukukypsyys
		20 urosta + 20 naarasta	Oppiminen ja muisti (SJP 27)

▼**M5**

Poikasten määrä ([a])		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
3	7	20 urosta + 20 naarasta	Akustinen säpsähdysvaste (kasvuikäiset ja nuoret täysikasvuiset eläimet)
		20 urosta + 20 naarasta	Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot
		10 urosta + 10 naarasta	Nuorten täysikasvuisten eläinten aivojen paino/neuropatologia morfometria ~ SJP 70
4	8	20 urosta + 20 naarasta	Oppiminen ja muisti (nuoret täysikasvuiset eläimet)
		10 urosta + 10 naarasta	Nuorten täysikasvuisten eläinten aivojen paino

([a]) Tässä esimerkissä poikueet karsitaan 4 urokseen + 4 naaraaseen; urospuoliset poikaset numeroidaan yhdestä neljään ja naaraspuoliset poikaset viidestä kahdeksaan.

▼**M5**

Lisäys 2

Määritelmät

Kemikaali: aine tai seos

Testattava kemikaali: mikä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää

▼M5

B.54. **KOHTUUN AIHEUTUVIEN VAIKUTUKSIEN BIOTESTI JYRSIJÖILLÄ: LYHYTAIKAINEN SEULONTATESTI ESTROGEENISISTA OMINAISUUKSISTA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 440 (2007). OECD aloitti vuonna 1998 korkean prioriteetin toimenpiteet, jotta voimassa olevia ohjeita tarkistetaan ja kehitetään uusia, joilla mahdollisia hormonaalisia haitta-aiheita seulotaan ja testataan (1). Yksi toimenpide oli kehittää testiohje jyrsijöiden kohtuun aiheutuvia vaikutuksia koskevalle biotestille. Jyrsijöiden kohtuun aiheutuvia vaikutuksia koskevan biotestin osalta toteutettiin kattava validointiohjelma, johon sisältyi yksityiskohtaisten tausta-asiakirjojen kerääminen (2)(3) ja sellaisten laajojen laboratorioiden sisäisten ja niiden välisten tutkimusten teettäminen, joilla osoitettiin biotestin merkitys ja toistettavuus, kun kyseessä on tehokas referenssiestrogeeni, heikot estrogeenireseptorin agonistit, voimakas estrogeenireseptorin antagonisti ja negatiivinen vertailukemikaali (4)(5)(6)(7)(8)(9). Tämä testimenetelmä B.54 on tulos validointiohjelmassa saadusta kokemuksesta ja tuloksista, joita sen perusteella saatiin agonisteista, joilla on estrogeenisia ominaisuuksia.

2. Kohtuun aiheutuvia vaikutuksia koskeva biotesti on lyhytaikainen seulontatesti, joka kehitettiin 1930-luvulla (27)(28) ja jonka asiantuntijaryhmä standardoi ensimmäisen kerran seulontaa varten vuonna 1962 (32)(35). Se perustuu kohdun painon lisääntymiseen tai uterotrofiseen reaktioon (ks. yksityiskohtia varten (29)). Testissä arvioidaan kemikaalin kykyä käynnistää biologista toimintaa, joka on yhdenmukainen luonnollisten estrogeenien (esim. 17ß-estradioli) ominaisuuksia omaavien agonistien tai antagonistien kanssa. Sitä käytetään kuitenkin antagonistin havaitsemiseen paljon harvemmin kuin agonistin havaitsemiseen. Kohtu reagoi estrogeeneihin kahdella tavalla. Ensimmäinen vaste on painonnousu veden imeytymisen vuoksi. Tätä vastetta seuraa kudosten kasvusta aiheutuva painonnousu (30). Kohdun vasteet rotilla ja hiirillä ovat laadullisesti vertailukelpoiset.

3. Tämä biotesti on *in vivo* -seulontatesti ja sen soveltamista olisi tarkasteltava osana hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevaa OECD:n käsitekehystä (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (liite 2). Tässä käsitekehyksessä kohtuun aiheutuvia vaikutuksia mittaava biotesti sisältyy tasolle 3 *in vivo* -testinä, jolla tarjotaan tietoja yhdestä endokriinisesta mekanismista, estrogeenisesta toiminnasta.

4. Kohtuun aiheutuvia vaikutuksia koskevaan biotestiin on tarkoitus sisällyttää *in vitro*- ja *in vivo* -testiryhmä, joilla tunnistetaan sisäeritysjärjestelmään mahdollisesti vaikutuksia aiheuttavat kemikaalit. Viime kädessä tehdään ihmisten terveyttä tai ympäristöä koskevat riskinarvioinnit. OECD:n validointiohjelmassa käytetään vahvoja ja heikkoja estrogeenivaikutuksia omaavia agonisteja arvioimaan estrogeenisten kemikaalien tunnistamista koskevan testin tehokkuutta (4)(5)(6)(7)(8). Näin ollen testimenettelyn herkkyys estrogeenivaikutuksia omaaville agonisteille osoitettiin asianmukaisesti samoin kuin laboratorion sisäinen ja niiden välinen toistettavuus.

5. Negatiivisten kemikaalien osalta ainoastaan yksi ”negatiivinen” vertailukemikaali — joka jo todettiin negatiiviseksi kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa testissä sekä *in vitro* reseptorin sitoutumista koskevassa testissä ja reseptoritestissä — sisällytettiin validointiohjelmaan. Lisäksi on arvioitu muita testituloksia, jotka eivät liity OECD:n validointiohjelmaan, ja niillä tuetaan kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin spesifiyttä estrogeenivaikutuksia omaavien agonistien seulonnan suhteen (16).

▼**M5**

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

6. Estrogeenivaikutuksia omaavat agonistit ja antagonistit toimivat ligandeina estrogeenireseptoreille a ja b, ja ne voivat aktivoida tai estää reseptoreiden ohjaaman geenitranskription. Tämä voi mahdollisesti aiheuttaa terveydelle vaaroja, kuten lisääntymis- ja kehitysvaikutuksia. Tästä syystä on arvioitava ja analysoitava nopeasti, voiko kemikaali toimia mahdollisesti estrogeenivaikutuksia omaavana agonistina tai antagonistina. Ligandin sitoutuminen estrogeenireseptoriin tai reportterigeenien transkription aktivointi *in vitro* tarjoaa tietoja, mutta kyseessä on ainoastaan yksi monista tekijöistä, jotka voivat osoittaa mahdollisen vaaran. Muihin voivat sisältyä metaboloinnin aktivointi ja deaktivointi kehoon siirtymisen yhteydessä, kohdekudoksiin jakautuminen ja poistuminen kehosta riippuen ainakin osittain altistusreitistä ja testattavasta kemikaalista. Tämän vuoksi on seulottava kemikaalin mahdollinen vaikutus *in vivo* tiettyjen olosuhteiden perusteella, ellei kemikaalin absorptiota, jakautumista, aineenvaihduntaa ja erittymistä koskevilla ominaisuuksilla jo tarjoa asianmukaista tietoa. Kohdun kudokset reagoivat estrogeenistimulaatioon nopealla ja voimakkaalla kasvulla erityisesti niiden laboratoriojyrsijöiden osalta, joiden kiimakierto kestää noin neljä päivää. Jyrsijälajeja, erityisesti rottia, käytetään myös laajasti myrkyllisyystutkimuksissa vaaratekijöiden kuvaamista varten. Tästä syystä jyrsijän kohtu on tarkoituksenmukainen kohde-elin estrogeenivaikutuksia omaavien agonistien ja antagonistien *in vivo* -seulontaa varten.

7. Tämä testimenetelmä perustuu sellaisiin OECD:n validointitutkimuksessa käytettyihin menettelyihin, joiden on osoitettu olevan luotettavia ja toistettavia laboratorioiden sisäisissä ja niiden välisissä tutkimuksissa (5)(7). Tällä hetkellä on käytössä kaksi menettelyä: täysikasvuista naarasta, jolta on poistettu munasarjat (ovarektomia), koskeva menetelmä, jäljempänä ”ovx-täysikasvuista koskeva menetelmä”, ja keskenkasvuista naarasta, jolta ei ole poistettu munasarjoja, koskeva menetelmä, jäljempänä ”keskenkasvuista eläintä koskeva menetelmä”. OECD:n testin validointiohjelmassa osoitettiin, että molemman menetelmän herkkyys ja toistettavuus vastasivat toisiaan. Kuitenkin keskenkasvuista eläintä, koska sillä on koskematon HPG-akseli (eli hypotalamusta, aivolisäkettä ja sukupuolirauhasia koskeva akseli), koskeva menetelmä on vähemmän spesifinen. Se kattaa kuitenkin laajemman tutkimusalan kuin ovx-eläintä koskevassa tapauksessa, koska se voi reagoida HPG-akseliin vaikuttavien kemikaalien, eikä vain estrogeenireseptorin kanssa. Rotan HPG-akseli on toimintakykyinen noin 15 päivän iässä. Sitä ennen puberteettia ei voida nopeuttaa GnRH:n (gonadoliberiini) kaltaisilla käsittelyillä. Kun naaras tulee puberteetti-ikäiseksi ennen emättimen avautumista, sillä on useita kuukautiskiertoja, jotka eivät johda emättimen avautumiseen tai ovulaatioon, mutta jonkinlaisia hormonaalisia vaihteluita esiintyy. Jos kemikaali stimuloi HPG-akselia suoraan tai epäsuorasti, tästä aiheutuu ennenaikainen puberteetti, varhainen ovulaatio ja nopeutunut emättimen avautuminen. Tätä eivät aiheuta pelkästään HPG-akselilla toimivat kemikaalit. Tietyt ruokavaliot, joilla on muita korkeampi muuntokelpoinen energiataso, edistävät kasvua ja nopeuttavat emättimen avautumista ilman, että niillä on estrogeenivaikutuksia. Tällaisilla kemikaaleilla ei aiheutettaisi uterotrofista reaktiota ovx-täysikasvuisissa eläimissä, sillä niiden HPG-akseli ei toimi.

8. Eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä etusija olisi annettava menetelmälle, jossa käytetään keskenkasvuisia rottia, jossa vältetään eläinten kirurgista esikäsittelyä ja jossa vältetään myös käyttämästä eläimiä, joissa havaitaan näyttöä kiimakiertoon siirtymisestä (ks. 30 kohta).

▼M5

9. Uterotrofinen vaste ei aiheudu pelkästään estrogeeneistä, eli kemikaalit, jotka ovat muita kuin estrogeenivaikutuksia omaavia agonisteja tai antagonisteja, voivat myös aiheuttaa vasteen. Esimerkiksi suhteellisen suuret annokset progesteronia, testosteronia, tai useita synteettisiä progetiinejä voivat kaikki aiheuttaa vasteen (30). Kaikkia reaktioita voidaan myös analysoida histologisesti emättimen keratinisaation ja sarveistuman osalta (30). Vasteen mahdollisesta alkuperästä riippumatta kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin positiivisen tuloksen vuoksi olisi normaalisti suoritettava lisäselvityksiä. Estrogeenivaikutusta koskeva täydentävä näyttö voidaan saada *in vitro* -testeistä, kuten estrogeenireseptorin sitoutumistesteistä ja transkription aktivointia koskevista testeistä tai muista *in vivo* -testeistä, kuten naaraan puberteettia koskevasta testistä.

10. Kun otetaan huomioon, että kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevaa biotestiä voidaan käyttää *in vivo* -seulontatestinä, sovellettua validointimenetelmää voidaan hyödyntää eläinten hyvinvointiin liittyviä näkökohtia ja vaiheittaista testaamista koskevaa strategiaa varten. Tämän vuoksi pyrittiin validoimaan tarkasti estrogeenivaikutuksen osalta toistettavuus ja herkkyys — moniin kemikaaleihin liittyvä pääasiallinen huolenaihe –, mutta toimia toteutettiin vain vähän testin antiestrogeenivaikutusta koskevan komponentin osalta. Ainoastaan yhtä erittäin aktiivista antiestrogeenia testattiin, koska kemikaalien, joilla on selkeästi antiestrogeeninen profiili (joita ei häiritse vähäinen estrogeenin aktiivisuus), määrä on hyvin rajallinen. Näin ollen tämä testimenetelmä omistettiin estrogeenia koskevalle menettelylle, ja menettely, jossa kuvataan testin antagonista muotoa, sisällytettiin ohjeasiakirjaan (37). Pelkästään antiestrogeenisia kemikaaleja koskevan testin toistettavuus ja herkkyys määritellään selkeämmin myöhemmin sen jälkeen, kun tämä testimenettely on ollut rutiinikäytössä jonkin aikaa ja tällä toimintatavalla on tunnistettu enemmän kemikaaleja.

11. On pantava merkille, että kaikkien eläimiin perustuvien menettelyiden on täytettävä paikalliset eläinten hoitoa koskevat vaatimukset; jäljempänä esitetyt kuvaukset hoidosta ja käsittelystä ovat toimintaa koskevia vähimmäisvaatimuksia, ja ne korvataan paikallisilla säännöksillä, kuten tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetulla Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2010/63/EU (38). OECD antaa lisäohjeita eläinten inhimillisestä kohtelusta (25).

12. Kuten kaikissa testeissä, joissa käytetään eläviä eläimiä, ennen testin aloittamista on tärkeää varmistaa, että tiedot ovat todella tarpeen. Esimerkkinä mainitaan kaksi edellytystä, jolloin tietoja voidaan tarvita:

— korkea altistuspotentiaali (käsitekehyksen taso 1, liite 2) tai osoitukset estrogeenivaikutuksesta (taso 2), jolloin tutkitaan, voivatko tällaiset vaikutukset esiintyä *in vivo*

— estrogeenivaikutuksia osoittavat vaikutukset tason 4 tai 5 *in vivo* -testeissä sen perustelemiseksi, että vaikutukset liittyivät estrogeenin mekanismiin, jota ei voida selvittää *in vitro* -testiä käyttämällä.

13. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät esitetään liitteessä 1.

▼M5

TESTIN PERIAATE

14. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin herkkyys perustuu eläinkoejärjestelmään, jossa hypotalamusta, aivolisäkettä ja munasarjoja koskeva akseli ei toimi, mikä johtaa estrogeenin alhaiseen endogeeniseen tasoon. Tällä varmistetaan lähtötilanteen alhainen kohdun paino ja maksimimäärä annettavista estrogeeneista aiheutuvia vasteita. Jyrsijöillä tämän edellytyksen täyttävät kaksi estrogeenien kannalta herkkää vaihetta:

i) keskenkasvuiset naaraat vieroituksen jälkeen ja ennen puberteettia, ja

ii) nuoret täysikasvuiset naaraat, joille on suoritettu ovariektomia ja joiden kohdun kudoksille on annettu riittävästi aikaa toipua.

15. Testikemikaali annostellaan päivittäin suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla. Testikemikaalin porrastetut annokset annetaan vähintään kahdelle koeryhmälle (ks. ohjeistusta varten 33 kohta). Ryhmää kohden käytetään yksi annostaso. Keskenkasvuista eläintä koskevassa menetelmässä altistusaika on kolme peräkkäistä päivää ja ovx-täysikasvuista koskevassa menetelmässä lyhyin mahdollinen altistusaika on kolme peräkkäistä päivää. Koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus noin 24 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Estrogeenivaikutuksia omaavien agonistien osalta altistettujen eläinryhmien kohdun keskimääräistä painoa verrataan kantaja-ainetta saaneeseen ryhmään tilastollisesti merkittävän lisäyksen arvioimiseksi. Tilastollisesti merkittävä kohdun keskimääräinen painonlisäys testiryhmässä osoittaa positiivisen reaktion tähän biotestiin.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

16. Testiin voidaan käyttää laboratoriossa yleisesti käytettyjä jyrsijäkantoja. Esimerkiksi validoinnissa käytettiin rottakantoja Sprague-Dawley ja Wistar. Niissä ei pitäisi käyttää kantoja, joiden kohdun tiedetään tai epäillään olevan vähemmän reaktiivinen. Laboratorion tulee osoittaa käytetyn kannan herkkyys siten, kuin tämä määritellään 26 ja 27 kohdassa.

17. Rottia ja hiiriä on käytetty tavallisesti kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa biotestissä 1930-luvulta lähtien. OECD:n validointitutkimukset suoritettiin ainoastaan rotilla, koska tulkittiin, että kummankin lajin odotetaan olevan vastaavia ja sen vuoksi yhden lajin pitäisi riittää kansainvälistä validointia varten. Näin säästetään resursseja ja eläimiä. Rotta on laji, joka on valittu useimpiin lisääntymistä ja kehitystä koskeviin toksisuustutkimuksiin. On otettava huomioon, että hiiristä on olemassa aikaisempia tietoja koskeva laaja tietokanta, ja jyrsijöiden kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin testimenetelmän alaa laajennettiin siten, että hiiriä käytettiin testilajina, ja hiiristä suoritettiin validointia varten rajoitettu seurantatutkimus (16). Tällainen vertailuun liittyvä lähestymistapa, jossa käytetään rajallinen määrä testikemikaaleja, johon osallistuu rajallinen määrä laboratorioita ja johon ei sisälly koodattuja testinäytteitä, valittiin, koska alkuperäinen tarkoitus oli resurssien ja eläimien säästäminen. Tämä vertailuun liittyvä validointitutkimus osoittaa nuorten täysikasvuisten hiiren, jolta on poistettu munasolut, kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin osalta, että rotista ja hiiristä saadut tiedot korreloivat laadullisesti ja määrällisesti keskenään. Mikäli kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskeva biotesti tehdään ennen pitkäaikaista tutkimusta, kummassakin kokeessa on käytettävä samaa eläinlajia ja -kantaa. Vertailuun perustuva lähestymistapa rajoittui ovx-täysikasvuisiin hiiriin, ja raportissa ei tarjota tarpeeksi kattavia tietoja keskenkasvuista eläintä koskevan mallin validoimiseksi, joten keskenkasvuisia hiiriä koskevan mallin ei katsota kuuluvan tämän testimenetelmän piiriin.

▼M5

18. Näin ollen joissain tapauksissa rottien sijasta voidaan käyttää hiiriä. Tämän lajin käyttöä olisi perusteltava toksikologisilla, farmakokineettisillä ja/tai muilla kriteereillä. Hiirten osalta menettelyyn voidaan tarvita muutoksia. Esimerkiksi hiiret kuluttavat ruumiinpainon perusteella enemmän ravintoa kuin rotat, joten ravintoon sisältyvän fytoestrogeenin pitoisuuden olisi oltava hiirillä alhaisempi kuin rotilla (9)(20)(22).

Koe-eläinten häkit ja ruokinta

19. Kaikkien toimenpiteiden olisi oltava eläinten hoitoa koskevien paikallisten vaatimusten mukaisia. Nämä kuvaukset hoidosta ja käsittelystä ovat vähimmäisvaatimuksia, ja ne korvataan paikallisilla säännöksillä, kuten tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetulla Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2010/63/EU (38). Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla 22 °C (se voi vaihdella noin ± 3 °C). Suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70:tä % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana. Tavoitteena on 50–60 %:n suhteellinen kosteus. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta. Valaistusta olisi käytettävä jaksossa 12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää.

20. Laboratorioruokintaa ja juomaveden määrää ei saa rajoittaa. Nuoret täysikasvuiset eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai korkeintaan kolmen eläimen ryhmissä. Keskenkasvuisten eläinten nuoren iän vuoksi suositellaan muutaman eläimen pitämistä häkissä.

21. Laboratorioruokavalion fytoestrogeenin korkean tason tiedetään lisäävän jyrsijöiden kohdun painoa siinä määrin, että se vaikuttaa kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevaan biotestiin (13)(14)(15). Fytoestrogeenin ja muuntokelpoisen energian korkea taso laboratorioruokavaliossa voi myös johtaa varhaiseen puberteettiin, jos käytetään keskenkasvuisia eläimiä. Fytoestrogeenien esiintyminen johtuu pääasiassa soijan ja sinimailasen sisällyttämisestä laboratorioravintoon, ja fytoestrogeenien pitoisuuden on osoitettu vaihtelevan tavanomaisessa laboratorioravinnossa eläinryhmien välillä (23). Ruumiinpaino on tärkeä muuttuja, ja kulutetun ravinnon määrä on verrannollinen ruumiinpainoon. Tästä syystä samasta ruokavaliosta saatu todellinen fytoestrogeeniannos voi vaihdella lajien ja iän mukaan (9). Keskenkasvuisten naarasrottien ravinnonkulutus ruumiinpainoon nähden voi olla noin kaksi kertaa suurempi kuin nuorten täysikasvuisten naaraiden, joilta on poistettu munasarjat. Nuorten täysikasvuisten hiirten ravinnonkulutus ruumiinpainoon nähden voi olla noin neljä kertaa suurempi kuin nuorten täysikasvuisten naarasrottien, joilta on poistettu munasarjat.

22. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin tulokset (9)(17)(18)(19) osoittavat kuitenkin, että rajallinen määrä ravintoon sisältyvää fytoestrogeenia voidaan hyväksyä ja tämä ei vähennä biotestin herkkyyttä. Ohjeena on se, että ravintoon sisältyvän fytoestrogeenin taso ei saa ylittää Sprague Dawley- ja Wistar-lajien keskenkasvuisten naaraspuolisten rottien osalta 350:tä µg vastaavaa genisteiinin määrää/gramma (6)(9). Tällaisten ruokavalioiden olisi oltava myös tarkoituksenmukaisia, kun testataan nuoria täysikasvuisia rottia, joilta on poistettu munasarjat, koska nuorten täysikasvuisten eläinten ravinnonkulutus ruumiinpainoon nähden on alhaisempi keskenkasvuisiin verrattuna. Jos käytetään täysikasvuisia hiiriä, joilta on poistettu munasarjat, tai fytoestrogeenille herkempiä rottia, on harkittava, että ravintoon sisältyvän fytoestrogeenin tasoa vähennetään vastaavasti (20). Lisäksi erilaisista ruokavalioista johtuvat muuntokelpoiseen energiaan liittyvät erot voivat johtaa puberteetin alun siirtymiseen (21)(22).

▼M5

23. Ennen tutkimusta edellytetään ruokavalion huolellista valintaa, ja sen fytoestrogeenien tai muuntokelpoisen energian taso ei saa olla korkea (ohjeistusta varten ks. (6)(9)), koska tämä vaikuttaisi tuloksiin häiritsevästi (15)(17)(19)(22)(36). Laboratorion käyttämän testijärjestelmän, siten kuin se määritellään 26 ja 27 kohdassa, moitteettoman suorittamisen varmistaminen on molemman tekijän osalta tärkeää. Hyvän laboratoriokäytännön perusteella on varmistettava, että kunkin tutkimuksen aikana annetun ravintoerän edustava näytteenotto suoritetaan fytoestrogeenisen sisällön mahdollista analyysiä varten (esim. siinä tapauksessa, että kohdun kontrollipaino on korkea suhteessa aiempiin kontrolleihin tai jos vaste referenssiestrogeeniin, 17-alfa-etinyyliestradioliin, ei ole riittävä). Osanäytteitä olisi analysoitava osana tutkimusta tai pakastettuna – 20 °C:een taikka siten, että näytteen hajoaminen ennen analyysiä estetään.

24. Joihinkin koehäkin alustan materiaaleihin voi sisältyä luonnossa esiintyviä estrogeenisia tai antiestrogeenisia kemikaaleja (esim. maissintähkän tiedetään vaikuttavan rottien sykliin ja sillä vaikuttaa olevan antiestrogeenivaikutuksia). Valittuun alusmateriaaliin pitäisi sisältyä mahdollisimman vähän fytoestrogeeneja.

Eläinten valmistelu

25. Koe-eläimet, joilla ei näy merkkejä taudista tai fyysisistä poikkeavuuksista, jaetaan satunnaisotannalla kontrolli- ja koeryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että niiden sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Jokainen eläinyksilö tunnistetaan. Keskenkasvuisia eläimiä olisi mieluiten pidettävä häkissä emojen tai sijaisemojen kanssa, ennen kuin ne vieroitetaan totutusvaiheen aikana. Tutkimusta edeltävän nuorten täysikasvuisten eläinten ja keskenkasvuisten eläinten, jotka toimitetaan emojen tai sijaisemojen kanssa, totutusvaiheen pituuden pitäisi olla noin viisi päivää. Jos keskenkasvuiset eläimet saadaan vastavieroitettuina ja ilman emoja, lyhyempi totutusvaihe voi olla tarpeen, koska annostelun pitäisi alkaa välittömästi vieroituksen jälkeen (ks. 29 kohta).

TESTIN SUORITTAMINEN

Laboratorioiden pätevyyden varmistaminen

26. Laboratorioiden pätevyyden varmistamiseen voidaan käyttää kahta eri vaihtoehtoa:

— Säännöllinen tarkastus, joka perustuu alkuperäiseen lähtötilanteen positiiviseen kontrollitutkimukseen (ks. 27 kohta). Vähintään kuuden kuukauden välein ja aina silloin, kun esiintyy muutos, joka voi vaikuttaa testin suoritukseen (esim. ruokavalion uusi koostumus, dissektiot suorittavaan henkilöstöön liittyvät muutokset, eläinkannan tai toimittajan muuttuminen), testijärjestelmän (eläinmalli) reaktio olisi varmistettava niin, että käytetään (edellä 27 kohdassa kuvatun lähtötilanteen positiivisen kontrollitutkimuksen perusteella) asianmukainen annos referenssiestrogeenia: 17-alfa-etinyyliestradiolia (CAS-nro 57-63-6) (EE).

— Käytetään rinnakkaisia kontrolleja ottamalla mukaan ryhmä, jolle annetaan asianmukainen annos referenssiestrogeenia kussakin testissä.

Jos järjestelmä ei reagoi odotetulla tavalla, koeolosuhteita olisi arvioitava ja muutettava arvion mukaisesti. On suositeltavaa, että kummassakin lähestymistavassa käytetyn referenssiestrogeenin annos on suunnilleen ED70–80.

▼M5

27. **Lähtötilanteen positiivinen kontrollitutkimus** — ennen kuin laboratorio tekee tällaisen testimenetelmän mukaisen tutkimuksen ensimmäisen kerran, laboratorion pätevyys olisi osoitettava testaamalla eläinmallin reagointikykyä ja vahvistamalla referenssiestrogeenin annosvaste: 17-alfa-etinyyliestradioli (CAS-nro 57-63-6) (EE), vähintään neljällä annoksella. Kohdun painon reaktiota verrataan vakiintuneeseen aiempaan tietoon (ks. lähdettä (5)). Jos lähtötilanteen positiivinen kontrollitutkimus ei tuota odotettuja tuloksia, koeolosuhteita olisi tarkasteltava ja muutettava.

Eläinten lukumäärä ja kunto

28. Jokaiseen koe- ja kontrolliryhmään pitäisi sisältyä ainakin kuusi eläintä (sekä keskenkasvuisia että ovx-täysikasvuisia eläimiä koskevien menettelyiden osalta).

Keskenkasvuisten eläinten ikä

29. Keskenkasvuisiin eläimiin liittyvässä kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa biotestissä on esitettävä syntymäaika. Annostelu on aloitettava riittävän aikaisin, jotta varmistetaan, että testikemikaalin annostuksen loppuvaiheessa puberteettiin liittyvää endogeenisten estrogeenien fysiologista lisääntymistä ei ole vielä tapahtunut. Toisaalta on näyttöä siitä, että hyvin nuoret eläimet voivat olla vähemmän herkkiä. Kunkin laboratorion olisi otettava ihanteellisen iän määrittelyn osalta huomioon omat eläimen kasvuvaihetta koskevat taustatietonsa.

Yleinen ohje on, että annostelu rotille voidaan aloittaa välittömästi aikaisen vieroituksen jälkeen syntymän jälkeisenä päivänä 18 (syntymäaika on syntymän jälkeinen päivä 0). Annostelu rotille pitäisi mieluiten päättää syntymän jälkeisenä päivänä 21, mutta kaikissa tapauksissa ennen päivää 25, koska tämän jälkeen hypotalamusta, aivolisäkettä ja munasarjoja koskeva akseli on toiminnassa ja endogeenisen estrogeenin tasot voivat alkaa nousta. Samanaikaisesti nouseva lähtötason kohdun paino merkitsee, että ryhmän standardipoikkeamat lisääntyvät (2)(3)(10)(11)(12).

Munasarjojen poistamista koskeva menettely

30. Kun kyseessä ovat naarasrotat ja -hiiret, joilta poistetaan munasarjat (koe- ja kontrolliryhmät), ne olisi poistettava 6–8 viikon iässä. Rottien osalta munasarjojen poiston ja ensimmäisen annostelupäivän välillä olisi kuluttava vähintään 14 päivää, jotta kohtu voi palata vakaaseen minimitasoon. Hiirten osalta munasarjojen poiston ja ensimmäisen annostelupäivän välillä olisi kuluttava vähintään 7 päivää. Koska pieni määrä munasarjakudosta riittää tuottamaan merkittävän määrän estrogeenia (3), eläimet olisi testattava ennen käyttöä tarkkailemalla emättimestä tupolla otettuja epiteelisoluja ainakin viiden peräkkäisen päivän aikana (eli rottien munasarjojen poiston jälkeisinä päivinä 10–14). Jos eläimissä esiintyy jonkinlaista näyttöä kiimakierrosta, tällaisia eläimiä ei pitäisi käyttää. Lopuksi ruumiinavauksessa olisi tarkasteltava munasarjojen tynkiä näytön saamiseksi siitä, onko niissä munasarjakudosta. Jos on, eläintä ei pitäisi käyttää arvioinneissa (3).

31. Munasarjan poisto aloitetaan sen jälkeen, kun asianmukaisesti nukutettu eläin makaa vatsallaan. Viillon, jolla avataan selkä- ja kylkilihaksen puoleinen vatsanseinämä, pitäisi olla noin 1 cm:n pituinen pituussuunnassa kylkiluun alarajan ja suoliluun harjanteen välisessä keskipisteessä ja muutama millimetri sivussa lannelihaksen lateraalisesta reunasta. Munasarja olisi sen jälkeen poistettava vatsaontelosta aseptiselle alustalle. Munasarja olisi irrotettava munajohtimen ja kohdun runko-osan välisestä yhtymäkohdasta. Kun on varmistettu, että runsasta verenvuotoa ei esiinny, vatsanseinämä olisi suljettava ompeleella ja nahka olisi suljettava hakasella tai asianmukaisella ompeleella. Ligaatiokohdat esitetään kaavamaisesti kuvassa 1. Asianmukaista leikkauksen jälkeistä kivunlievitystä olisi käytettävä jyrsijöiden hoitoon erikoistuneen eläinlääkärin suosituksen mukaisesti.

▼M5

Ruumiinpaino

32. Ovx-täysikasvuisia eläimiä koskevassa menettelyssä ruumiinpaino ja kohdun paino eivät korreloi, koska kohdun painoon vaikuttavat estrogeenin kaltaiset hormonit, mutta eivät ruumiin kokoa säätelevät kasvutekijät. Keskenkasvuisia eläimiä koskevan mallin osalta ruumiinpaino on kuitenkin yhteydessä kohdun painoon eläimen kasvukauden ajan (34). Tutkimuksen alkaessa keskenkasvuisten eläinten painonvaihtelun olisi oltava vähäistä, ja paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskipainosta. Tämä merkitsee, että kasvattajan olisi yhdenmukaistettava poikueiden koko. Näin varmistetaan, että eri emojen poikaset ruokitaan suunnilleen samaan aikaan. Eläimet pitäisi jakaa ryhmiin (kontrolli- ja koeryhmiin) satunnaisen painojakauman mukaisesti, jotta minkään ryhmän keskimääräinen ruumiinpaino ei poikkea tilastollisesti muista ryhmistä. Samaan poikueeseen kuuluvia poikasia olisi vältettävä jakamasta samaan koeryhmään, kun tämä on käytännössä mahdollista, ilman että kokeeseen käytettävien poikueiden määrää lisätään.

Annostasot

33. Sen määrittämiseksi, voiko testattavalla kemikaalilla olla estrogeenistä vaikutusta *in vivo*, yleensä riittää kaksi annosryhmää ja yksi kontrolliryhmä. Tätä mallia pidetään siten parempana eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä. Jos tarkoituksena on annosvastekäyrän saaminen tai ekstrapolointi alempiin annoksiin, tarvitaan ainakin kolme annosryhmää. Jos tarvitaan estrogeeniaktiivisuuden tunnistamista laajempia tietoja (kuten arviota kemikaalin voimakkuudesta), olisi harkittava erilaista annostusta. Kontrolliryhmän eläimiä käsitellään aivan samoin kuin koeryhmän eläimiä, paitsi että niille ei anneta testikemikaalia. Jos kantaja-ainetta käytetään testikemikaalin annon yhteydessä, kontrolliryhmän pitäisi saada sama määrä koeryhmien käyttämää kantaja-ainetta (tai koeryhmien saama suurin määrä, jos ryhmien välillä esiintyy eroja).

34. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa biotestissä on tavoitteena valita annokset niin, että eläimen selviytyminen varmistetaan ja että niihin ei sisälly merkittävää toksisuutta tai ne eivät aiheuta eläimille kärsimystä kemikaalin antoa seuraavana kolmena peräkkäisenä päivänä, jolloin suurin annos on 1 000 mg/kg/päivä. Kaikki annostasot olisi ehdotettava ja valittava siten, että otetaan huomioon kaikki olemassa olevat toksisuus- ja kineettiset (toksikokineettiset) tiedot, jotka ovat saatavilla testikemikaalista tai siihen liittyvistä materiaaleista. Suurimman annostason osalta olisi ensin otettava huomioon LD50 (puolet tappava annos) ja/tai välitöntä myrkyllisyyttä koskevat tiedot, jotta eläinten kuolema, merkittävä kärsiminen tai tuska vältetään (24)(25)(26). Suurimman annoksen tulisi merkitä suurinta siedettävää annosta; annostasolla tehty tutkimus, joka aiheutti positiivisen uterotrofisen vasteen, on myös hyväksyttävä. Suojelutoimenpiteenä pitkät välit (esim. yksi 0,5 logaritmiyksikkö, joka vastaa annoslisäystä kertoimella 3,2, tai jopa yhden logaritmiyksikön verran) annosten välillä ovat yleensä hyväksyttäviä. Jos soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, voidaan tehdä annoksenmääritystutkimus, jonka perusteella käytettävät annokset voidaan määrittää.

35. Vaihtoehtoisesti, jos agonistin estrogeeninen vaikutus voidaan arvioida *in vitro* (tai *in silico*) -tiedoilla, ne voidaan ottaa annoksen valinnassa huomioon. Esimerkiksi testattavan kemikaalin määrä, joka aiheuttaa kohtuun vaikutuksia yhtä paljon kuin vertailukohteena oleva agonisti (etinyyliestradoli), arvioidaan sen etinyyliestradoliin kohdistuvien suhteellisten *in vitro* -vaikutusten perusteella. Korkein testiannos annettaisiin kertomalla tämä vertailukohteena oleva annos asianmukaisella kertoimella, kuten 10 tai 100.

▼M5

Annoksenmääritystä koskevat näkökohdat

36. Tarvittaessa muutamalla eläimellä voidaan tehdä alustava annoksenmääritystutkimus. OECD:n ohjeasiakirjaa nro 19 (25) voidaan käyttää tältä osin määrittelemään sellaisten kliinisten oireiden esiintyminen, jotka viittaavat toksisuuteen tai eläimelle aiheutuvaan kärsimykseen. Tässä annoksenmääritystutkimuksessa voidaan, jos se on asianmukaista, leikata kohdut kolmen päivän jälkeen annoksen antamisesta ja punnita ne noin 24 tuntia viimeisen annoksen antamisen jälkeen. Näitä tietoja voidaan sen jälkeen käyttää varsinaisen tutkimuksen annostuksen suunnitteluun (voidaan valita suurin ja alin hyväksyttävä annos ja antaa suositus annosryhmien määrästä).

Antotapa

37. Testikemikaali annostellaan suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla. Antotavan valinnassa on otettava huomioon eläinten hyvinvointiin liittyvät näkökohdat sekä toksikologiset näkökohdat, kuten se, mikä merkitys on reitillä, jonka kautta ihminen altistuu kemikaalille (esim. suuletkua käytetään mallina aineen nautinnan suhteen, ihonalaista injektiota hengitysteiden tai ihoadsorption suhteen), testiaineen fyysiset/kemialliset ominaisuudet ja erityisesti olemassa olevat toksikologiset tiedot metaboloitumisesta ja kinetiikasta (esim. tarve välttää ensikierron metabolia, parempi tehokkuus tietyn reitin välityksellä).

38. Vesipitoisen liuoksen/suspension käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Koska useimmat estrogeenien ligandit tai niiden metaboliset prekursorit ovat yleensä hydrofobisia, yleisin menettelytapa on öljypohjaisen liuoksen/suspension käyttö (esimerkiksi maissi-, pähkinä-, seesami- tai oliiviöljy). Näillä öljyillä on kuitenkin erilainen kalori- ja rasvapitoisuus, joten kantaja-aine voi vaikuttaa koko muuntokelpoisen energian saantiin. Se voi siten muuttaa mitattavia ominaisuuksia, kuten kohdun painoa erityisesti, kun kyseessä on keskenkasvuisia eläimiä koskeva menetelmä (33). Näin ollen kaikkia käytettäviä kantaja-aineita olisi testattava ennen tutkimusta kaikkiin kontrolleihin, joissa ei käytetä kantaja-aineita, nähden. Testikemikaalit voidaan liuottaa pieneen määrään 95-prosenttista etanolia tai muihin soveltuviin liuottimiin, ja niitä voidaan laimentaa lopulliseen pitoisuuteen kantaja-aineessa. Liuottimen myrkyllisyysominaisuudet on oltava tiedossa, ja niitä olisi testattava erillisen ainoastaan liuotinta saavan kontrolliryhmän avulla. Jos testikemikaalia pidetään stabiilina, sen liuottamisen edistämiseksi voidaan käyttää varovaista lämmitystä ja voimakkaita mekaanisia toimenpiteitä. Testattavan kemikaalin stabiliteetti kantaja-aineessa tulee määrittää. Jos testikemikaali on stabiili koko tutkimuksen ajan, voidaan valmistaa yksi alkuerä testikemikaalia. Määritelty annos laimennoksia valmistetaan päivittäin.

39. Annostuksen ajoitus riippuu käytettävästä mallista (ks. keskenkasvuisia eläimiä koskevan mallin osalta 29 kohta ja ovx-täysikasvuisia eläimiä koskevan mallin osalta 30 kohta). Keskenkasvuisille naarasrotille annetaan testikemikaalia päivittäin kolmena peräkkäisenä päivänä. Naaraspuolisille rotille, joiden munasarja on poistettu, suositellaan myös kolmen päivän käsittelyä, mutta pidempi altistus on hyväksyttävä, ja sillä voidaan parantaa heikkotehoisten kemikaalien havaitsemista. Kun kyseessä ovat naaraspuoliset hiiret, joilta on poistettu munasarjat, 3 päivän käsittely on riittävä, ja merkittävää etua ei saada siitä, että koetta jatketaan seitsemän päivän ajan vahvojen estrogeenivaikutusia omaavien agonistien osalta. Tätä suhdetta ei ole kuitenkaan osoitettu validointitutkimuksessa heikkojen estrogeenien osalta (16), joten annostelua jatketaan korkeintaan 7 peräkkäiseen päivään ovx-täysikasvuisten hiirten osalta. Annokset annetaan samaan aikaan joka päivä. Niitä olisi mukautettava tarpeen vaatiessa, jotta eläimelle annetaan ruumiinpainoon jatkuvasti suhteutettu annos (esim. milligramma testikemikaalia painokiloa kohti vuorokaudessa). Testiaineen nestemäärän tilavuuden osalta sen vaihtelua ruumiinpainon perusteella olisi minimoitava mukauttamalla annosteluliuoksen pitoisuutta. Tarkoituksena on taata kaikilla annostasoilla ja kaikkien annostelureittien osalta jatkuva määrä ruumiinpainon perusteella.

▼M5

40. Kun testikemikaalia annetaan letkuruokinnassa, aine on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Olisi noudatettava paikallisia eläinten hoitoa koskevia vaatimuksia, mutta nestemäärän tilavuus ei saa ylittää 5 ml/painokilo. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 10 ml/painokilo.

41. Kun testikemikaali annostellaan ihonalaisella injektiolla, se olisi annettava yhtenä päivittäisenä annoksena. Annokset olisi annettava lapaluun taakse tai lantion alueelle steriilillä neulalla (esim. 23 tai 25 gaugen neula) ja tuberkuliiniruiskulla. Pistokohdan ajeleminen on vapaaehtoista. Kaikki annosvajaukset ja vuodot pistoskohdassa tai puutteellinen annostus olisi kirjattava. Nestemäärän kokonaistilavuus, joka injektoidaan rottaan päivittäin, ei saa ylittää 5:tä ml/painokilo, ja määrä on jaettava kahteen pistoskohtaan. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 10 ml/painokilo.

Tarkkailu

Yleiset ja kliiniset havainnot

42. Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä ja useammin, jos havaitaan oireita toksisuudesta. Havaintoja olisi tehtävä mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkia eläimiä tarkkaillaan niin, että huomiota kiinnitetään kuolleisuuteen, sairastuvuuteen ja yleisiin kliinisiin oireisiin, kuten muutoksiin käyttäytymisessä, ihon, turkin, silmien, limakalvojen eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toimintaan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeava hengitys).

Eläimen paino ja ravinnon kulutus

43. Kaikki eläimet olisi punnittava lähimpään 0,1 grammaan. Punnitus aloitetaan juuri ennen kokeen aloittamista, eli kun eläimet jaetaan ryhmiin. Valinnaisena mittana voidaan käyttää altistusjakson aikana kulutetun ravinnon määrää, joka voidaan mitata häkkiä kohti punnitsemalla annostelulaitteet. Ravinnon kulutuksesta saadut tulokset olisi ilmoitettava grammoina rottaa kohti päivässä.

Dissektio ja kohdun painon mittaaminen

44. Kaksikymmentäneljä tuntia viimeisen käsittelyn jälkeen rotat lopetetaan inhimillisesti. Ihannetapauksessa ruumiinavausjärjestys satunnaistetaan ryhmien välillä, jotta vältetään etenemistä suoraan ylös tai alaspäin annosryhmiä, mikä voi vaikuttaa jonkin verran tietoihin. Biotestin tavoitteena on mitata kohdun märkä- ja kuivattu paino. Märkäpainoon sisältyy kohtu ja luminaalinesteen sisältö. Kuivattu paino mitataan sen jälkeen, kun kohdun luminaalineste on puristettu ulos ja poistettu.

45. Ennen dissektiota keskenkasvuisten eläinten emättimen avautuminen tutkitaan. Dissektiomenettely aloitetaan avaamalla vatsanseinämä häpyliitoksesta alkaen. Sen jälkeen kohdunsarvi ja munasarjat, jos niitä on, poistetaan selänpuoleisesta vatsanseinämästä. Virtsarakko ja virtsajohtimet poistetaan kohdusta ja emättimestä vatsan puolelta ja lateraaliselta puolelta. Peräsuolen ja emättimen välissä oleva sidekudoksesta muodostuva liitos irrotetaan, kunnes emättimen aukkoa ja välilihan nahkaa voidaan havainnoida. Kohtu ja emätin irrotetaan ruumiista leikkaamalla emättimen seinämää aivan välilihan välisen yhdyskohdan nahan yläpuolelta, kuten esitetään kuvassa 2. Kohtu irrotetaan rungon seinämästä leikkaamalla varovaisesti kohdun mesenteria kohdassa,

▼M5

jossa se kiinnittyy kunkin kohdunsarven dorsolateraalisen sivun koko pituudelta. Sen jälkeen kun kohtu poistetaan ruumiista, sen käsittelyn olisi oltava tarpeeksi nopeaa, jotta kudoksien kuivuminen vältetään. Kuivumisesta aiheutuva painonlasku on suurempi pienten kudoksien, kuten kohdun tapauksessa (23). Jos munasarjoja ei ole poistettu, ne poistetaan munajohtimesta välttäen, että luminaalineste ei valu pois kohdunsarvesta. Jos eläimeltä on poistettu munasarjat, olisi tutkittava, onko tyngissä munasarjakudosta. Ylimääräinen rasva ja sidekudos olisi puhdistettava pois. Emätin irrotetaan kohdusta aivan kohdunkaulan alapuolelta niin, että kohdunkaula pysyy kohdun runko-osassa, kuten esitetään kuvassa 2.

46. Kukin kohtu olisi siirrettävä yksilöllisesti merkittyyn ja punnittuun astiaan (esim. petriastia tai muovikulho). Kuivumista olisi pyrittävä jatkuvasti välttämään ennen punnitsemista (esim. sijoittamalla astiaan suodatinpaperi, jota on kostutettu hieman suolaliuoksella). Kohtu, joka sisältää luminaalinesteen, punnitaan lähimpään 0,1 milligrammaan (kohdun märkäpaino).

47. Jokainen kohtu käsitellään sen jälkeen erikseen luminaalinesteen poistamiseksi. Kummatkin kohdunsarvet lävistetään tai leikataan pituussuuntaan. Kohtu asetetaan hieman kostutetulle suodatinpaperille (esim. Whatman nro 3), ja sitä painetaan varovasti toisella kostutetulla suodatinpaperilla, jotta luminaalineste poistuu kokonaan. Kohtu, josta luminaalineste on poistettu, punnitaan lähimpään 0,1 milligrammaan (kohdun kuivapaino).

48. Tutkimuksen päättämisen yhteydessä kohdun painoa voidaan käyttää varmistamaan, että keskenkasvuisen leikkaamattoman rotan asianmukainen ikä ei ylittynyt, mutta laboratorion käyttämät rottakantaa koskevat aikaisemmat tiedot ovat tässä asiassa ratkaisevia (ks. tulosten tulkinnan osalta 56 kohta).

Vapaaehtoiset tutkimukset

49. Punnitsemisen jälkeen kohtu voidaan fiksoida 10-prosenttiseen neutraalipuskuroituun formaliiniin, jotta sitä voidaan tutkia histopatologisesti hematosykliini- ja eosiinivärjäyksen jälkeen. Emätintä voidaan tutkia vastaavasti (ks. 9 kohta). Lisäksi kohdun limakalvon pinnasta voidaan tehdä morfometrinen mittaus kvantitatiivista vertailua varten.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

50. Tutkimustietoihin olisi sisällyttävä:

— eläinten lukumäärä testin alussa

— testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten määrä ja tunnistetiedot sekä kuoleman tai lopettamisen päivä ja aika

— niiden eläinten lukumäärä ja tunnistetiedot, joissa myrkyllisyysvaikutuksia on havaittavissa, ja kuvaus havaituista myrkyllisyysvaikutuksista mukaan lukien myrkytysoireiden alkamisaika, kesto ja vaikeusaste

— niiden eläinten lukumäärä ja tunnistetiedot, joissa on havaittavissa vammoja ja vammojen tyyppi.

▼M5

51. Yksittäisiä eläimiä koskevat ruumiinpainoon, kohdun märkäpainoon ja kuivattuun painoon liittyvät tiedot olisi kirjattava. Agonisteja koskevaa yksitahoista tilastoanalyysia olisi käytettävä sen määrittämiseksi, johtiko testikemikaalin antaminen tilastollisesti merkittävään kohdun painon nousuun (p-arvo < 0,05). Olisi suoritettava asianmukaiset tilastoanalyysit, joilla testataan käsittelyyn liittyviä muutoksia kohdun märkäpainon ja kuivatun kohdun painon osalta. Esimerkiksi tietoja voidaan arvioida kovarianssianalyysiä koskevalla lähestymistavalla, jossa ruumiinpaino on ruumiinavauksessa kovariantti. Varianssin stabiloimisiin käytettävä logaritminen muunnos voidaan toteuttaa kohtua koskeviin tietoihin ennen tietojen analysointia. Dunnetin ja Hsun testi soveltuu kunkin annosryhmän vertailevaan arviointiin kantaja-ainekontrolliin nähden ja luottamusvälien laskemiseksi. Standardoitua residuaalia voidaan käyttää kuvauksena mahdollisten poikkeamien havaitsemiseksi ja varianssien homogeenisuuden arvioimiseksi. Näitä menettelyjä sovellettiin OECD:n validointiohjelmassa käyttämällä tilastoanalyysijärjestelmässä tilasto-ohjelman PROC CLM (SAS Institute, Cary, Pohjois-Carolina, Yhdysvallat) versiota 8 (6)(7).

52. Loppuraporttiin sisältyy:

Testauslaitos:

— vastuuhenkilöstö ja heidän tutkimusta koskevat vastuualueensa

— lähtötilanteen positiivinen kontrollitesti ja määräajoin saatavat positiiviset kontrollitiedot (ks. 26 ja 27 kohta).

Testikemikaali:

— testikemikaalien kuvaus

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet

— laimennoksien valmistelun menetelmä ja valmistustiheys

— stabiliteetista tuotetut kaikki tiedot

— annosteluliuoksiin liittyvät kaikki analyysit.

Kantaja-aine:

— kantaja-aineen kuvaus (laatu, toimittaja ja erä)

— perustelu kantaja-aineen valinnalle (jos se on muu kuin vesi).

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji ja kanta ja perustelu niiden valinnalle

— toimittaja ja toimittajan tilat

— toimitusikä ja syntymäaika

— jos eläimet ovat keskenkasvuisia, tiedot siitä, toimitettiinko ne emon tai sijaisemon kanssa, ja vieroitusajankohta

— tiedot eläimen totutukseen käytetystä menettelystä

— eläinten lukumäärä häkkiä kohti

— kunkin eläimen ja ryhmän tunnistamista koskevat yksityiskohdat ja menettely.

Testiolosuhteet:

— satunnaisotosta (eli sovellettua menettelyä) koskevat yksityiskohdat

— annoksen valintaperusteet

▼**M5**

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta, sen saavutetusta pitoisuudesta, stabiiliudesta ja tasalaatuisuudesta

— tiedot testikemikaalin annostuksesta ja altistusreitin valintaa koskevat valintaperusteet

— ravinto (nimi, tyyppi, toimittaja, sisältö ja, jos tiedossa, fytoestrogeenin tasot)

— vesilähde (esim. vesijohtovesi tai suodatettu vesi) ja jakelu (esim. putkistolla suuresta säiliöstä tai pulloista)

— alustan materiaali (nimi, tyyppi, toimittaja, sisällys)

— tiedot häkkiolosuhteista, valaistusjaksoista, huoneen lämpötilasta ja kosteudesta sekä huoneen siivouksesta

— yksityiskohtainen kuvaus ruumiinavausta ja kohdun punnitsemista koskevista menetelmistä

— kuvaus tilastollisista menettelytavoista

Tulokset

Yksittäisten eläinten osalta:

— kunkin eläimen päivittäinen ruumiinpaino (ryhmiin jakamisesta ruumiinavaukseen saakka) (lähimpään 0,1 grammaan)

— kunkin eläimen ikä (päivissä pitäen syntymäajankohtaa päivänä 0) testikemikaalin antamisen alkamisesta lähtien

— kunkin annoksen antamispäivä ja -aika

— laskettu annettu määrä ja annostus sekä havainnot annosvajauksista annosten antamisen yhteydessä tai sen jälkeen

— päivittäiset merkinnät eläimen tilasta mukaan lukien asiaankuuluvat oireet ja havainnot

— epäilty kuolinsyy (jos eläin havaitaan tutkimuksen aikana kuolemaisillaan olevaksi tai kuolleeksi)

— inhimillisen lopettamisen päivämäärä ja aika sekä aikaväli viimeisen annoksen antamiseen

— kohdun märkäpaino (lähimpään 0,1 milligrammaan) ja kaikki havainnot luminaalinesteen vuotamisesta dissektion ja punnituksen valmistelun aikana

— kuivatun kohdun paino (lähimpään 0,1 milligrammaan).

Kunkin eläinryhmän osalta:

— kunkin eläimen päivittäinen ruumiinpaino (lähimpään 0,1 grammaan) ja standardipoikkeama (ryhmiin jakamisesta ruumiinavaukseen saakka)

— keskimääräinen kohdun märkäpaino ja keskimääräinen kohdun kuivapaino (lähimpään 0,1 milligrammaan) ja standardipoikkeamat

— päivittäinen ravinnonkulutus, mikäli se mitataan (lasketaan grammoina kulutettua ravintoa eläintä kohti)

▼M5

— tulokset tilastoanalyyseistä, joissa verrataan kohderyhmien kohdun märkäpainoja ja kuivatun kohdun painoja kantaja-ainetta saaneen kontrolliryhmän vastaaviin mittaustuloksiin

— tulokset tilastoanalyysistä, jossa verrataan kohderyhmien ruumiin kokonaispainoa ja painonnousua kantaja-ainetta saaneen kontrolliryhmän vastaaviin mittaustuloksiin

53. Tiivistelmä testimenetelmän tärkeistä ohjeista

	Rotta	**Hiiri**
Eläimet		
Kanta	Laboratorioissa yleisesti käytetyn jyrsijän kanta	
Eläinten lukumäärä	Vähintään kuusi eläintä annosryhmää kohti	
Ryhmien lukumäärä	Vähintään kaksi testiryhmää (ks. ohjeita varten 33 kohta) ja negatiivinen kontrolliryhmä Katso positiivisia kontrolliryhmiä koskevia ohjeita varten 26 ja 27 kohta	
Koe-eläinen häkit ja ruokinta		
Eläinhuoneen lämpötila	22 °C ± 3 °C	
Suhteellinen kosteus	50–60 % ja ei alle 30 % tai yli 70 %	
Päivittäiset valaistusjaksot	12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää	
Ravinto ja juomavesi	Rajoittamattomasti	
Häkki	Yksittäin tai korkeintaan kolmen eläimen ryhmissä (keskenkasvuisille eläimille suositellaan muutaman eläimen pitämistä häkissä)	
Ravinto ja alusmateriaali	Ravinnon ja alusmateriaalin sisältämä fytoestrogeenin määrä olisi oltava vähäinen	
Tutkimusmenettely		
Menettely	Keskenkasvuista eläintä, jolta ei ole poistettu munasarjoja, koskeva menettely (suositeltava) Täysikasvuista naaraspuolista eläintä, jolta on poistettu munasarjat, koskeva menettely	Täysikasvuista naaraspuolista eläintä, jolta on poistettu munasarjat, koskeva menettely
Keskenkasvuisten eläinten annoksen antoikä	Aikaisintaan syntymän jälkeinen päivä 18. Annostus pitäisi päättää ennen syntymän jälkeistä päivää 25	Ei merkitystä tämän testimenetelmän soveltamisalalle
Ikä, jolloin tehdään ovariektomia	6–8 viikon iässä	
Eläinten, joilta on poistettu munasarjat, annoksen antoikä	Munasarjojen poiston ja ensimmäisen annostelupäivän välillä olisi kuluttava vähintään 14 päivää.	Munasarjojen poiston ja ensimmäisen annostelupäivän välillä olisi kuluttava vähintään 7 päivää.
Ruumiinpaino	Ruumiinpainon vaihtelun olisi oltava mahdollisimman vähäinen, enintään ± 20 % keskipainosta	

▼M5

	Rotta	Hiiri
Annostelu		
Annostelureitti	Suun kautta letkulla tai ihon alle annettavalla injektiolla	
Annostelutiheys	Yksi vuorokausiannos	
Letkun ja injektion kautta annettavan määrän tilavuus	≤ 5ml/painokilo (tai korkeintaan 10 ml/painokilo, jos käytetään vesiliuosta) (ihonalaista reittiä kahteen pistoskohtaan)	
Annostelun kesto	3 peräkkäistä päivää keskenkasvuisia eläimiä koskevan mallin osalta Vähintään 3 peräkkäistä päivää täysikasvuisia eläimiä, joilta on poistettu munasarjat, koskevan mallin osalta	Seitsemän peräkkäistä päivää täysikasvuisia eläimiä, joilta on poistettu munasarjat, koskevan mallin osalta
Ruumiinavauksen ajankohta	Noin 24 tuntia viimeisen annoksen jälkeen	
Tulokset		
Positiivinen reaktio	Tilastollisesti merkittävä kohdun keskipainon (märkä- ja/tai kuivapaino) lisääntyminen	
Referenssiestrogeeni	17-alfa-etinyyliestradioli	

TULOKSIEN TULKINTAA JA HYVÄKSYMISTÄ KOSKEVAT OHJEET

54. Estrogeenivaikutuksia koskevaa testiä olisi pidettävä positiivisena, jos kohdun paino lisääntyy tilastollisesti merkittävällä tavalla (p-arvo < 0,05) ainakin suurimman annostason osalta liuotinta saavaan kontrolliryhmään verrattuna. Positiivista tulosta tukee myös annoksen ja vasteen suuruusluokan välisen biologisesti vakuuttavan suhteen osoittaminen. On pidettävä mielessä, että testikemikaalin päällekkäinen estrogeeni- ja antiestrogeenivaikutus voi vaikuttaa annosvastekäyrän muotoon.

55. Tietojen asianmukaisen arvioinnin varmistamiseksi on pidettävä huolta, että suurinta siedettävää annosta ei ylitetä. Tältä osin olisi perusteellisesti arvioitava ruumiinpainon laskua, kliinisiä oireita ja muita havaintoja.

56. Kantaja-ainetta saavan kontrolliryhmän kohdun painoja pidetään kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin tietojen hyväksynnän kannalta tärkeänä näkökohtana. Korkeat kontrolliarvot voivat vaarantaa biotestistä saatavan vasteen ja kyvyn havaita erittäin heikot estrogeenivaikutuksia omaavat agonistit. Ammattikirjallisuudessa ja tiedoissa, joita saatiin kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin validoinnin aikana, todetaan, että kontrolleissa esiintyy spontaanisti korkeita keskiarvoja erityisesti kasvuvaiheessa olevilla eläimillä (2)(3)(6)(9). Koska keskenkasvuisten rottien kohdun paino on riippuvainen monista muuttujista, kuten kannasta tai ruumiinpainosta, kohdun painolle ei voida antaa mitään lopullista ylärajaa. Ohjeena on, että jos keskenkasvuisten kontrollirottien kuivatun kohdun paino on 40 ja 45 milligramman välillä, tuloksia on pidettävä kyseenalaisina. Jos kohtu painaa yli 45 milligrammaa, testin suorittaminen uudelleen voi olla tarpeen. Tätä on kuitenkin harkittava tapauskohtaisesti (3)(6)(8). Kun testi tehdään täysikasvuisilla rotilla, epätäydellisesti suoritetusta ovariektomiasta jää munasarjakudosta, joka voi tuottaa endogeenistä estrogeeniä ja hidastaa kohdun painon regressiota.

▼M5

57. Kantaja-ainetta saavan kontrolli-ryhmän kuivattujen kohtujen painot, jotka ovat alle 0,09 % keskenkasvuisten naarasrottien ruumiinpainosta ja alle 0,04 % nuorten täysikasvuisten naaraiden ruumiinpainosta, vaikuttavat tuottavan hyväksyttäviä tuloksia (ks. taulukko 31 (2)). Jos kontrolliryhmän kohtujen paino on näitä suurempi, olisi tarkasteltava eri tekijöitä, kuten eläinten ikää, asianmukaisesti suoritettua munasarjojen poistoa, ravinnon fytoestrogeeneja, ja negatiivista testitulosta (jossa ei havaita estrogeenivaikutusta) olisi käytettävä harkitsevasti.

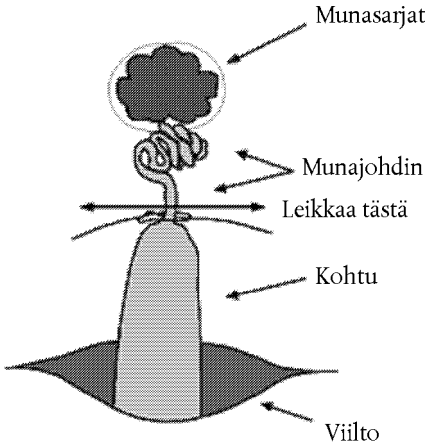
58. Kantaja-ainetta saaneen kontrolliryhmän aikaisemmat tiedot olisi säilytettävä laboratoriossa. Positiivisten referenssiestrogeenien, kuten 17-alfa-etinyyliestradolin, vasteita koskevat aikaisemmat tiedot olisi myös säilytettävä laboratoriossa. Laboratoriot voivat myös testata vastetta tunnettuihin heikon estrogeenivaikutuksen omaaviin agonisteihin. Kaikkia näitä tietoja voidaan verrata saatavilla oleviin tietoihin (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8). Näin varmistetaan laboratorion menetelmien riittävä herkkyys.

59. Kuivatun kohdun painot vaihtelivat OECD:n validointitutkimuksessa vähemmän kuin kohdun märkäpainot (6)(7). Merkittävä vaste kummassakin toimessa osoittaa kuitenkin, että testikemikaali on estrogeenivaikutuksen osalta positiivinen.

60. Kohtuun vaste ei aiheudu pelkästään estrogeeneista. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin positiivista tulosta olisi kuitenkin yleensä tulkittava todisteena mahdollisista estrogeenivaikutuksista *in vivo*, ja sen vuoksi olisi tavallisesti käynnistettävä täydentäviä selvitystoimia (ks. hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevat OECD:n käsitteelliset puitteet (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals), liite 2).

Kuva 1

Kaavio, jossa esitetään munasarjojen kirurginen poisto



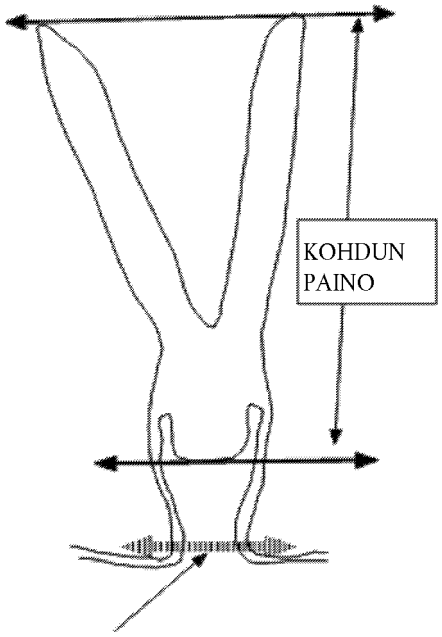
Suolilievettä, verisuonistoa ja rasvakudosta ei ole esitetty

Toimenpide aloitetaan avaamalla selkä- ja kylkilihaksen puoleinen vatsanseinämä pituussuunnassa kylkiluun alarajan ja suoliluun harjanteen välisestä keskipisteestä ja muutama millimetri sivuun lannelihaksen lateraalisesta reunasta. Munasarjat olisi paikannettava vatsaontelon sisällä. Munasarjat olisi sen jälkeen poistettava vatsaontelosta aseptiselle alustalle, munasarjan ja kohdun välille olisi sijoitettava sidos verenvuodon hillitsemiseksi, ja munasarja poistetaan sidoksen päälle tehtävällä leikkauksella munajohtimen ja kunkin kohdunsarven yhtymäkohdasta. Kun on varmistettu, että runsasta verenvuotoa ei esiinny, vatsanseinämä olisi suljettava ompeleella ja nahka olisi suljettava hakasella tai ompeleella. Eläinten olisi annettava toipua ja kohdun painon palautua vähintään 14 päivän ajan ennen käyttöä.

▼**M5**

Kuva 2

Kohdun kudosten irrottaminen ja valmisteleminen painonmittausta varten



Irrotuskohta ruumiinavauksessa

Tämä menettely aloitetaan avaamalla vatsanseinämä häpyliitoksesta alkaen. Sen jälkeen kohdunsarvi ja munasarjat, jos niitä on, poistetaan selänpuoleisesta vatsanseinämästä. Virtsarakko ja virtsajohtimet poistetaan kohdusta ja emättimestä vatsan puolelta ja sivupuolelta. Peräsuolen ja emättimen välissä oleva sidekudoksesta muodostuva liitos irrotetaan, kunnes emättimen aukkoa ja välilihan nahkaa voidaan havainnoida. Kohtu ja emätin irrotetaan ruumiista leikkaamalla emättimen seinämää aivan välilihan välisen yhdyskohdan nahan yläpuolelta, kuten kuvassa esitetään. Kohtu irrotetaan rungon seinämästä leikkaamalla varovaisesti kohdun mesenteria kohdassa, jossa se kiinnittyy kunkin kohdunsarven dorsolateraalisen sivun koko pituudelta. Sen jälkeen kun se irrotetaan ruumiista, ylimääräinen rasva ja sidekudos puhdistetaan pois. Jos munasarjoja ei ole poistettu, ne poistetaan munajohtimesta välttäen, että luminaalineste ei valu pois kohdunsarvesta. Jos eläimeltä on poistettu munasarjat, olisi tutkittava, onko tyngissä munasarjakudosta. Emätin irrotetaan kohdusta aivan kohdunkaulan alapuolelta niin, että kohdunkaula pysyy kohdun runko-osassa, kuten kuvassa esitetään. Kohtu voidaan sen jälkeen punnita.

▼**M5**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT:

Antiestrogeenivaikutus on kemikaalin kyky estää 17-beeta-estradiolin vaikutus nisäkkään elimistössä.

Kemikaalilla tarkoitetaan ainetta tai aineiden seosta.

Syntymäaika on syntymän jälkeinen päivä 0.

Annostus on yleinen käsite, johon sisältyy annos, annostiheys ja annostuksen kesto.

Annos on annostellun testikemikaalin määrä. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa biotestissä annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen ruumiinpainon yksikköä kohden vuorokaudessa (esim. milligramma testikemikaalia painokiloa kohti vuorokaudessa).

Suurin siedettävä annos on korkein määrä kemikaalia, joka ei tapa koe-eläimiä siirtyessään niiden ruumiiseen (LD_0) (IUPAC, 1993).

Estrogeenivaikutus on kemikaalin kyky toimia 17-beeta-estradiolin tavoin nisäkkään elimistössä.

Syntymän jälkeinen päivä X on eläimen syntymästä lähtien laskettava elinpäivä X.

Herkkyys on testissä oikein luokiteltujen kaikkien positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus. Se on täsmällisyyden mitta testimenetelmässä, jolla tuotetaan kategorisia tuloksia, ja se on tärkeä ottaa huomioon testimenetelmän asianmukaisuuden arvioinnissa.

Spesifiys on testissä oikein luokiteltujen kaikkien negatiivisten/ei-aktiivisten kemikaalien osuus. Se on täsmällisyyden mitta testimenetelmässä, jolla tuotetaan kategorisia tuloksia, ja se on tärkeä ottaa huomioon testimenetelmän asianmukaisuuden arvioinnissa.

Testikemikaali on mitä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

Kohtuun kohdistuva vaikutus on käsite, jolla kuvataan positiivista vaikutusta kohdun kudosten kasvuun.

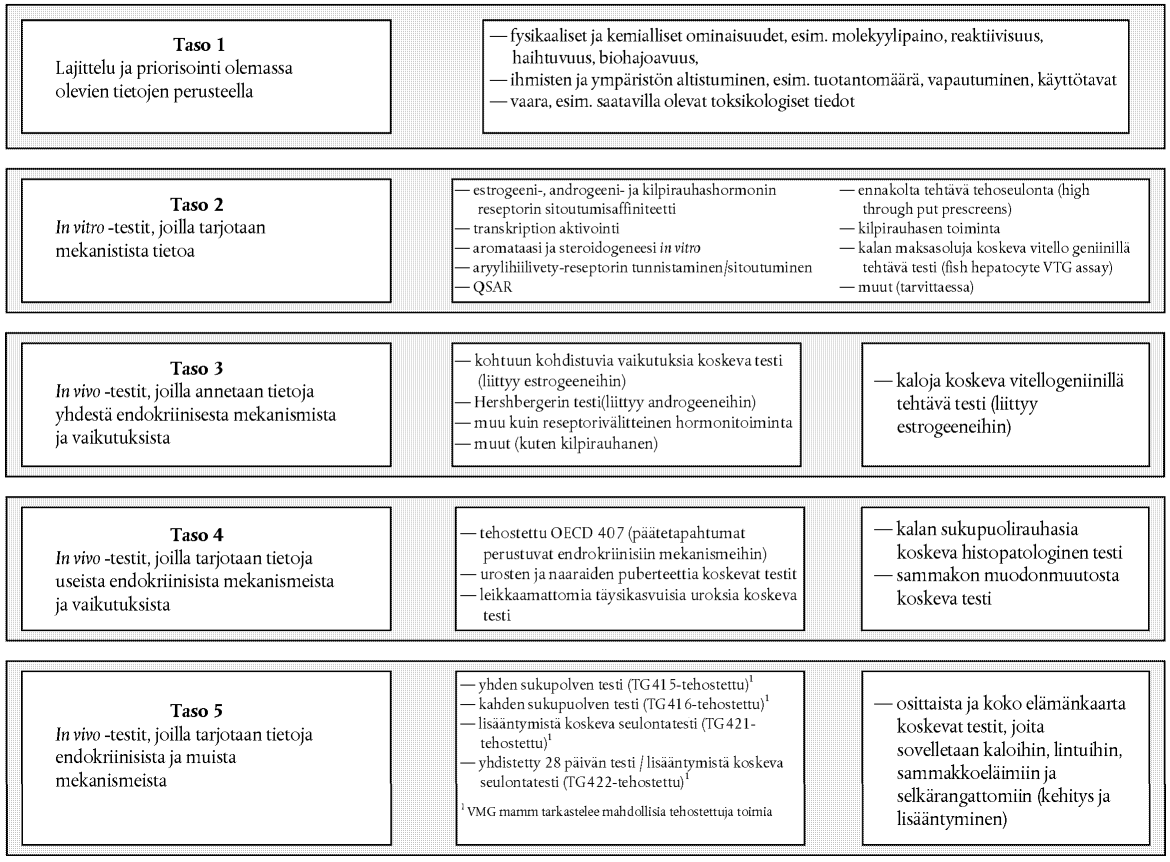
Validointi on tieteellinen prosessi, joka on suunniteltu kuvaamaan toiminnallisia vaatimuksia ja testimenetelmän rajoja sekä osoittamaan sen luotettavuus ja asiaankuuluvuus tiettyä tarkoitusta varten.

▼M5

Lisäys 2

Huom.: Testiohjeita koskevan ohjelman sihteeristön valmistelema asiakirja hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevan työryhmän (EDTA) 6. kokouksessa tehdyn sopimuksen pohjalta

OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevat käsitteelliset puitteet



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

▼**M5**

KÄSITEKEHYKSEEN LIITTYVÄT HUOMAUTUKSET:

Huomautus 1: Siirtyminen ja poistuminen on mahdollista kaikilla tasoilla ja riippuu olemassa olevan tietotarpeen luonteesta vaaran ja riskin arvioinnin suhteen.

Huomautus 2: Tasolla 5 ekotoksilogiaan olisi sisällyttävä päätetapahtumat, jotka osoittavat haittavaikutuksia koskevat mekanismit ja populaatiolle mahdollisesti aiheutuvat vahingot.

Huomautus 3: Jos multimodaalimallilla katetaan useita yksittäisiä päätetapahtumia koskevia testejä, tämä malli korvaa tällaiset yksittäisiä päätetapahtumia koskevat testit.

Huomautus 4: Kunkin kemikaalin arvioinnin olisi oltava tapauskohtainen, ja siinä otetaan huomioon kaikki saatavilla oleva tieto kehyksen tasojen tarkoituksen huomioon ottaen.

Huomautus 5: Kehystä ei olisi pidettävä sellaisena, että se kattaa tällä hetkellä kaiken. Siihen sisältyy tasoilla 3, 4 ja 5 testejä, jotka ovat käytössä tai joiden validointi on kesken. Testit, joiden validointi on kesken, sisällytetään kehykseen väliaikaisesti. Kun ne on kehitetty ja validoitu, ne lisätään muodollisesti kehykseen.

Huomautus 6: Tasoa 5 ei olisi pidettävä sellaisena, että siihen sisältyy pelkästään lopullisia testejä. Kyseiseen tasoon sisältyvien testien katsotaan edistävän yleistä vaarojen ja riskien arviointia.

▼M5

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530–1549

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550–1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559–1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582–587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol. Endocrinology 117:2229–2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650–651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425–427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369–373.

▼M5

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145–157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517–1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613–620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477–485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol.20:343–347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381–393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37:596–601.

(24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320–333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33–41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288–305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284–291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401–416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1–2): 159–184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807–1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using *in vitro* assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410–1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33).

▼M5

B.55. ROTILLA TEHTÄVÄ HERSHBERGERIN BIOTESTI: LYHYTAIKAINEN SEULONTATESTI ANDROGEENISISTA (ANTIANDROGEENISISTA) OMINAISUUKSISTA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 441 (2009). OECD aloitti vuonna 1998 korkean prioriteetin toimenpiteet, jotta voimassa olevia ohjeita tarkistetaan ja kehitetään uusia, joilla mahdollisia hormonaalisia haitta-aiheita seulotaan ja testataan (1). Yksi toimiin kuuluva osa oli rotilla tehtävän Hershbergerin biotestiä koskevan testiohjeen kehittäminen. Tätä testiä on käytetty vuosikymmeniä lääketeollisuudessa, ja sen jälkeen viranomaisen asiantuntijaryhmä standardoi sen ensimmäisen kerran vuonna 1962 androgeenisia kemikaaleja koskevaksi seulontavälineeksi (2). Rotilla tehtävästä Hershbergerin biotestistä on tehty vuosina 2001–2007 kattava validointiohjelma, johon sisältyi tausta-asiakirjan tekeminen (23), yksityiskohtaisia työmenetelmiä koskevan asiakirjan kerääminen (3), dissektiota koskevan oppaan laatiminen (21) ja sellaisten laajojen laboratorioiden sisäisten ja niiden välisten tutkimusten suorittaminen, joilla osoitettiin biotestin luotettavuus ja toistettavuus. Nämä validointitutkimukset suoritettiin voimakkaalla referenssiandrogeenilla (testosteroni-propionaatti, jäljempänä 'TP'), kahdella voimakkaalla synteettisellä androgeenilla (trenboloniasetaatti ja metyylitestosteroni), voimakkaalla antiandrogeenisella lääkkeellä (flutamidi), luonnollisen androgeenin (dihydrotestosteroni) voimakkaalla synteesin estäjällä (finasteridi), usealla heikolla antiandrogeenisellä torjunta-aineella (linuroni, vinklotsoliini, prokymidoni, p,p′ DDE), voimakkaalla 5-alfa-reduktaasin estäjällä (finasteridi) ja kahdella tunnetulla negatiivisella kemikaalilla (dinitrofenoli ja nonyylifenoli) (4)(5)(6)(7)(8). Tämä testimenetelmä on tulos biotestistä saadusta pitkästä kokemuksesta sekä validointitestiä koskevan ohjelman kokemuksista ja siitä saaduista tuloksista.

2. Hershbergerin biotesti on lyhytaikainen *in vivo* -seulontatesti, jossa käytetään urosten lisääntymiselimiin liittyviä kudoksia. Testi on peräisin 1930-luvulta, ja sitä mukautettiin 1940-luvulla niin, että siihen sisällytettiin urosten lisääntymiselinten androgeenille herkästi reagoivat lihakset (2)(9–15). Yli 700 mahdollista androgeenia arvioitiin 1960-luvulla käyttäen testiprotokollan standardisoitua versiota (2)(14). Androgeeneja ja antiandrogeenejä koskevien testien käyttöä pidettiin vakiomenetelmänä 1960-luvulla (2)(15). Tämä biotesti perustuu puberteetin alkuvaiheessa olevien kastroitujen urosrottien viiden androgeeniriippuvaisen kudoksen painonmuutoksiin. Siinä arvioidaan kemikaalin kykyä käynnistää biologista toimintaa, joka on yhdenmukaista androgeenivaikutuksen omaavien agonistien, antagonistien tai 5-alfa-reduktaasin estäjien kanssa. Tähän testimenetelmään sisältyvät viisi androgeeniriippuvaista kohdekudosta ovat ventraalinen eturauhanen, rakkularauhanen (sekä nesteitä ja eturauhasen etuosa), peräaukon kohottajalihas ja värvelihas, Cowperin rauhaset ja terska. Puberteetin alkuvaiheessa olevilla kastroiduilla urosrotilla kaikki nämä viisi kudosta reagoivat androgeeneihin niin, että niiden absoluuttinen paino lisääntyy. Kun näitä kudoksia stimuloidaan lisäämään painoa voimakasta referenssiandrogeenia antamalla, kaikki nämä viisi kudosta reagoivat antiandrogeeneihin niin, että niiden absoluuttinen paino vähenee. Hershbergergin biotestin päämalli on puberteetin alkuvaiheessa oleva kirurgisesti kastroitu uros, ja tämä validoitiin Hershbergerin validointiohjelman vaiheessa 1, 2 ja 3.

3. Hershbergerin biotesti on mekaaninen *in vivo* -seulontatesti androgeenivaikutuksen omaaville agonisteille, antagonisteille tai 5-alfa-reduktaasin estäjille. Sen soveltamista olisi tarkasteltava osana hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevia OECD:n käsitteellisiä puitteita (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (liite 2). Tässä käsitekehyksessä Hershbergedin biotesti

▼M5

sisältyy tasolle 3 *in vivo* -testinä, jolla tarjotaan tietoja yhdestä endokriinisesta mekanismista, androgeenisesta toiminnasta (antiadrogeenisesta toiminnasta). Se on tarkoitus sisällyttää *in vitro*- ja *in vivo* -testiryhmään, jolla tunnistetaan sisäeritysjärjestelmään mahdollisesti vaikutuksia aiheuttavat kemikaalit. Viime kädessä tehdään arviot ihmisten terveydelle tai ympäristölle aiheutuvista vaaroista ja riskeistä.

4. Kastraatiomenettelyyn liittyvien eläinten hyvinvointia koskevien huolenaiheiden vuoksi Hershbergerin biotestin vaihtoehtoiseksi malliksi, jolla vältettiin kastraatio, luotiin leikkaamatonta (kastroimatonta) stimuloitua vastavieroitettua urosta koskeva malli. Stimuloitua vastavieroitettua koskeva testimenettely validoitiin (24); validointitutkimuksissa Hershbergerin biotestin vastavieroitettua urosta koskevalla versiolla ei kuitenkaan pystytty havaitsemaan johdonmukaisesti heikkojen antiandrogeenien vaikutusta androgeeniriippuvaisten elinten painoon testatuilla annostasoillla. Sitä ei sen vuoksi sisällytetä tähän testimenetelmään. Se on kuitenkin sisällytetty OECD:n ohjeasiakirjaan 115 (25), koska se on hyödyllinen eläinten hyvinvoinnin kannalta ja sillä voidaan myös tarjota tietoja muista toimintatavoista.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

5. Androgeenivaikutuksen omaavat agonistit ja antagonistit toimivat ligandeina androgeenireseptorille, jäljempänä 'AR', ja ne voivat aktivoida tai estää reseptorin ohjaaman geenitranskription. Lisäksi jotkut kemikaalit estävät testosteronin muuttumisen voimakkaammaksi luonnolliseksi androgeeniksi dihydrotestosteroniksi joissakin androgeenien kohdekudoksissa (5-alfa-reduktaasin estäjät). Tällaiset kemikaalit voivat mahdollisesti aiheuttaa terveydelle vaaraa, myös lisääntymis- ja kehitysvaikutuksia. Siten sääntelyyn liittyvien vaatimusten vuoksi on arvioitava ja analysoitava nopeasti, voiko kemikaali toimia mahdollisesti androgeenivaikutuksen omaavana agonistina tai antagonistina taikka 5-alfa-reduktaasin estäjänä. Ligandin affiniteetti androgeenireseptoriin, mitattuna reseptoriin sitoutumisena, tai reportterigeenien transkription aktivointi *in vitro,* ei ole ainoa mahdollista vaaraa osoittava tekijä, mutta sillä tarjotaan tietoja. Muihin tekijöihin sisältyvät metaboloinnin aktivointi tai deaktivointi kehoon siirtymisen yhteydessä, kemiallinen jakautuminen kohdekudoksiin ja poistuminen kehosta. Tämän vuoksi on seulottava kemikaalin mahdollinen vaikutus *in vivo* asianmukaisten olosuhteiden ja altistumisen perusteella. *In vivo* -arviointi ei ole niin ratkaiseva, jos kemikaalin absorptiota, jakautumista, metaboloitumista ja erittymistä koskevat ominaisuudet ovat tiedossa. Androgeeniriippuvaiset kudokset reagoivat androgeenistimulointiin nopealla ja voimakkaalla kasvulla erityisesti, kun kyseessä ovat puberteetin alkuvaiheessa kastroidut urosrotat. Jyrsijälajeja, erityisesti rottia, käytetään myös laajasti myrkyllisyystutkimuksissa vaaratekijöiden kuvaamista varten. Tästä syystä testiversio, jossa käytetään puberteetin alkuvaiheessa kastroituja rottia ja viittä kohdekudosta, on asianmukainen androgeenivaikutuksen omaavien agonistien ja antagonistien sekä 5-alfa-reduktaasin estäjien *in vivo* -seulonnalle.

6. Tämä testimenetelmä perustuu sellaisiin OECD:n validointitutkimuksessa käytettyihin protokolliin, joiden on osoitettu olevan luotettavia ja toistettavia laboratorioiden sisäisissä ja niiden välisissä tutkimuksissa (4)(5)(6)(7)(8). Tässä testimenetelmässä esitetään androgeeneihin ja antiandrogeeneihin liittyvät menettelyt.

7. Vaikka eri laboratorioiden soveltamassa OECD:n Hershbergerin biotestiä koskevassa validointiohjelmassa käytetyssä TP-annoksessa oli jonkin verran vaihtelua (0,2 verrattuna 0,4 milligrammaan/painokilo/vuorokausi, ihonalainen injektio), näiden kahden testiprotokollan vaihteluvälissä ei ollut juurikaan eroa, kun kyseessä on kyky havaita heikko tai voimakas antiandrogeeninen aktiviteetti. On kuitenkin selvää, että TP-annoksen ei pitäisi olla liian suuri, jolloin heikkojen andogeenireseptorin antagonistien vaikutus estetään, tai niin pieni, että androgeeniriippuvaisissa kudoksissa esiintyy vain vähän kasvuvastetta, vaikka samaan aikaan ei annettaisi antiandrogeenia.

▼**M5**

8. Yksittäisten androgeeniriippuvaisten kudosten kasvu ei aiheudu pelkästään androgeeneistä, eli kemikaalit, jotka ovat muita kuin androgeenivaikutuksen omaavia agonisteja, voivat muuttaa tiettyjen kudosten painoa. Kuitenkin useiden kudoksien samanaikainen kasvuvaste osoittaa androgeenispesifisemmän mekanismin. Esimerkiksi suuret annokset voimakkaita estrogeeneja voivat lisätä rakkularauhasten painoa; muissa testiin sisältyvissä androgeeniriippuvaisissa kudoksissa vaste ei ole samanlainen. Antiandrogeeniset kemikaalit voivat toimia joko androgeenireseptorin antagonisteina tai 5-alfa-reduktaasin estäjinä, ja 5-alfa-reduktaasin estäjillä on vaihteleva vaikutus, koska muuttuminen vahvempaan dihydrotestosteroniin vaihtelee kudoksen perusteella. Antiandrogeeneilla, jotka estävät 5-alfa-reduktaasin, kuten finasteridi, on voimakkaampi vaikutus ventraaliseen eturauhaseen kuin muihin kudoksiin verrattuna voimakkaaseen AR:n antagonistiin, kuten flutamidiin. Tätä kudosvastetta koskevaa eroa voidaan käyttää havaitsemaan ero AR-välitteisen ja 5-alfa-reduktaasi-välitteisen toiminnan välillä. Lisäksi androgeenireseptori liittyy kehityksellisesti muihin steroidihormoneihin, ja tietyt muut hormonit, kun niitä annetaan korkealla, suprafysiologisella annostasolla, voivat sitoa ja toimia vastaan TP:n kasvua edistäviä vaikutuksia (13). On myös mahdollista, että tehostunut steroidiaineenvaihdunta ja siitä johtuva seerumin testosteronin alentuminen voi vähentää androgeeniriippuvaisten kudosten kasvua. Tästä syystä kaikkia Hershbergerin biotestin positiivisia tuloksia olisi normaalisti arvioitava soveltamalla todistusnäyttöä koskevaa lähestymistapaa, myös *in vitro* -testejä, kuten AR:n ja estrogeenireseptorin sitoutumistestejä ja vastaavia transkription aktivointia koskevia testejä tai muita *in vivo* -testejä, joissa tarkastellaan samoja androgeenin kohdekudoksia. Näihin sisältyvät urosten puberteettia koskeva testi, 15 vuorokauden täyskasvuisia uroksia koskeva testi, taikka toistetuilla annoksilla tehdyt 28 tai 90 vuorokauden testit.

9. Kokemus osoittaa, että ksenobioottiset androgeenit ovat harvinaisempia kuin ksenobioottiset antiandrogeenit. Siten oletetaan, että Hershbergerin biotestiä käytetään useimmiten antiandrogeenien seulontaan. Androgeenien testaamista koskevaa menettelyä voitaisiin kuitenkin suositella steroideille tai steroidien kaltaisille kemikaaleille, taikka kemikaaleille, joiden indikaatio mahdollisista androgeenisista vaikutuksista on peräisin käsitekehyksen tasoon 1 tai 2 sisältyvistä menettelyistä (liite 2). Samoin androgeenisiin (antiandrogeenisiin) ominaisuuksiin liittyviä haittavaikutuksia voidaan havainnoida tason 5 testeissä, mikä johtaa tarpeeseen arvioida, toimiiko kemikaali endokriinisella vaikutustavalla.

10. On todettava, että kaikkien eläimiin perustuvien menettelyiden on täytettävä paikalliset eläinten hoitoa koskevat vaatimukset; jäljempänä esitetyt kuvaukset hoidosta ja käsittelystä ovat toimintaa koskevia vähimmäisvaatimuksia, ja ne korvataan paikallisilla säännöksillä, kuten tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetulla Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2010/63/EU (26). OECD antaa lisäohjeita eläinten inhimillisestä kohtelusta (17).

11. Kuten kaikissa biotesteissä, joissa käytetään koe-eläimiä, olisi harkittava huolellisesti, onko tutkimuksen suorittaminen tarpeen. Tällaiseen päätökseen voi olla kaksi syytä:

— korkea altistuspotentiaali (käsitekehyksen taso 1) tai osoitukset androgeenisestä vaikutuksesta (antiandrogeenisyydesta) (taso 2), jolla tuetaan tutkimusta siitä, voivatko vaikutukset esiintyä *in vivo*

— androgeenivaikutusten (antiandrogeenivaikutusten) kanssa yhdenmukaiset vaikutukset tason 4 ja 5 *in vivo* -testeissä tukevat tutkimuksia tietystä vaikutustavasta, esim. määritystä siitä, johtuvatko vaikutukset androgeenisesta (antiandrogeenisesta) mekanismista.

▼M5

12. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät esitetään liitteessä 1.

TESTIN PERIAATE

13. Hershbergerin biotestin herkkyys saavutetaan käyttämällä uroksia, jotka tuottavat mahdollisimman vähän endogeenista androgeenia. Tämä voidaan toteuttaa käyttämällä kastroituja uroksia. Kastraation jälkeen kohdekudoksilla on ollut riittävästi aikaa kutistua minimiin, ja samantasoinen lähtöpaino on otettu huomioon. Seulottaessa mahdollista androgeenista toimintaa eläimen endogeenisen androgeenin taso on alhainen ja hypotalamusta, aivolisäkettä ja sukupuolirauhasia koskevaa akselia on estetty kompensoimasta tätä palautemekanismeilla, kudosten vastekykyä on maksimoitu ja kudosten painonvaihtelua kokeen alussa on vähimmäistetty. Seulottaessa mahdollista antiandrogeenista toimintaa, johdonmukaisempi kudosten painonnousu voidaan saada aikaan, kun kudoksia stimuloidaan referenssiandrogeenilla. Siten Hershbergerin biotestiin tarvitaan vain kuusi eläintä annosryhmää kohti, kun muissa testeissä, joissa käytetään leikkaamattomia puberteettivaiheessa olevia tai täysikasvuisia uroksia, suositellaan käyttämään 15 urosta annosryhmää kohti.

14. Puberteetin alkuvaiheessa olevien urosrottien kastraatio olisi toteuttava asianmukaisesti käyttämällä hyväksyttyä anestesiamenetelmää ja aseptista tekniikkaa. Kipulääke annetaan ensimmäisinä päivinä leikkauksen jälkeen leikkauksen jälkeisten vaivojen poistamiseksi. Kastraatio tehostaa testin tarkkuutta havaita heikot androgeenit ja antiandrogeenit, koska leikkaamattoman eläimen kompensoiva endokriininen palautemekanismi, joka voi lievittää annettujen androgeenien ja antiandrogeenien vaikutusta, poistetaan ja koska merkittävä yksilöiden välinen seerumin testosteronin tason vaihtelu poistetaan. Kastraatiolla vähennetään siten tällaisen endokriinisen toiminnan seulontaan tarvittavien eläinten määrää.

15. Kun seulotaan mahdollista androgeenista toimintaa, testikemikaalia annostellaan päivittäin suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla 10 peräkkäisen päivän ajan. Testikemikaali annetaan vähintään kahdelle koe-eläinten koeryhmälle käyttäen yhtä annostasoa ryhmää kohti. Koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus noin 24 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Kaikki tilastollisesti merkittävät kahden tai useamman kohde-elimen painonnousut testikemikaalia saavassa ryhmässä verrattuna kantaja-ainetta saavaan kontrolliryhmään, merkitsevät, että testikemikaali on mahdollisen androgeenisen toiminnan osalta positiivinen (ks. 60 kohta). Trenbolonin kaltaisilla androgeeneilla, jotka eivät voi olla 5-alfa-reduktaasin estäjiä, on vahvempia vaikutuksia peräaukon kohottajalihakseen ja värvelihakseen sekä terskaan TP:hen verrattuna, mutta kaikkien kudosten kasvun pitäisi lisääntyä.

16. Seulottaessa mahdollista androgeenista toimintaa testikemikaali annostellaan päivittäin suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla 10 peräkkäisen päivän ajan yhdessä TP-annosten kanssa (0,2 tai 0,4 mg/kg/vuorokausi) ihonalaisella injektiolla. Validointiohjelmassa määriteltiin, että TP:tä voidaan käyttää joko 0,2 tai 0,4 mg/kg/vuorokausi, koska kummatkin annokset olivat tehokkaita antiandrogeenien havaitsemisessa ja sen vuoksi testiin olisi valittava ainoastaan yksi annos. Testikemikaalin porrastetut annokset annetaan vähintään kolmelle koe-eläinten koeryhmille käyttäen yhtä annostasoa ryhmää kohti. Koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus noin 24 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Kaikki tilastollisesti merkittävät kahden tai useamman kohde-elimen painonnousut testattavaa kemikaalia ja TP:tä saavassa ryhmässä verrattuna pelkästään TP:tä saavaan kontrolliryhmään, merkitsevät, että testikemikaali on mahdollisen androgeenisen toiminnan osalta positiivinen (ks. 61 kohta).

▼M5

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin ja kannan valinta

17. Rottia on käytetty tavallisesti Hershbergerin biotestissä 1930-luvulta lähtien. Vaikka on biologisesti mahdollista, että rottien ja hiirten käytöstä saataisiin samanlaisia vastauksia, rottamallista saadun 70 vuoden kokemuksen perusteella Hershbergerin biotestin lajiksi on valittu rotta. Lisäksi, koska Hershbergerin biotesti voidaan tehdä ennen pitkäaikaista monen sukupolven tutkimusta, kummassakin tutkimuksessa on käytettävä samaa eläinlajia, kantaa ja toimituslähdettä.

18. Laboratoriot voivat valita tämän protokollan perusteella testissä käytettävän rottakannan. Sen pitäisi yleensä olla kanta, jota on käytetty aikaisemmin testin suorittavassa laboratoriossa. Testiin voidaan käyttää laboratoriossa yleisesti käytettyjä rottakantoja; kuitenkin, kantoja, jotka kehittyvät huomattavasti 42 päivän ikää myöhemmin, ei pitäisi käyttää, koska näiden urosten kastrointi 42 päivän iässä voi estää terskan painon mittaamisen. Tämä voidaan tehdä ainoastaan sen jälkeen, kun esinahka eroaa peniksestä. Tästä syystä Fisher 344 -rotista johdettuja kantoja ei pitäisi käyttää harvinaisia tapauksia lukuun ottamatta. Fisher 344 -rotalla on erilainen seksuaalisen kehityksen ajoitus muihin yleisemmin käytettyihin kantoihin, kuten Sprague Dawley ja Wistar, nähden (16). Jos tällaista kantaa käytetään, laboratorion pitäisi kastroida ne jonkin verran myöhäisemmässä iässä, ja sen olisi voitava osoittaa käytetyn kannan testiherkkyys. Laboratorion olisi esitettävä selkeästi perustelut rottakannan valinnalle. Mikäli seulontatesti suoritetaan ennen oraalista toistuvan annostelun tutkimusta, lisääntymis- ja kehitystutkimusta tai pitkäaikaista tutkimusta, kaikissa kokeissa on käytettävä mieluiten samasta kannasta ja lähteestä olevaa eläintä.

Koe-eläinten häkit ja ruokinta

19. Kaikkien toimenpiteiden olisi oltava eläinten hoitoa koskevien paikallisten vaatimusten mukaisia. Nämä kuvaukset hoidosta ja käsittelystä ovat vähimmäisvaatimuksia, ja ne korvataan tiukemmilla paikallisilla säännöksillä, kuten tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetulla Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2010/63/EU (26). Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla 22 °C (se voi vaihdella noin ± 3 °C). Suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70:tä % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana. Tavoitteena on 50–60 %:n suhteellinen kosteus. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta. Valaistusta olisi käytettävä jaksossa 12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää.

20. Usean eläimen ryhmä on parempi kuin yksin pitäminen, koska eläimet ovat nuoria ja rotat ovat sosiaalisia eläimiä. Kahden tai kolmen eläimen pitämisellä häkissä vältetään tilanahtaus ja siihen liittyvä stressi, joka voi häiritä lisäsukupuolirauhasten kudoksien kehityksen hormonaalista kontrollia. Häkit puhdistetaan kauttaaltaan ja mahdolliset epäpuhtaudet poistetaan. Häkit sijoitetaan siten, että niiden sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Sopivan kokoinen häkki (~ 2 000 neliösenttimetriä) estää tilanahtauden.

21. Kukin eläin olisi tunnistettava yksilöllisesti (esim. korvamerkillä tai muulla merkinnällä) käyttäen inhimillistä menetelmää. Tunnistustapa on kirjattava.

▼M5

22. Laboratorioruokintaa ja juomaveden määrää ei saa rajoittaa. Hersbergerin biotestiä suorittavien laboratorioiden olisi käytettävä laboratorioruokavaliota, jota käytetään tavallisesti, kun ne testaavat kemikaaleja. Biotestiä koskevissa validointitesteissä ei havaittu, että ruokavaliolla olisi ollut vaikutuksia tai se olisi aiheuttanut vaihtelua. Käytetty ravinto kirjataan ja näyte laboratorioravinnosta olisi säilytettävä mahdollista myöhempää analyysia varten.

Androgeeniriippuvaisten elinten painoa koskevat suorituskriteerit

23. Validointitutkimuksen aikana ei esiintynyt näyttöä siitä, että ruumiinpainon laskeminen lisäsi tai vähensi kohdekudosten (eli niiden, joita tässä tutkimuksessa punnitaan) kudospainon lisääntymistä.

24. Validointiohjelmassa menestyksekkäästi käytettyjen eri rottakantojen androgeeniriippuvaisten elinten paino on painavammilla rottakannoilla suurempi kuin kevyemmillä. Tästä syystä Hershbergerin biotestin suorituskriteereihin eivät sisälly absoluuttiset odotettavissa olevat elinten painot positiivista ja negatiivista kontrollia varten.

25. Koska kudoksen variaatiokertoimella on vastakkainen suhde tilastollisen voiman kanssa, Hershbergerin biotestin suorituskriteerit perustuvat kunkin kudoksen variaatiokertoimen maksimiarvoihin (taulukko 1). Variaatiokertoimet ovat peräisin OECD:n validointitutkimuksista. Laboratorioiden olisi tarkasteltava negatiivisten vaikutusten osalta kontrolliryhmän ja korkean annoksen koeryhmän variaatiokertoimia sen määrittelemiseksi, onko variaatiokertoimen maksimiarvoja koskevat suorituskriteerit ylitetty.

26. Tutkimus olisi toistettava, jos: 1) kolme tai useampi kymmenestä mahdollisesta yksittäisestä variaatiokertoimesta kontrolliryhmässä ja korkean annoksen koeryhmässä ylittää agonisteja ja antagonisteja koskeville tutkimuksille taulukossa 1 osoitetun enimmäisarvon, tai 2) ainakin kaksi kohdekudosta on vähämerkityksistä, eli niiden r-arvo on 0,05–0,10.

Taulukko 1

Suurimpien sallittujen variaatiokertoimien määritteleminen lisäsukupuolirauhasten kohdekudoksille kastroitua eläintä koskevassa mallissa OECD:n validointitutkimuksissa ([1])

Kudos	Antiandrogeeniset vaikutukset	Androgeeniset vaikutukset
Rakkularauhaset	40 %	40 %
Ventraalinen eturauhanen	40 %	45 %
Peräaukon kohottajalihas ja värvelihas	20 %	30 %
Cowperin rauhaset	35 %	55 %
Terska	17 %	22 %

([1]) Tietyn kudoksen variaatiokertoimen kynnysarvo tunnistettiin variaatiokertoimen arvoja koskevasta kaaviokuvasta — joka on järjestetty pienimmästä peräkkäin suurimpaan — kaikkien validointiohjelman kokeiden kaikille keskiarvoille käyttäen tiettyä mallia (agonisti tai antagonisti). Variaatiokertoimen kynnysarvo luetaan siitä pisteestä, kun lisäykset seuraavaan suurempaan variaatiokertoimeen sarjassa ovat huomattavasti suurempia kuin muutamat edeltävät variaatiokertoimet — raja-arvo. Olisi pantava merkille, että vaikka tässä analyysissa todettiin melko luotettavia raja-arvoja testin antagonisteja koskevalle mallille, variaatiokertoimen agonisteja koskevan testin käyrät osoittivat tasaisemman lisäyksen, jolloin tällä menettelyllä tunnistettava kynnysarvio on jokseenkin sattumanvarainen.

▼M5

TESTIN SUORITTAMINEN

Sääntelyn noudattaminen ja laboratorioiden pätevyyden varmistaminen

27. Toisin kuin kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa testissä (tässä liitteessä oleva B.54 luku), Hershbergerin testissä laboratorioiden pätevyyttä ei tarvitse osoittaa ennen tutkimuksen aloittamista, koska rinnakkaisten positiivisten (testosteroni-propionaatti ja flutamidi) ja negatiivisten kontrollien suorittaminen on olennainen osa testiä.

Eläinten lukumäärä ja kunto

28. Kuhunkin koe- ja kontrolliryhmään pitäisi sisältyä ainakin kuusi eläintä. Tämä koskee androgeeni- ja antiandrogeenivaikutusta koskevia protokollia.

Kastrointi

29. Eläinten totutusvaiheen olisi kestettävä usean päivän ajan eläinten vastaanottamisesta, jotta varmistetaan, että ne ovat terveitä ja menestyvät. Koska 42 päivän ikää tai syntymän jälkeistä päivää 42 ennen kastroitujen eläinten esinahka ei ole mahdollisesti eronnut terskasta, eläimet olisi kastroitava syntymän jälkeisenä päivänä 42 tai sen jälkeen, ei aiemmin. Eläimet kastroidaan nukutettuina siten, että niiden kivespussiin tehdään viilto, kummatkin kivekset ja lisäkivekset poistetaan, ja verisuonet sekä siemenjohtimet sidotaan. Kivespussi suljetaan ompeleella tai hakasilla sen jälkeen, kun on varmistettu, ettei verenvuotoa esiinny. Eläimille olisi annettava kipulääkettä ensimmäisinä päivinä leikkauksen jälkeen mahdollisten vaivojen lievittämiseksi. Jos kastroidut eläimet hankitaan toimittajalta, sen on taattava eläinten ikä ja sukukypsyyden vaihe.

Totutus kastraation jälkeen

30. Eläinten pitäisi voida jatkaa tottumista laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän päivän ajan kastraatiosta, jotta kohdekudosten paino voisi palautua. Eläimiä on tarkkailtava päivittäin, ja kaikki eläimet, joilla on merkkejä taudista tai fyysisistä poikkeavuuksista, on poistettava. Käsittely voidaan siten aloittaa (tutkittavan aineen) annostelun aloittamisella jo syntymän jälkeisenä päivänä 49, mutta viimeistään päivänä 60. Eläimen ikä ei saisi olla ruumiinavauksessa myöhempi kuin syntymän jälkeinen päivä 70. Laboratorio voi tämän joustavuuden ansiosta ajoittaa kokeet tehokkaasti.

Ruumiinpaino ja satunnaisotos ryhmässä

31. Eri eläinten ruumiinpainon erot aiheuttavat vaihtelua kudospainossa eläinryhmien sisällä ja niiden välillä. Kudospainon vaihtelun lisääminen johtaa korkeampaan variaatiokertoimeen ja vähentää testin tilastollista voimaa (eli testiherkkyyttä). Sen vuoksi ruumiinpainon vaihtelua olisi hallittava kokeellisesti ja tilastollisesti.

32. Kokeellinen hallinta merkitsee, että tutkimusryhmien sisällä ja niiden välillä aiheutetaan pientä ruumiinpainon vaihtelua. Ensinnäkin epätavallisen pieniä tai suuria eläimiä olisi vältettävä ja niitä ei pitäisi sijoittaa tutkimusryhmiin. Tutkimuksen alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % tavanomaisesta keskiarvosta (esim. 175 g ± 35 g puberteetin alkuvaiheessa kastroitujen rottien osalta). Toiseksi eläimet pitäisi jakaa ryhmiin (kontrolli- ja koeryhmiin) satunnaisen painojakauman mukaisesti, jotta minkään ryhmän keskimääräinen ruumiinpaino ei poikkea tilastollisesti muista ryhmistä. Sovellettu ryhmän satunnaisotosta koskeva menettely on kirjattava.

▼M5

33. Koska toksisuus saattaa vähentää koeryhmien ruumiinpainoa kontrolliryhmiin verrattuna, tilastollisena kovarianttina voidaan käyttää testikemikaalin ensimmäistä annospäivää, ei ruumiinpainoa ruumiinavauksessa.

Annostasot

34. Sen määrittämiseksi, voiko testikemikaalilla olla androgeenivaikutusta *in vivo*, yleensä riittää kaksi testikemikaalia saavaa annosryhmää sekä positiivinen ja kantaja-aineakontrolli (negatiivinen kontrolli) (ks. 43 kohta). Tätä mallia pidetään parempana eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä. Jos tarkoituksena on annosvastekäyrän saaminen tai ekstrapolointi alempiin annoksiin, tarvitaan ainakin kolme annosryhmää. Jos tarvitaan androgeeniaktiivisuuden tunnistamista laajempia tietoja (kuten arviota kemikaalin voimakkuudesta), olisi harkittava erilaista annostusta. Antiandrogeeneja koskevan testin osalta testikemikaali annostellaan yhdessä referenssiandrogeenin vaikutuksen omaavan agonistin kanssa. Olisi käytettävä vähintään kolmea koeryhmää, joille annetaan erilaiset annokset testikemikaalia, ja positiivista ja negatiivista kontrollia (ks. 44 kohta). Kontrolliryhmän eläimiä käsitellään aivan samoin kuin koeryhmän eläimiä, paitsi että niille ei anneta testikemikaalia. Jos kantaja-ainetta käytetään testikemikaalin annon yhteydessä, kontrolliryhmän pitäisi saada korkein määrä koeryhmissä käytettyä kantaja-ainetta.

35. Kaikki annostasot olisi ehdotettava ja valittava niin, että otetaan huomioon testikemikaalista tai siihen liittyvistä materiaaleista mahdollisesti saatavilla olevat toksisuustiedot ja kineettiset (toksikokineettiset) tiedot. Suurimman annostason osalta olisi ensiksi otettava huomioon LD_{50} (puolet tappava annos) ja/tai välitöntä myrkyllisyyttä koskevat tiedot, jotta eläinten kuolema, merkittävä kärsiminen tai tuska vältetään (17)(18)(19)(20), ja toiseksi olisi otettava huomioon saatavilla olevat subkroonisissa ja kroonisissa tutkimuksissa käytetyt annostiedot. Yleensä suurimman annoksen ei pitäisi aiheuttaa sitä, että eläinten lopullinen ruumiinpaino laskee yli 10 % kontrollipainosta. Suurimman annoksen pitäisi olla joko 1) suurin annos, jolla varmistetaan eläimen selviytyminen ja se, että se ei aiheuta merkittäviä toksisuusvaikutuksia tai kärsimystä eläimille kemikaalin antoa seuraavana 10 peräkkäisenä päivänä, jolloin suurin annos on 1 000 mg/kg/päivä (ks. 36 kohta); tai 2) annos, joka aiheuttaa androgeenisia (antiandrogeenisia) vaikutuksia, riippuen siitä, kumpi annos on pienempi. Suojelutoimenpiteenä pitkät välit, esim. puoli logaritmiyksikköä (joka vastaa annoslisäystä, jonka kerroin on 3,2) tai jopa yhden logaritmiyksikön verran annosten välillä, ovat hyväksyttäviä. Jos soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, voidaan tehdä annoksenmääritystutkimus, (ks. 37 kohta), jonka perusteella käytettävät annokset voidaan määrittää.

Raja-annostaso

36. Jos testissä, jonka raja-annos on 1 000 mg/painokilo/vuorokausi ja jonka alhaisempaan annokseen sovelletaan tässä tutkimuksessa kuvattuja menettelyjä, ei voida tuottaa lisääntymiselinten painolle tilastollisesti merkittävää muutosta, täydentäviä annostasoja voidaan pitää tarpeettomina. Raja-annosta sovelletaan paitsi silloin, kun ihmisten altistumista koskevat tiedot osoittavat, että korkeampi annostaso on tarpeellinen.

Annoksenmääritystä koskevat näkökohdat

37. Alustava annoksenmääritystä koskeva tutkimus voidaan suorittaa tarvittaessa muutamalla eläimellä asianmukaisten annosryhmien valitsemiseksi (tässä käytetään välitöntä myrkyllisyyttä koskevien testien menettelyitä (tämän liitteen B.1 a ja B.1 b luku (27), OECD:n testiohje 425 (19))). Hershbergerin biotestin tavoitteena on valita annokset niin, että eläimen selviytyminen varmistetaan ja että niihin ei sisälly merkittävää toksisuutta tai ne eivät aiheuta eläimille kärsimystä kemikaalin antoa seuraavana kymmenenä

▼M5

peräkkäisenä päivänä, jolloin suurin annos on 1 000 mg/kg/päivä, kuten todetaan 35 ja 36 kohdassa. Tältä osin OECD:n ohjeasiakirjaa (17) voidaan käyttää määrittelemään sellaisten kliinisten oireiden esiintyminen, jotka viittaavat toksisuuteen tai eläimelle aiheutuvaan kärsimykseen. Mahdollisuuksien mukaan tässä annoksenmääritystutkimuksessa voidaan kolmen päivän jälkeen annoksen antamisesta leikata kohdekudokset ja punnita ne noin 24 tuntia viimeisen annoksen antamisen jälkeen. Näitä tietoja voidaan sen jälkeen käyttää varsinaisen tutkimuksen annostuksen suunnitteluun.

Vertailukemikaalit ja kantaja-aine

38. Vertailuun käytetyn androgeenivaikutuksia aiheuttavan agonistin olisi oltava testosteroni-propionaatti (TP) CAS-nro 57-82-5. Vertailuun käytetty TP-annos voi olla joko 0,2 tai 0,4 mg/painokilo/vuorokausi. Vertailuun käytetyn androgeenivaikutuksia aiheuttavan antagonistin olisi oltava flutamidi (FT), CAS-nro No 1311-84-7. Vertailuun käytetyn flutamidiannoksen olisi oltava 3 mg/painokilo/vuorokausi, ja flutamidi olisi annettava samaan aikaan vertailuun käytetyn TP-annoksen kanssa.

39. Vesipitoisen liuoksen/suspension käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Koska useimmat androgeenien ligandit tai niiden metaboliset prekursorit ovat yleensä hydrofobisia, yleisin menettelytapa on öljypohjaisen liuoksen/suspension käyttö (esimerkiksi maissi-, pähkinä-, seesami- tai oliiviöljy). Testikemikaalit voidaan liuottaa pieneen määrään 95-prosenttista etanolia tai muihin soveltuviin liuottimiin, ja niitä voidaan laimentaa lopulliseen pitoisuuteen kantaja-aineessa. Liuottimen myrkyllisyysominaisuudet on oltava tiedossa, ja niitä olisi testattava erillisen ainoastaan liuotinta sisältävän kontrolliryhmän avulla. Jos testikemikaalia pidetään stabiilina, sen liuottamisen edistämiseksi voidaan käyttää varovaista lämmitystä ja voimakkaita mekaanisia toimenpiteitä. Testattavan kemikaalin stabiliteetti kantaja-aineessa määritetään. Jos testikemikaali on stabiili koko tutkimuksen ajan, voidaan valmistaa yksi alkuerä testikemikaalia, ja määritelty annos laimennoksia valmistetaan päivittäin. On huolehdittava, että näytteisiin ei pääse epäpuhtauksia ja että ne eivät pilaannu.

Antotapa

40. TP:tä annostellaan ihonalaisella injektiolla ja FT:tä suun kautta letkulla.

41. Testikemikaali annostellaan suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla. Antotavan valinnassa on otettava huomioon eläinten hyvinvointiin liittyvät näkökohdat ja testikemikaalin fyysiset/kemialliset ominaisuudet. Ennen kuin aloitetaan laaja pitkäaikainen testaus — jos injektiolla on saatu jo positiivisia tuloksia –, on otettava huomioon toksikologiset näkökohdat, kuten se, mikä merkitys on reitillä, jota kautta ihminen altistuu kemikaalille (esim. suuletkua käytetään mallina aineen nautinnan suhteen, ihonalaista injektiota hengitysteiden tai ihoadsorption suhteen), ja olemassa olevat toksikologiset tiedot metaboloitumisesta ja kinetiikasta (esim. tarve välttää ensikierron metabolia, parempi tehokkuus tietyn reitin välityksellä).

42. Eläinten olisi saatava annos samalla tavoin ja samassa aikajärjestyksessä kymmenen peräkkäisen päivän aikana noin 24 tunnin välein. Annostasoa olisi mukautettava joka päivä samanaikaisesti suoritettavan päivittäisen ruumiinpainon mittauksen perusteella. Annoksen tilavuus ja antoajankohta olisi kirjattava jokaisena altistuspäivänä. Tietojen asianmukaisen arvioinnin varmistamiseksi on pidettävä huolta, että 35 kohdassa tarkoitettua suurinta annosta ei ylitetä. Tältä osin olisi perusteellisesti arvioitava ruumiinpainon

▼M5

alentumista, kliinisiä oireita ja muita havaintoja. Letkuruokinnassa olisi käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia. Suurin kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Olisi noudatettava paikallisia eläinten hoitoa koskevia vaatimuksia, mutta nestemäärän tilavuus ei saa ylittää 5 ml/painokilo. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 10 ml/painokilo. Ihonalaisten injektioiden osalta annokset olisi annettava lapaluun taakse tai lantion alueelle steriilillä neulalla (esim. 23 tai 25 gaugen neula) ja tuberkuliiniruiskulla. Pistokohdan ajeleminen on vapaaehtoista. Kaikki annosvajaukset ja vuodot pistoskohdassa tai puutteellinen annostus olisi kirjattava. Päivittäin rottaan injektoitavan nestemäärän kokonaistilavuus ei saa ylittää 0,5:tä ml/painokilo.

Androgeenovaikutuksia omaavia agonisteja koskevat erityiset menettelyt

43. Androgeenivaikutuksia omaavia agonisteja koskevan testi osalta kantaja-ainetta saanut ryhmä muodostaa negatiivisen kontrollin ja TP:tä saanut ryhmä positiivisen kontrollin. Androgeenivaikutuksia omaavien agonistien kanssa yhdenmukaista biologista toimintaa testataan antamalla koeryhmille testikemikaalia valittu annos kymmenen peräkkäisen päivän ajan. Testikemikaalia saaneiden ryhmien viiden lisäsukupuolirauhasen kudoksen painoa verrataan kantaja-ainetta saaneeseen ryhmään tilastollisesti merkittävän painonlisäyksen arvioimiseksi.

Androgeenivaikutuksen omaavia antagonisteja ja 5-alfa-reduktaasin estäjiä koskevat erityiset menettelyt

44. Androgeenivaikutuksen omaavia antagonisteja ja 5-alfa-reduktaasin estäjiä koskevan testin osalta TP:tä saanut ryhmä muodostaa negatiivisen kontrollin, ja TP:n ja FT:n vertailuannoksia samanaikaisesti saanut ryhmä muodostaa positiivisen kontrollin. Androgeenivaikutuksen omaavien antagonistien ja 5-alfa-reduktaasin estäjien kanssa yhdenmukaista biologista toimintaa testataan antamalla TP:ta vertailuannos ja antamalla testikemikaalia kymmenen peräkkäisen päivän ajan. TP:tä ja testikemikaalia saaneiden ryhmien viiden lisäsukupuolirauhasen kudoksen painoa verrataan pelkästään TP:tä saaneeseen ryhmään tilastollisesti merkittävän painon vähentymisen arvioimiseksi.

Tarkkailu

Kliiniset havainnot

45. Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä ja useammin, jos havaitaan toksisuusoireita. Havaintoja olisi tehtävä mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkia eläimiä tarkkaillaan niin, että huomiota kiinnitetään kuolleisuuteen, sairastuvuuteen ja yleisiin kliinisiin oireisiin, kuten muutoksiin käyttäytymisessä, ihon, turkin, silmien, limakalvojen eritteiden eritykseen sekä autonomisen hermoston toimintaan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeava hengitys).

46. Kaikki kuolleena löytyneet eläimet olisi poistettava ja hävitettävä, ja tietoja ei tarvitse analysoida. Kaikki ennen ruumiinavausta kuolleet eläimet olisi sisällytettävä tutkimustietoihin mukaan lukien ilmeiset kuolinsyyt. Kaikki kuolemaisillaan olevat eläimet olisi lopetettava inhimillisellä tavalla. Kaikki kuolemaisillaan olleet ja myöhemmin lopetetut eläimet olisi sisällytettävä tutkimustietoihin mukaan lukien ilmeiset kuolinsyyt.

▼M5

Eläimen paino ja ravinnon kulutus

47. Kaikki eläimet olisi punnittava lähimpään 0,1 grammaan. Punnitus aloitetaan juuri ennen kokeen aloittamista, eli kun eläimet jaetaan ryhmiin. Valinnaisena mittana voidaan käyttää altistusjakson aikana kulutetun ravinnon määrää, joka voidaan mitata häkkiä kohti punnitsemalla annostelulaitteet. Ravinnon kulutuksesta saadut tulokset olisi ilmoitettava grammoina rottaa kohti päivässä.

Dissektio sekä kudosten ja elinten painon mittaaminen

48. Noin 24 tunnin kuluttua testikemikaalin viimeisestä annoksesta rotat lopetetaan ja veri poistetaan testin suorittavan laboratorion tavanomaisten menettelyjen mukaisesti, ja ruumiinavaus suoritetaan. Laboratorioraporttiin on merkittävä eläimen inhimilliseen lopettamiseen käytetty menetelmä.

49. Ihannetapauksessa ruumiinavausjärjestys satunnaistetaan ryhmien välillä. Näin vältetään eteneminen suoraan ylös tai alaspäin annosryhmiä, mikä voi vaikuttaa tietoihin. Kaikki ruumiinavauksen löydökset, eli patologiset muutokset ja näkyvät vauriot, kirjataan ja raportoidaan.

50. Viisi androgeeniriippuvaista kudosta (ventraalinen eturauhanen, rakkularauhanen, peräaukon kohottajalihas ja värvelihas, Cowperin rauhaset ja terska) olisi punnittava. Nämä kudokset irrotetaan, niihin tarttunut ylimääräinen kudos ja rasva poistetaan, ja niiden käsittelemätön paino (ilman fiksointia) määritetään. Kaikkia kudoksia käsitellään varovaisesti, jotta vältetään nesteen valuminen pois ja kuivuminen, mikä saattaa aiheuttaa merkittäviä virheitä ja vaihtelua, koska tämä vähentää kirjattavaa painoa. Useat kudokset voivat olla erittäin pieniä tai niitä on vaikea leikata. Tämä lisää vaihtelua. Tästä syystä on tärkeää, että lisäsukupuolirauhasten kudoksen leikkaamisen suorittavat henkilöt ovat tietoisia näiden kudosten dissektiota koskevista vakioiduista toimintamenettelyistä. OECD on asettanut saataville oppaan kudosten dissektiota koskevista vakioiduista toimintaohjeista (21). Näiden ohjeiden mukaisella perusteellisella koulutuksella vähimmäistetään tutkimuksen mahdolliset vaihtelun syyt. Ihannetapauksessa saman näytteiden leikkaajan olisi oltava vastuussa tietyn kudoksen irrottamisesta. Näin poistetaan kudosten käsittelyyn liittyvät näytteiden leikkaajista johtuvat erot. Jos tämä ei ole mahdollista, ruumiinavaus olisi suunniteltava siten, että kukin kudoksen leikkaaja irrottaa tietyn kudoksen kaikista koeryhmistä sen sijaan, että yksi henkilö irrottaa kaikki kudokset kontrolliryhmästä ja toinen kemikaalia saaneista ryhmistä. Kaikki lisäsukupuolirauhasten kudokset olisi punnittava kuivaamatta lähimpään 0,1 milligrammaan, ja kunkin eläimen kudoksien painot olisi kirjattava.

51. Useat kudokset voivat olla erittäin pieniä tai niitä on vaikea leikata. Tämä lisää vaihtelua. Aikaisemmissa tutkimuksissa on käynyt ilmi monia variaatiokertoimia, jotka vaikuttavat eroavan laboratorioiden pätevyyden perusteella. Joissain tapauksissa on havaittu suuria eroja tiettyjen kudosten, kuten ventraalisen eturauhasen ja Cowperin rauhasten absoluuttisissa painoissa tietyssä laboratoriossa.

52. Maksan, munuaisten ja lisämunuaisten paino ovat vapaaehtoisia mittauksia. Ylimääräinen rasva ja sidekudos olisi puhdistettava pois kudoksista. Maksa olisi punnittava lähimpään 0,1 grammaan. Munuaiset ja lisämunuaiset olisi punnittava ja kirjattava lähimpään 0,1 grammaan. Maksaan, munuaisiin ja lisämunuaisiin eivät vaikuta pelkästään androgeenit; niillä tarjotaan hyödyllisiä tietoja systeemisestä toksisuudesta.

▼M5

53. Seerumin luteinisoivan hormonin, jäljempänä ’LH-hormoni’, follikkelia stimuloivan hormonin, jäljempänä ’FSH-hormoni’, ja testosteronin, jäljempänä ’T’, mittaaminen on vapaaehtoista. Seerumin T-tasot ovat hyödyllisiä sen määrittämiseksi, kiihdyttääkö testikemikaali testosteronin maksametaboliaa alentamalla seerumitasoa. Ilman T-tietoja, tällainen vaikutus näyttää aiheutuvan antiandrogeenisen mekanismin välityksellä. LH-hormonin tasoilla tarjotaan tietoa siitä, voiko tietty antiandrogeeni vähentää elimen painoa ja sen lisäksi vaikuttaa hypotalamuksen ja aivolisäkkeen toimintaan, mikä voi pitkän aikavälin tutkimuksissa aiheuttaa kasvaimia kiveksissä. FSH-hormoni on tärkeä siittiöiden muodostumisen kannalta. Seerumit T4 ja T3 ovat myös vapaaehtoisia kokeita, joilla tarjotaan hyödyllistä lisätietoa kyvystä häiritä kilpirauhashormonin homeostaasia. Jos hormonimittauksia tehdään, rotat olisi nukutettava ennen ruumiinavausta ja veri olisi otettava sydänpunktiolla. Nukutusmenetelmä olisi valittava huolella, jotta se ei vaikuta hormonimittaukseen. Seerumin valmistusmenetelmä, radioimmunoanalyysin tai muiden mittausmenetelmien lähde, analyyttiset menetelmät ja tulokset olisi kirjattava. LH-hormonin tasot olisi ilmoitettava nanogrammoina millilitraa kohti seerumissa, ja myös T olisi ilmoitettava nanogrammoina millilitraa kohti seerumissa.

54. Kudosten irrottamista kuvataan seuraavassa, ja tähän liittyy yksityiskohtainen kudosten dissektiota koskeva opas ja valokuvat, jotka julkaistaan validointiohjelmassa täydentävänä aineistona (21). Kudosten irrottamista koskeva video on saatavilla myös Korean elintarvike- ja lääkehallinnon (Food and Drug Administration) verkkosivulla (22).

— Kun eläin on vatsanpuoleinen puoli ylöspäin, määritä, onko peniksen esinahka eronnut terskasta. Jos on, esinahka vedetään taaksepäin ja terska poistetaan ja punnitaan (lähimpään 0,1 milligrammaan), ja paino kirjataan.

— Vatsanahka ja -seinämä avataan, jolloin sisälmykset ovat näkyvissä. Jos valinnaiset elimet punnitaan, maksa poistetaan ja punnitaan lähimpään 0,1 grammaan, vatsalaukku ja suolisto poistetaan, munuaiset ja lisämunuaiset poistetaan ja punnitaan lähimpään 0,1 grammaan. Dissektiolla saadaan näkyviin virtsarakko, ja kohteena olevien uroksen lisäsukupuolirauhasten kudoksien leikkaaminen aloitetaan.

— Ventraalisen eturauhasen dissektiota varten virtsarakko erotetaan vatsalihaksesta leikkaamalla sidekudosta keskiviivaa pitkin. Siirrä virtsarakko paikaltaan kohti rakkularauhasia, jolloin esiin saadaan ventraalisen eturauhasen vasen ja oikea lohko (jonka päällä on rasvakerros). Puhdista varovaisesti ventraalisen eturauhasen oikean ja vasemman lohkon rasvakerros. Siirrä varovaisesti ventraalisen eturauhasen oikea lohko virtaputkesta ja leikkaa se irti virtsaputkesta. Pidä edelleen kiinni ventraalisen eturauhasen oikeasta lohkosta ja siirrä varovaisesti ventraalisen eturauhasen vasen lohko erilleen virtsaputkesta ja leikkaa se irti; punnitse lähimpään 0,1 milligrammaan ja kirjaa paino.

— Rakkularauhasten ja eturauhasen etuosan dissektiota varten siirrä virtsarakkoa kaudaaliseen suuntaan, jolloin saadaan esille siemenjohdin ja rakkularauhasten oikea ja vasen lohko sekä eturauhasen etuosa. Estä nesteen vuotaminen puristamalla hemostaattia rakkularauhasten ja eturauhasen etuosan tyvessä, jossa siemenjohdin liittyy virtsaputkeen. Leikkaa huolellisesti rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa, jossa hemostaatti on paikallaan, poista rasva ja sivuelimet, sijoita taaratulle mittausastialle, poista hemostaatti, mittaa lähimpään 0,1 milligrammaan ja kirjaa paino.

▼M5

— Peräaukon kohottajalihaksen ja värvelihaksen dissektiota varten peniksen lihakset ja tyvi ovat näkyvissä. Peräaukon kohottajalihakset ovat paksusuolen ympärillä ja etummainen peräaukon kohottajalihas ja värvelihas ovat kiinni peniksen paisuvaisissa. Perianaalisen alueen nahka ja sivuelimet poistetaan peniksen tyvestä peräaukon etummaiseen päähän saakka. Peräaukon kohottajalihakset irrotetaan vähitellen peniksen paisuvaisesta ja kudoksista. Paksusuoli leikataan kahtia ja peräaukon kohottajalihas ja värvelihas voidaan irrottaa leikkaamalla ja poistaa. Peräaukon kohottajalihas ja värvelihas puhdistetaan rasvasta ja sivuelimistä ja punnitaan lähimpään 0,1 milligrammaan, ja paino kirjataan.

— Kun peräaukon kohottajalihas ja värvelihas on poistettu, pyöreät Cowperin tai bulbouretaaliset rauhaset ovat näkyvissä peniksen paisuvaisen juuressa ja hieman sen dorsaalisella puolella. Tarvitaan huolellista dissektiota, jotta vältetään tekemästä viiltoa ohueen kalvoon, jolloin vältetään nesteen vuotaminen ulos. Punnitse Cowperin tai bulbouretaaliset rauhaset lähimpään 0,1 milligrammaan ja kirjaa paino.

— Lisäksi, jos jostain rauhasesta valuu nestettä ruumiinavauksen ja dissektion aikana, tämä olisi kirjattava.

55. Jos kunkin kemikaalin arviointiin tarvitaan niin monen eläimen ruumiinavausta, että se ei ole yhdelle päivälle kohtuullista, aloituspäivä voidaan porrastaa kahteen peräkkäiseen päivään, jolloin ruumiinavaus ja siihen liittyvä työ porrastetaan kahdelle päivälle. Jos työ porrastetaan tällä tavoin, kustakin koeryhmästä olisi käytettävä päivässä puolet eläimistä.

56. Ruhot olisi hävitettävä asianmukaisella tavalla ruumiinavauksen jälkeen.

TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Tiedot

57. Tiedot olisi ilmoitettava erikseen (eli ruumiinpaino, lisäsukupuolirauhasten kudokset, vapaaehtoiset mittaukset ja muut reaktiot ja havainnot) ja kustakin eläinryhmästä (keskiarvot ja keskihajonnat kaikista tehdyistä mittauksista). Tiedoista olisi esitettävä yhteenveto taulukkomuodossa. Tiedoista olisi käytävä ilmi eläinten lukumäärä testin alussa, testin aikana kuolleena löytyneiden tai sellaisten eläinten lukumäärä, joilla ilmenee myrkyllisyysvaikutuksia, kuvaus havaituista myrkyllisyysvaikutuksista, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste.

58. Loppuraporttiin sisältyy:

Testauslaitos

— laitoksen nimi, sijainti

— tutkimusjohtaja ja muu henkilöstö ja heidän tutkimusta koskevat vastuualueensa

— päivämäärät, milloin tutkimus alkoi ja päättyi, eli ensimmäinen päivä, kun testikemikaalia annettiin, ja viimeinen päivä, kun tehtiin ruumiinavaus.

Testikemikaali

— lähde, erän/annoksen numero, tunnistetiedot, puhtaus, toimittajan täydellinen osoite ja testikemikaalin (testikemikaalien) kuvaus

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet

— varastointiolosuhteet ja laimennoksien valmistuksen menettely ja valmistustiheys

— stabiliteetista tuotetut kaikki tiedot

— annosteluliuoksiin/suspensioihin liittyvät kaikki analyysit.

▼**M5**

Kantaja-aine

— kantaja-aineen kuvaus (laatu, toimittaja ja eränumero)

— perustelu kantaja-aineen valinnalle (jos muu kuin vesi).

Koe-eläimet ja eläinten hoitoa koskevat menetelmät

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen valinnalle

— eläinten alkuperä tai toimittaja mukaan lukien täydellinen osoite

— toimitettujen eläinten lukumäärä ja ikä

— häkkiolosuhteet (esim. lämpötila ja valaistus)

— ravinto (nimi, tyyppi, toimittaja, eränumero, sisältö ja, jos tiedossa, fytoestrogeenin tasot)

— alustan materiaali (nimi, tyyppi, toimittaja, sisällys)

— häkkiolosuhteet ja eläinten lukumäärä häkkiä kohti.

Testiolosuhteet

— ikä kastrointihetkellä ja kastraation jälkeinen totutusvaihe

— kunkin eläimen paino testin alussa (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— satunnaisotos ja tiedot kantaja-ainetta, vertailu-annosta ja testikemikaalia saaviin ryhmiin sekä häkkeihin jakamisesta

— kunkin ryhmän ruumiinpainon keskiarvo ja keskihajonta kunakin punnituspäivänä koko tutkimuksen ajan

— annoksen valintaperusteet

— tiedot testikemikaalin annostuksesta ja altistusreitin valintaa koskevat valintaperusteet

— jos tehdään antiadrogeenisuusvaikutuksia koskeva testi, TP-käsittely (annos ja tilavuus)

— altistus testikemikaalilla (annos ja tilavuus)

— annosteluajankohta

— ruumiinavausmenetelmät, mukaan lukien veren valuttaminen pois ja mahdollisesti käytetty anestesia

— jos seerumianalyyseja tehdään, toimitetaan menetelmää koskevat tiedot. Esimerkiksi, jos käytetään radioimmunoanalyysia, olisi kirjattava radioimmunoanalyysia koskeva menettely, sen välineistön alkuperä ja voimassaoloajat, menetelmä tuikelaskennalle ja vakiointi.

Tulokset

— päivittäiset havainnot kustakin eläimestä annosteluaikana, mukaan lukien:

— ruumiinpaino (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— kliiniset oireet (jos niitä esiintyy)

— ravinnonkulutusta koskevat kaikki mittaukset tai muistiinpanot

— ruumiinavauksen havainnot kustakin eläimestä, mukaan lukien:

▼M5

— ruumiinavauksen ajankohta

— eläimen koeryhmä

— eläimen tunniste

— kudoksen leikkaaja

— ajankohta, jolloin ruumiinavaus ja dissektio suoritetaan

— eläimen ikä

— lopullinen ruumiinpaino ruumiinavauksessa ja sen tilastollisesti merkittävät laskut ja nousut

— järjestys, jossa eläimeltä valutetaan veri pois ja dissektio suoritetaan ruumiinavauksessa

— viiden androgeeniriippuvaisen kohdekudoksen painot:

— ventraalinen eturauhanen (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa sekä niiden nesteet (pareittain, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— peräaukon kohottajalihaksen ja värvelihaksen yhdistelmä (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— Cowperin rauhaset (käsittelemätön paino, pareittain, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— terska (käsittelemätön paino, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— Vaihtoehtoisten kudosten painot, jos otetaan:

— maksa (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— munuaiset (pareittain, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— lisämunuaiset (pareittain, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— yleiset huomautukset ja kommentit

— seerumin hormonien analyysi, jos suoritetaan

  — seerumin LH-hormoni (vaihtoehtoinen — ng millilitrassa seerumia), ja

  — seerumin T-hormoni (vaihtoehtoinen — ng millilitrassa seerumia)

— yleiset huomautukset ja kommentit.

Tietojen tiivistäminen

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenevät kunkin ryhmän otoskoko, keskiarvo arvosta, ja keskiarvon keskivirhe tai keskihajonta. Taulukkoihin pitäisi sisältyä ruumiinavauksen ruumiinpainot, ruumiinpainon muutokset annostuksen alusta ruumiinavaukseen, lisäsukupuolirauhasten kohdekudosten paino ja valinnaisten elinten painot.

Tulosten pohdinta

Tulosten analysointi

59. Ruumiinavauksen ruumiinpaino ja elinten painot olisi analysoitava tilastollisesti varianssien homogeenisuuden kaltaisten ominaisuuksien osalta tarvittaessa asianmukaisten tietojen muunnoksien avulla. Testiryhmiä olisi verrattava kontrolliryhmiin käyttäen varianssianalyysin kaltaista tekniikkaa, jonka jälkeen suoritetaan vertailevia arvioita (esim. Dunnettin yksitahoinen testi) ja tilastollisista eroa koskevaa kriteeriä, esim. $p \leq 0,05$. Ne ryhmät, joilla on tilastollista merkittävyyttä, olisi täsmennettävä. Kuitenkin ”elinten suhteellisia” painoja pitäisi välttää, koska näiden tietojen käsittelyn taustalla on virheellisiä tilastollisia oletuksia.

▼M5

60. Androgeenivaikutuksia omaavien agonistien osalta kontrolliryhmänä pitäisi olla pelkästään kantaja-ainetta saanut testiryhmä. Testikemikaalin vaikutustavan ominaispiirteet voivat johtaa erilaisiin suhteellisiin vasteisiin kudoksissa. Esimerkiksi trenbolonilla, jolla on 5-alfa-reduktaasin suhteen resistenssi, on vahvempia vaikutuksia peräaukon kohottajalihakseen ja värvelihakseen sekä terskaan kuin TP:llä. Tilastollisesti merkittävää lisäystä ($p \leq 0,05$) kahden tai useamman androgeeniriippuvaisen kohdekudoksen painoissa (ventraalinen eturauhanen, rakkularauhanen, peräaukon kohottajalihas ja värvelihas, Cowperin rauhaset ja terska) olisi pidettävä androgeenivaikutuksen omaavan agonistin osalta positiivisena tuloksena, ja kaikissa kohdekudoksissa pitäisi voida havaita, että kasvu on lisääntynyt jonkin verran. Yhdistetty arviointi kaikista lisäsukupuolirauhasten kudosten reaktioista voidaan toteuttaa käyttäen asianmukaista monimuuttuja-analyysia. Tällä voidaan parantaa analyysia erityisesti tapauksissa, missä ainoastaan yksi kudos tuottaa tilastollisesti merkittävän vasteen.

61. Androgeenivaikutuksia omaavien agonistien osalta kontrolliryhmänä pitäisi olla koeryhmä, joka sai vertailuun käytettyä androgeenia (ainoastaan testosteroni-propionaattia). Testikemikaalin vaikutustavan ominaispiirteet voivat johtaa erilaisiin suhteellisiin reaktioihin kudoksissa. Esimerkiksi 5-alfa-reduktaasin estäjillä, kuten finasterdillä on tuntuvampia vaikutuksia ventraaliseen eturauhaseen kuin muihin kudoksiin, verrattuna voimakkaisiin AR-antagonisteihin, kuten flutamidiin. Tilastollisesti merkittävää vähennystä ($p \leq 0,05$) kahden tai useamman androgeeniriippuvaisen kohdekudoksen painossa (ventraalinen eturauhanen, rakkularauhanen, peräaukon kohottajalihas ja värvelihas, Cowperin rauhaset ja terska) verrattuna käsittelyyn pelkästään TP:llä olisi pidettävä androgeenivaikutuksen omaavan agonistin osalta positiivisena tuloksena, ja kaikissa kohdekudoksissa pitäisi voida havaita, että kasvu on vähentynyt jonkin verran. Yhdistetty arviointi kaikista lisäsukupuolirauhasten kudosten reaktioista voidaan toteuttaa käyttäen asianmukaista monimuuttuja-analyysia. Tällä voidaan parantaa analyysia erityisesti tapauksissa, missä ainoastaan yksi kudos tuottaa tilastollisesti merkittävän vasteen.

62. Tiedot esitetään taulukkomuodossa, johon sisältyvät kunkin ryhmän keskiarvo ja keskiarvon keskivirhe (keskihajonta on myös hyväksyttävä) sekä otoskoko. Lisäksi olisi esitettävä yksittäisiä taulukkotietoja. Kontrollitietojen yksittäisiä arvoja, keskiarvoa, keskivirhettä (keskihajonta) ja variaatiokertoimen arvoja olisi tarkasteltava, jotta määritetään, täyttävätkö ne hyväksyttävät johdonmukaisuutta koskevat kriteerit todennäköisten aikaisempien arvojen kanssa. Variaatiokertoimilla, jotka ylittävät taulukossa 1 luetellut variaatiokertoimen arvot (ks. 25 ja 26 kohta) kunkin elimen painon osalta, pitäisi määritellä, sisältyykö tietojen tallentamiseen tai kirjaamiseen virheitä tai sitä, eikö laboratorio vielä hallitse androgeeniriippuvaisten kudosten tarkkaa dissektiota, jolloin jatkokoulutus/harjoittelu on perusteltua. Yleensä variaatiokertoimet (keskihajonta jaettuna keskimääräisellä elimen painolla) ovat toistettavissa laboratoriosta toiseen ja tutkimuksesta toiseen. Esitettyihin tietoihin pitäisi sisältyä ainakin ventraalinen eturauhanen, peräaukon kohottajalihas ja värvelihaksen rakkularauhanen, Cowperin rauhaset, terska, maksa ja ruumiinpainot sekä ruumiinpainon muutokset annostuksen alkamisesta ruumiinavaukseen. Tiedot voidaan esittää myös sen jälkeen, kun ruumiinpainoa on mukautettu kovarianssin perusteella, mutta tämän ei pitäisi korvata alkuperäisten tietojen esittämistä. Lisäksi, jos esinahkan eroamista ei ole tapahtunut missään ryhmässä, tämä olisi kirjattava ja sitä olisi vertailtava tilastollisesti kontrolliryhmään Fisherin tarkkaa testiä käyttämällä.

▼**M5**

63. Kun tietokoneelle syötettyjä tietoja tarkistetaan alkuperäisten tietolomakkeiden perusteella tietojen täsmällisyyden osalta, niiden elinten painon arvot, jotka eivät ole biologisesti vakuuttavia tai jotka vaihtelevat kyseisestä koeryhmästä enemmän kuin kolmen keskihajonnan osalta, merkitsee, että niitä on tutkittava huolellisesti ja ne on ehkä hylättävä, koska ne ovat todennäköisesti merkintävirheitä.

64. Tutkimustulosten vertailu OECD:n variaatiokertoimen arvojen (taulukko 1) kanssa on usein tärkeä vaihe, kun tutkimustulosten pätevyyttä tulkitaan. Kantaja-ainetta saaneen kontrolliryhmän aikaisemmat tiedot olisi säilytettävä laboratoriossa. Positiivisten referenssikemikaalien, kuten TP:n ja FT:n reaktioita koskevat aikaisemmat tiedot olisi myös säilytettävä laboratoriossa. Laboratoriot voivat myös ajoittain testata tunnettujen heikkojen androgeenivaikutuksen omaavien agonistien ja antagonistien vastetta ja säilyttää nämä tiedot. Näitä tietoja voidaan verrata saatavilla oleviin OECD:n tietoihin. Näin varmistetaan, että laboratorion menetelmät tuottavat riittävää tilastollista tarkkuutta ja voimaa.

▼**M5**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT:

Androgeenivaikutus on käsite, jolla kuvataan positiivista vaikutusta androgeeniriippuvaisten kudosten kasvuun.

Antiandrogeenivaikutus on kemikaalin kyky estää TP:n vaikutus nisäkkään elimistössä.

Kemikaalilla tarkoitetaan ainetta tai aineiden seosta.

Syntymäaika on syntymän jälkeinen päivä 0.

Annos on annostellun testikemikaalin määrä. Hershbergerin biotestissä annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen ruumiinpainon yksikköä kohden vuorokaudessa (esim. milligramma testikemikaalia painokiloa kohti vuorokaudessa).

Annostus on yleinen käsite, johon sisältyy annos, annostiheys ja annostuksen kesto.

Kuolemaisillaan oleva on käsite, jolla kuvataan kuolevaa eläintä eli kuoleman partaalla olevaa eläintä.

Syntymän jälkeinen päivä X on eläimen syntymästä saakka laskettava elinpäivä X.

Herkkyys tarkoittaa testimenetelmän kykyä tunnistaa oikein kemikaalit, joilla on ominaisuudet, mitä kokeilla testataan.

Spesifiys tarkoittaa testimenetelmän kykyä tunnistaa oikein kemikaalit, joilla ei ole ominaisuutta, mitä kokeilla testataan.

Testikemikaali on mitä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

Validointi on tieteellinen prosessi, joka on suunniteltu kuvaamaan toiminnallisia vaatimuksia ja testimenetelmän rajoja sekä osoittamaan sen luotettavuus ja asiaankuuluvuus tiettyä tarkoitusta varten.

▼M5

Lisäys 2

Huom.: Testiohjeita koskevan ohjelman sihteeristön valmistelema asiakirja hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevan työryhmän (EDTA) 6. kokouksessa tehdyn sopimuksen pohjalta

OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevat käsitteelliset puitteet

Taso 1 Lajittelu ja priorisointi olemassa olevien tietojen perusteella	— fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, esim. molekyylipaino, reaktiivisuus, haihtuvuus, biohajoavuus, — ihmisten ja ympäristön altistuminen, esim. tuotantomäärä, vapautuminen, käyttötavat — vaara, esim. saatavilla olevat toksikologiset tiedot	
Taso 2 *In vitro* -testit, joilla tarjotaan mekanistista tietoa	— estrogeeni-, androgeeni- ja kilpirauhashormonin reseptorin sitoutumisaffiniteetti — transkription aktivointi — aromataasi ja steroidogeneesi *in vitro* — aryylihiilivety-reseptorin tunnistaminen/sitoutuminen — QSAR	— ennakolta tehtävä tehoseulonta (high through put prescreens) — kilpirauhasen toiminta — kalan maksasoluja koskeva vitello geniinillä tehtävä testi (fish hepatocyte VTG assay) — muut (tarvittaessa)
Taso 3 *In vivo* -testit, joilla annetaan tietoja yhdestä endokriinisesta mekanismista ja vaikutuksista	— kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskeva testi (liittyy estrogeeneihin) — Hershbergerin testi(liittyy androgeeneihin) — muu kuin reseptorivälitteinen hormonitoiminta — muut (kuten kilpirauhanen)	— kaloja koskeva vitellogeniinillä tehtävä testi (liittyy estrogeeneihin)
Taso 4 *In vivo* -testit, joilla tarjotaan tietoja useista endokriinisista mekanismeista ja vaikutuksista	— tehostettu OECD 407 (päätetapahtumat perustuvat endrokriinisiin mekanismeihin) — urosten ja naaraiden puberteettia koskevat testit — leikkaamattomia täysikasvuisia uroksia koskeva testi	— kalan sukupuolirauhasia koskeva histopatologinen testi — sammakon muodonmuutosta koskeva testi
Taso 5 *In vivo* -testit, joilla tarjotaan tietoja endokriinisista ja muista mekanismeista	— yhden sukupolven testi (TG415-tehostettu)[1] — kahden sukupuolven testi (TG416-tehostettu)[1] — lisääntymistä koskeva seulontatesti (TG421-tehostettu)[1] — yhdistetty 28 päivän testi / lisääntymistä koskeva seulontatesti (TG422-tehostettu)[1] [1] VMG mamm tarkastelee mahdollisia tehostettuja toimia	— osittaista ja koko elämänkaarta koskevat testit, joita sovelletaan kaloihin, lintuihin, sammakkoeläimiin ja selkärangattomiin (kehitys ja lisääntyminen)

VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

02008R0440 — FI — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

KÄSITEKEHYKSEEN LIITTYVÄT HUOMAUTUKSET:

Huomautus 1: Siirtyminen ja poistuminen on mahdollista kaikilla tasoilla ja riippuu olemassa olevan tietotarpeen luonteesta vaaran ja riskin arvioinnin suhteen.

Huomautus 2: Tasolla 5 ekotoksilogiaan olisi sisällyttävä päätetapahtumat, jotka osoittavat haittavaikutuksia koskevat mekanismit ja populaatiolle mahdollisesti aiheutuvat vahingot.

Huomautus 3: Jos multimodaalimallilla katetaan useita yksittäisiä päätetapahtumia koskevia testejä, tämä malli korvaa tällaiset yksittäisiä päätetapahtumia koskevat testit.

Huomautus 4: Kunkin kemikaalin arvioinnin olisi oltava tapauskohtainen, ja siinä otetaan huomioon kaikki saatavilla oleva tieto käsitekehyksen tasojen tarkoituksen huomioon ottaen.

Huomautus 5: Kehystä ei olisi pidettävä sellaisena, että se kattaa tällä hetkellä kaiken. Siihen sisältyy tasoilla 3, 4 ja 5 testejä, jotka ovat käytössä tai joiden validointi on meneillään. Testit, joiden validointi on kesken, sisällytetään väliaikaisesti. Kun ne on kehitetty ja validoitu, ne lisätään muodollisesti kehykseen.

Huomautus 6: Tasoa 5 ei olisi pidettävä sellaisena, että siihen sisältyy pelkästään lopullisia testejä. Kyseiseen tasoon sisältyvien testien katsotaan edistävän yleistä vaarojen ja riskien arviointia.

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and anti-androgenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N^{o} 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269.

▼M5

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671–8.

(9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413–422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306–1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38–44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113–119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175–180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.

(16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, s 38.

(17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33).

(27) Tämän liitteen seuraavat luvut:

B.1 a, Akuutti oraalinen toksisuus — vakioannosmenetelmä

B.1 b, Akuutti oraalinen toksisuus — akuutin toksisuusluokan menetelmä

▼M5

B.56. PIDENNETTY YHDEN SUKUPOLVEN LISÄÄNTYMISTOKSISUUTTA KOSKEVA TUTKIMUS

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 443 (2012). Se perustuu International Life Science Institute -organisaation (ILSI) ja Health and Environmental Sciences Institute -organisaation (HESI) maatalouden kemikaaliturvallisuudenarvioinnista (ACSA) vastaavan teknisen komitean ehdotukseen F_1-kehitysvaihetta koskevasta pidennetystä yhden sukupolven lisääntymistutkimuksesta, siten kuin se julkaistiin lähteessä Cooper et al., 2006 (1). Tutkimuksen suunnittelua varten on tehty useita parannuksia ja selvennyksiä. Niillä tarjotaan joustavuutta ja korostetaan, että tutkimus on tärkeää aloittaa eläviä eläimiä koskevista tiedoista ja että samalla käytetään koehavaintoja testauksen ohjaamiseksi ja suunnittelemiseksi. Tässä testimenetelmässä annetaan yksityiskohtainen kuvaus pidennetyn yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevan tutkimuksen suorittamisesta. Tässä testimenetelmässä kuvataan F_1-sukupolven eläinten kolmea kohorttia:

Kohortti 1: arvioidaan lisääntymiseen/kehitykseen liittyviä päätetapahtumia; tätä kohorttia voidaan laajentaa sisällyttämällä siihen F_2-sukupolvi.

Kohortti 2: arvioidaan kemikaalille altistumisen mahdollista vaikutusta kehittyvään hermostoon.

Kohortti 3: arvioidaan kemikaalille altistumisen mahdollista vaikutusta kehittyvään immuunijärjestelmään.

2. Päätöksissä siitä, arvioidaanko toista sukupolvea ja jätetäänkö hermostonkehityksen myrkyllisyysvaikutuksia koskeva kohortti ja/tai immuunijärjestelmän kehityksen myrkyllisyysvaikutuksia koskeva kohortti arvioinnin ulkopuolelle, olisi otettava huomioon arvioitavasta kemikaalista olemassa olevat tiedot sekä eri sääntelyviranomaisten tarpeet. Testimenettelyn tarkoituksena on antaa tietoja siitä, miten tutkimus voidaan suorittaa ja käsitellä sitä, miten kutakin kohorttia olisi arvioitava.

3. OECD:n ohjeasiakirjassa 117 (39) kuvataan menettelyä päätökselle sisäisistä ominaisuuksien mittaamiseen liittyvistä tekijöistä toisen sukupolven tuottamiseksi niitä sääntelyviranomaisia varten, jotka käyttävät sisäisiä käynnistäviä tekijöitä (internal triggers).

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA TAVOITTEET

4. Pidennetyn yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevan tutkimuksen päätavoite on arvioida tiettyjä kehitysvaiheita, jotka eivät kuulu muiden toksisuustutkimusten piiriin ja testata vaikutuksia, joita voi esiintyä syntymää edeltävän ja sen jälkeisen kemikaalille altistumisen seurauksena. Kun kyseessä ovat lisääntymistä koskevat päätetapahtumat, tarkoituksena on käyttää ensimmäisenä toimenpiteenä tietoja toistuvan annostelun tutkimuksista (mukaan lukien lisääntymistoksisuutta koskevat seulontatutkimukset, kuten OECD:n testiohje 422 (32)), tai hormonaalisia haitta-aineita koskevista lyhyen aikavälin seulontatesteistä (esim. kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskeva testi, testimenetelmä B.54 (36) taikka Hershbergerin testi, testimenetelmä B.55 (37)), jos niitä on saatavilla, havaitsemaan urosten ja naarasten lisääntymiselimiin aiheutuvia vaikutuksia. Tähän voi sisältyä urosten osalta spermatogeneesi (kivesten histopatologia) ja naaraiden osalta kiimasykli, munarakkuloiden laskeminen/oosyyttien kypsyminen ja munasarjojen eheys (histopatologia). Laajennettu yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskeva tutkimus on testi lisääntymistä koskeville päätetapahtumille, ja siihen tarvitaan urosten ja naarasten välistä vuorovaikutusta, kantavia naaraita, naaraita, joilla on poikaset ja F_1-sukupolvea sukukypsyysiän jälkeen saakka (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151, joka tukee tätä testimenetelmää (40)).

▼M5

5. Tämä testimenetelmä on suunniteltu niin, että sillä tarjotaan arviointi syntymää edeltävän ja sen jälkeisen kemikaalille altistumisen vaikutuksesta kehitykseen sekä perusteellinen arviointi tiineenä olevien ja imettävien naaraiden sekä nuorten ja täysikasvuisten poikasten systeemisestä toksisuudesta. Keskeisten kehitykseen liittyvien päätetapahtumien — kuten poikasten elinkyky, vastasyntyneen terveys, kehityksen tila syntymähetkellä sekä fyysinen ja toiminnallinen kehitys täysikasvuiseksi saakka — yksityiskohtaisen tutkimuksen tarkoituksena on määrittää poikasten erityiset kohde-elimet. Lisäksi tutkimus tarjoaa ja/tai vahvistaa tietoja testikemikaalin vaikutuksesta täysikasvuisen uroksen ja naaraan lisääntymiselimien eheyteen ja toimintaan. Erityisesti, mutta ei yksinomaan, tarkastellaan seuraavia parametreja: sukupuolirauhasten toiminta, kiimasykli, lisäkivesten siemennesteen siittiöiden kypsyminen, pariutumiskäyttäytyminen, hedelmöityminen, tiineys, synnytys ja imetys. Lisäksi hermostonkehityksen myrkyllisyysvaikutuksia ja immuunijärjestelmän kehityksen myrkyllisyysvaikutuksia koskevista arvioinneista saadut tiedot kuvaavat mahdollisia vaikutuksia kyseisissä elimissä ja järjestelmissä. Näistä testeistä saatujen tietojen avulla pitäisi voida olla mahdollista määritellä taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL), taikka alhaisin havaittavan haittavaikutuksen aiheuttava taso (LOAEL), ja/tai vertailukohtana olevat annokset useita päätetapahtumia varten ja/tai joita käytetään kuvaamaan vaikutuksia, jotka on havaittu aikaisemmissa toistuvilla annoksilla tehdyissä tutkimuksissa, ja/tai jotka ovat ohjeena myöhemmin suoritettaville testeille.

6. Menettelystä esitetään kaavio kuvassa 1. Testattavaa kemikaalia annetaan jatkuvasti porrastettuina annoksina usealle sukukypsistä uroksista ja naaraista koostuvalle ryhmälle. Tälle poikasia saaneelle sukupolvelle (P-sukupolvi) annetaan annos määritetylle pariutumista edeltävälle ajanjaksolle (joka valitaan testikemikaalista saatavilla olevan tiedon perusteella, mutta joka on vähintään kaksi viikkoa) ja kahden viikon pariutumisjaksolle. P-urokset saavat kemikaalia ainakin F_1-sukupolven vieroitukseen saakka. Niiden pitäisi saada kemikaalia vähintään 10 viikon ajan. Ne voivat saada sitä pidempään, jos lisääntymiseen aiheutuvia vaikutuksia ei tarvitse selvittää. P-naaraiden käsittelyä jatketaan tiineyden ja imetyksen ajan, kunnes poikueiden vieroittaminen päättyy (eli käsittely kestää 8–10 viikkoa). F_1-poikaset käsitellään edelleen testikemikaalilla vieroitusiästä täysikasvuiseksi saakka.Jos toista sukupolvea arvioidaan (ks. OECD:n ohjeasiakirja 117 (39)), F_1-poikasten käsittelyä jatketaan F_2-sukupolven vieroitukseen saakka tai tutkimuksen päättämiseen asti.

7. Kaikista eläimistä tehdään kliiniset havainnot ja patologiset tutkimukset, joissa tarkastellaan myrkytysoireita. Erityistä huomiota kiinnitetään urosten ja naaraiden lisääntymiselinten eheyteen ja toimintaan sekä poikasten terveyteen, kasvuun, kehitykseen ja toimintaan. Valitut poikaset osoitetaan vieroituksen yhteydessä erityisiin alaryhmiin (kohortit 1–3, ks. 33 ja 34 kohta sekä kuva 1) lisätutkimuksia varten. Näihin sisältyvät sukukypsyys, lisääntymiselinten eheys ja toiminta, neurologiset ja käyttäytymistä mittaavat päätetapahtumat sekä immuunijärjestelmän toiminta.

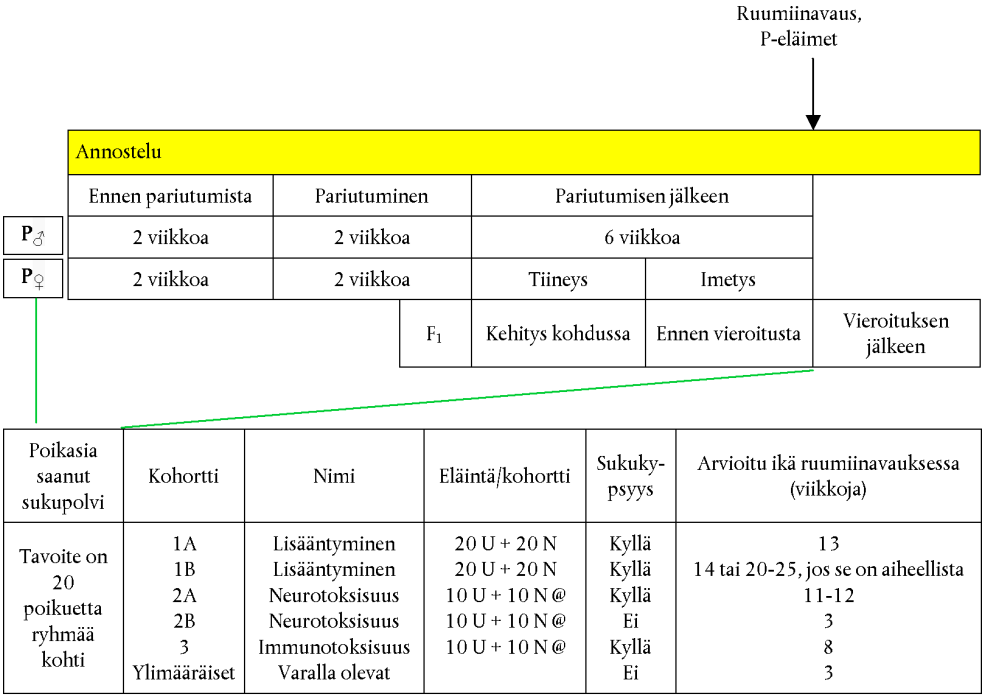
8. Tutkimuksen toteuttamisessa olisi noudatettava periaatteita ja näkökohtia, jotka esitetään pääpiirteittään OECD:n ohjeasiakirjassa 19 kliinisten oireiden tunnustamisesta, arvioimisesta ja soveltamisesta inhimillisinä toimenpiteinä turvallisuusarvioinneissa käytettäviin eläimiin (34).

▼M5

9. Kun käytössä on riittävä määrä tutkimuksia tämän uuden tutkimussuunnitelman vaikutuksen arvioimiseksi, testimenetelmää tarkastellaan uudelleen ja tarvittaessa tarkistetaan saadun kokemuksen perusteella.

Kuva 1

Järjestelmä pidennetylle yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevalle tutkimukselle



Poikasia saanut sukupolvi	Kohortti	Nimi	Eläintä/kohortti	Sukukypsyys	Arvioitu ikä ruumiinavauksessa (viikkoja)
Tavoite on 20 poikuetta ryhmää kohti	1A	Lisääntyminen	20 U + 20 N	Kyllä	13
	1B	Lisääntyminen	20 U + 20 N	Kyllä	14 tai 20-25, jos se on aiheellista
	2A	Neurotoksisuus	10 U + 10 N @	Kyllä	11-12
	2B	Neurotoksisuus	10 U + 10 N @	Ei	3
	3	Immunotoksisuus	10 U + 10 N @	Kyllä	8
	Ylimääräiset	Varalla olevat		Ei	3

@ yksi poikuetta kohden ja edustaja yhteensä 20 poikueesta jos mahdollista

MENETELMÄN KUVAUS/TESTIN VALMISTELU

Eläimet

Eläinlajin ja kannan valinta

10. Lajien valintaa lisääntymistoksisuutta koskevaan tutkimukseen olisi harkittava tarkasti kaiken saatavilla olevan tiedon perusteella. Rotta on yleensä suositeltavin laji, koska taustatietoja on paljon ja niitä voidaan vertailla yleisiin toksisuustesteihin. Tässä testimenetelmässä annetuissa kriteereissä ja suosituksissa viitataan rottaan. Jos toista lajia käytetään, tämä on perusteltava, ja protokollaan on tehtävä asianmukaiset muutokset. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen tai joilla tiedetään esiintyvän korkea määrä spontaaneja kehityshäiriöitä, ei pitäisi käyttää.

Ikää, ruumiinpainoa ja ryhmiin sisällyttämistä koskevat kriteerit

11. Olisi käytettävä terveitä poikasia saaneen sukupolven eläimiä, joita ei ole käytetty aiempiin kokeisiin. Sekä uroksia että naaraita tutkitaan, ja naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. P-eläinten olisi oltava sukukypsiä ja samanpainoisia (sukupuolen mukaan) annostuksen alkuvaiheessa, samanikäisiä (noin 90 päivää) pariutumisvaiheessa, ja niiden on kuuluttava tutkittavaan lajiin ja kantaan. Eläimiä olisi totutettava olosuhteisiin ainakin viiden päivän ajan vastaanottamisen jälkeen. Eläimet jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmiin niin, että ryhmien välinen ruumiinpainon keskiarvo on vertailukelpoinen (eli se on ± 20 % keskiarvosta).

▼M5

Koe-eläinten häkit ja ruokinta

12. Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla 22 °C (± 3 °C). Suhteellisen kosteuden pitäisi olla 30–70 %, ja ihanteellinen väli on 50–60 %. Keinovaloa olisi käytettävä jaksossa 12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää. Normaalia laboratorioruokavaliota voidaan käyttää, ja juomaveden määrää ei saa rajoittaa. Olisi kiinnitettävä erityistä huolta siihen, kuinka paljon ravintoon sisältyy fytoestrogeenia, koska korkea määrä fytoestrogeenia ravinnossa voi vaikuttaa tiettyihin kehitykseen liittyviin päätetapahtumiin. Vakiomuotoista ruokavaliota, jonka sisältö kirjataan ja jossa estrogeenisia kemikaaleja on vähennetty, suositellaan (2)(30). Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tämän menettelyn mukaisesti. Testikemikaalin sisältö, homogeenisuus ja stabiliteetti ruokavaliossa olisi varmistettava. Rehuun ja juomaveteen mahdollisesti sisältyviä epäpuhtauksia olisi säännöllisesti analysoitava. Kunkin tutkimuksen aikana annetun ravintoerän edustavaa näytettä olisi säilytettävä asianmukaisissa oloissa (eli pakastettuna – 20 °C lämpötilassa) raportin valmistumiseen saakka, jos tulokset edellyttävät ruokavalion ainesosien tarkempaa analyysia.

13. Eläimet voidaan pitää häkeissä pienissä samaa sukupuolta ja samassa koeryhmässä olevien eläinten ryhmissä. Niitä voidaan joutua pitämään häkeissä yksittäin mahdollisten vaurioiden välttämiseksi (esim. urokset pariutumisjaksolla). Parituksen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Kun parituksen todetaan tapahtuneen, naaraat, joiden oletetaan olevan tiineinä, sijoitetaan erikseen synnytys- tai poikimishäkkiin, jossa niille annetaan asianmukaisia ja määriteltyjä pesäntekoaineita. Poikueet pidetään emojen kanssa vieroitukseen saakka. F_1-eläimet voidaan pitää häkeissä pienissä samaa sukupuolta ja samassa koeryhmässä olevien eläinten ryhmissä vieroituksesta lopettamiseen saakka. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin, jos tämä on tieteellisesti perusteltua. Valittuun alusmateriaalin pitäisi sisältyä mahdollisimman vähän fytoestrogeeneja.

Eläinten lukumäärä ja tunnistaminen

14. Yleensä kussakin koe- ja kontrolliryhmässä pitäisi olla niin paljon pariutuneita eläinpareja, että jokaiseen annosryhmään saadaan ainakin 20 tiinettä naarasta. Tavoitteena on tarpeeksi tiineystapauksia, jotta voidaan tehdä merkitsevä arvio kemikaalin vaikutuksesta P-sukupolven hedelmällisyyteen, tiineyteen ja emon käytökseen sekä F_1-sukupolven kasvuun ja kehitykseen hedelmöityksestä sukukypsyyteen saakka. Jos tutkimuksessa ei päästä tavoiteltuun tiineiden eläinten määrään, tämä ei välttämättä mitätöi tutkimusta, ja tätä on arvioitava tapauskohtaisesti ottaen huomioon testikemikaaliin liittyvän mahdollisen syy-yhteyden.

15. Kullekin P-eläimelle annetaan oma tunnistenumero ennen annostelun aloittamista. Jos aikaisempien laboratoriotietojen perusteella vaikuttaa siltä, että huomattavalla määrällä naaraista ei ole säännöllinen (neljän tai viiden päivän) kiimakierto, niin ennen käsittelyn aloittamista suositellaan kiimakierron arviointia. Vaihtoehtoisesti ryhmän kokoa voidaan lisätä, jotta varmistetaan, että ainakin 20 naaralla kussakin ryhmässä on säännöllinen (neljän tai viiden päivän) kiimakierto käsittelyn alussa. Kaikki F_1-poikaset tunnistetaan yksilöllisesti, kun vastasyntyneet tutkitaan ensimmäisen kerran syntymän jälkeisenä päivänä 0 tai 1. Kaikkien F_1-eläinten, ja tarvittaessa F_2-eläinten, alkuperäispoikue on merkittävä muistiin, ja tiedot olisi säilytettävä koko tutkimuksen ajan.

▼M5

Testikemikaali

Testikemikaalista saatavilla olevat tiedot

16. Olemassa olevien tietojen tarkastelu on tärkeää, kun tehdään päätöksiä altistusreiteistä, kantaja-aineen valinnasta, eläinlajin valinnasta, annosten valinnasta ja mahdollisista muutoksista altisaikataulussa. Tästä syystä kaikki saatavilla olevat asianmukaiset tiedot testikemikaalista, eli fysikokemialliset, toksikokineettiset (mukaan lukien lajispesifinen metabolia) ja toksikodynaamiset ominaisuudet, rakenne-aktiivisuussuhteet, metaboliset prosessit *in vitro*, tulokset aikaisemmista toksisuustutkimuksista ja asiaankuuluvat tiedot rakenteeltaan vastaavista aineista olisi otettava huomioon pidennetyn yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevan tutkimuksen suunnittelussa. Alustavat tiedot absorptiosta, jakautumisesta, metaboloinnista ja erittymisestä sekä biokertyvyydestä voidaan saada kemiallisesta rakenteesta, fysikokemiallisista tiedoista, plasmaproteiinin sitoutumisen laajuudesta tai toksikokineettisistä tutkimuksista, ja toksisuustutkimuksista saadaan lisätietoja erityisesti haitattomasta vaikutustasosta, metaboliasta tai metabolian induktiosta.

Toksikokineettisten tietojen tarkastelu

17. Aikaisemmin suoritetuista raja-annostutkimuksista tai muista tutkimuksista saadut toksikokineettiset tiedot eivät ole välttämättömiä, mutta ne ovat erittäin hyödyllisiä tutkimuksen suunnittelun, annostasojen valinnan ja tuloksien tulkinnan suhteen. Erityisen hyödyllisiä ovat tiedot, joilla: 1) varmistetaan kehittyvien sikiöiden ja poikasten altistuminen testikemikaalille (tai asiaankuuluville metaboliiteille); 2) annetaan arvio sisäisestä dosimetriasta; ja 3) arvioidaan kineettisten prosessien annoksesta riippuvan saturaation mahdollisuutta. Täydentäviä toksikokineettisiä tietoja, kuten metaboliittiprofiilit, pitoisuuteen liittyvät ajan funktiot, on myös tarkasteltava, jos niitä on saatavilla. Täydentävät toksikokineettiset tiedot voidaan kerätä myös varsinaisen tutkimuksen aikana, jos se ei häiritse varsinaisen tutkimuksen päätetapahtumien keräämistä ja tulkintaa.

Yleinen ohje on, että seuraava toksikokineettisten tietojen kokonaisuus olisi hyödyllinen pidennetyn yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevan tutkimuksen suunnittelulle:

— myöhäinen tiineysaika (esim. tiineyspäivä 20): emon veri ja sikiöveri

— imetyksen puolessa välissä (syntymän jälkeinen päivä 10): emon veri, poikasen veri ja/tai maito

— varhaisessa vaiheessa vieroituksen jälkeen (esim. syntymän jälkeinen päivä 28): vastavieroitetun verinäytteet.

Tiettyjen analyyttien (esim. alkuperäinen kemikaali ja/tai metaboliitit) määrittelyssä ja näytteenotto-ohjelmassa olisi sovellettava joustavuutta. Esimerkiksi kerättävien näytteiden määrä ja keräämisen ajoitus tiettynä näytteenottopäivänä riippuu muiden kuin tiineinä olevien eläinten altistusreitistä ja siitä, onko niiden toksikokineettisistä ominaisuuksista aiempia tietoja. Tutkimuksissa, joissa testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna, riittää näytteenotto yhtenä johdonmukaisena ajankohtana kunakin näinä päivinä. Annostelu letkuruokinnalla voi vaatia täydentäviä näytteenottoaikoja, jotta saadaan parempi arvio erilaisista sisäisistä annoksista. Minään näytteenottopäivänä ei ole kuitenkaan tarpeen tehdä täydellistä tutkimusta pitoisuuteen liittyvästä aktiviteetista. Veri voidaan tarvittaessa eritellä sukupuolittain poikueiden sisällä sikiön ja vastasyntyneen analyyseja varten.

▼M5

Annostelureitti

18. Reitin valinnassa olisi otettava huomioon ihmisen altistumiselle tarkoituksenmukaisin reitti (reitit). Vaikka testiprotokolla on suunniteltu testikemikaalin antamiseen ravinnon välityksellä, sitä voidaan muokata niin, että voidaan käyttää muuta antotapaa (juomaveden välityksellä, letkulla, inhalaatiolla, ihon kautta) kemikaalin ominaisuuksista sekä tarvittavista tiedoista riippuen.

Kantaja-aineen valinta

19. Testikemikaali liuotetaan tai suspensoidaan tarvittaessa sopivaan kantaja-aineeseen. Suositusten mukaan ensin on harkittava vesipohjaisen liuoksen/suspension käyttöä, sitten öljypohjaista (esimerkiksi maissiöljy) liuosta/suspensiota, kun tämä on mahdollista. Jos kantaja-aine ei ole vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. On vältettävä käyttämästä kantaja-aineita, jotka ovat mahdollisesti luontaisesti myrkyllisiä (esim. asetoni, DMSO). Testikemikaalin stabiliteetti kantaja-aineessa määritetään. Jos annostelun helpottamiseksi käytetään kantaja-ainetta tai muuta lisäainetta, on syytä selvittää: sen vaikutus testiaineen absorboitumiseen ja jakautumiseen, testiaineen metaboloitumiseen ja elimistössä säilymiseen. Lisäksi on selvitettävä sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka saattavat muuttaa testiaineen myrkyllisyyttä, sekä vaikutukset koe-eläinten ravinnon ja juoman nauttimiseen tai ravitsemustilaan.

Annoksen valitseminen

20. Tutkimukseen olisi tavanomaisesti sisällyttävä vähintään kolmea annostasoa ja rinnakkainen kontrolli. Kun valitaan asianmukaiset annostasot, tutkijan olisi otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot, kuten annostiedot aikaisemmista tutkimuksista, toksikokineettiset tiedot tiineinä olevista ja muista eläimistä ja se, kuinka laajasti ainetta siirtyy maidon kautta, sekä ihmisen altistumista koskevat arviot. Jos on saatavilla toksikokineettisiä tietoja, joista käy ilmi toksikokineettisten prosessien annosriippuvainen saturaatio, olisi pyrittävä välttämään korkeita annostasoja, jotka osoittavat selvästi saturaation, jos ihmisen altistumistason oletetaan olevan hyvin paljon matalampi kuin kyllästymispiste. Tällaisissa tapauksissa suurimman annostason olisi oltava hieman suurempi kuin käännekohta, jolloin siirrytään epälineaariseen toksikokineettiseen käyttäytymiseen.

21. Jos asianmukaisia toksikokineettisiä tietoja ei ole käytettävissä, annostasojen olisi perustuttava toksisuusvaikutuksiin, ellei tätä rajoiteta testikemikaalin fysikaalisen/kemiallisen luonteen vuoksi. Jos annostasot perustuvat myrkyllisyysvaikutuksiin, suurimman annoksen valinnan tavoitteena on aiheuttaa jonkin verran systeemistä myrkyllisyyttä, mutta ei kuolemaa eikä voimakasta kärsimystä.

22. Annostasot valitaan asteittain alenevasti, jotta kaikki annostukseen liittyvät vaikutukset osoitetaan ja jotta vahvistetaan haitattomat vaikutustasot (NOAEL) tai annokset, jotka ovat lähellä havaitsemisrajaa, joiden perusteella herkimmille päätetapahtumille voidaan johtaa vertailukohtana oleva annos. Haitattomien vaikutustasojen ja alhaisimman havaittavan haittavaikutuksen aiheuttavan tason välisten suurten annosvälien välttämiseksi kaksinkertaiset tai nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat. Usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi yli 10-kertaisia annosvälejä).

23. Kontrolliryhmän eläimiä käsitellään aivan samoin kuin koeryhmän eläimiä, paitsi että niille ei anneta testikemikaalia. Tämä ryhmä pitäisi jättää altistamatta tai sille annetaan plaseboa taikka se saa kantaja-ainetta, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Jos kantaja-ainetta käytetään, kontrolliryhmän pitäisi saada korkein määrä kantaja-ainetta.

▼M5

Raja-annostesti

24. Tutkimus usealla annostasolla ei ole ehkä välttämätön, jos myrkyllisyyttä ei havaita annostasolla, joka on ainakin 1 000 mg/painokilo/vrk toistuvan annostelun tutkimuksissa tai jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa rakenteeltaan ja/tai metaboliavaikutuksiltaan samankaltaisista kemikaaleista, jotka ovat metabolisten ominaisuuksien *in vivo/in vitro* osalta samanlaisia, saatujen tietojen perusteella. Tällaisissa tapauksissa pidennetty yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskeva tutkimus voitaisiin toteuttaa käyttämällä kontrolliryhmää ja yhtä annosta, joka on ainakin 1 000 mg/painokilo/vrk. Jos kuitenkin tämän raja-annoksen käytön vuoksi löytyy todisteita lisääntymiseen tai kehitykseen liittyvästä toksisuudesta, lisätutkimuksia alemmilla annostasoilla tarvitaan haitattoman vaikutustason määrittämiseksi. Raja-annostestiä koskevia näkökohtia sovelletaan ainoastaan, jos ihmisten altistumista koskevat tiedot eivät osoita, että korkeampi annostaso on tarpeellinen.

MENETELMÄT

Poikasten altistaminen

25. Suositeltu annostelutapa on altistaminen ravinnon välityksellä. Jos letkuruokintatutkimuksia tehdään, on otettava huomioon, että poikaset saavat testikemikaalia normaalisti ainoastaan epäsuorasti maidon kautta, ennen kuin suora annostus aloitetaan vieroituksen yhteydessä. Tutkimuksissa, joissa testikemikaali annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, poikaset saavat lisäksi testikemikaalia suoraan, kun ne alkavat itse syödä imetysajan viimeisellä viikolla. Muutoksia tutkimuksen suunnitteluun olisi harkittava, jos testikemikaalia erittyy huonosti maitoon ja jos poikasten jatkuvasta altistumisesta ei ole todisteita. Näissä tapauksissa annosten antamista suoraan poikasille imetysaikana olisi harkittava olemassa olevien toksikokineettisten tietojen, poikasten toksisuuden tai biomarkkereiden muutoksien perustella (3)(4). Ennen kuin tehdään tutkimuksia poikasille imetysaikana suoraan annettavista annoksista, olisi harkittava huolellisesti etuja ja haittoja (5).

Annosteluaikataulu ja annosten antaminen

26. Jotain tietoja kiimasykleistä, urosten ja naaraiden lisääntymiselinten histopatologiasta ja kivesten/lisäkivesten siemennesteen analyysista voi olla saatavilla aikaisemmista toistuvan annostelun tutkimuksista, joiden kesto oli riittävä. Ennen sukukypsyysikää annettavan käsittelyn kestolla pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevassa tutkimuksessa pyritään siten havaitsemaan toiminnallisia muutoksia koskevat vaikutukset, jotka voivat häiritä parittelukäyttäytymistä ja hedelmöitystä. Annoksia pitäisi antaa ennen sukukypsyysikää tarpeeksi kauan, jotta saadaan aikaan tasapainoiset P-uroksien ja naaraiden altistusolosuhteet. Kummankin sukupuolen kaksiviikkoinen ennen sukukypsyysikää toteutettava käsittely katsotaan useimmissa tapauksessa riittäväksi. Naaraiden osalta tämä kattaa 3–4 kokonaista kiimasykliä, ja tämän pitäisi riittää havaitsemaan syklille aiheutuvat mahdolliset haittavaikutukset. Urosten osalta tämä vastaa ajanjaksoa, jota tarvitaan kehittyvien siittiöiden kypsymiseen lisäkiveksessä, ja tällä pitäisi voida havainnoida vaikutuksia siemennesteeseen sen jälkeen, kun se kulkeutuu pois kiveksestä (spermiaation loppuvaiheessa ja kypsyessään lisäkiveksessä) pariutumisen yhteydessä. Lopetusvaiheessa, kun suunnitellaan kivesten ja lisäkivesten histopatologista tutkimusta ja analyysia spermaparametreista, P- ja F_1-urokset on altistettu ainakin yhden täydellisen spermatogeneesisyklin ajan ((6)(7)(8)(9) ja OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)).

▼**M5**

27. Kokeita, joissa uroksia altistetaan ennen sukukypsyysikää, voidaan mukauttaa, jos aikaisemmissa tutkimuksissa on selvästi määritelty kiveksille aiheutuvat myrkyllisyysvaikutukset (spermatogeneesin heikentyminen) tai siemennesteen eheydelle ja toiminnalle aiheutuvat vaikutukset. Samoin naaraiden osalta, testikemikaalin tunnetuilla vaikutuksilla kiimasykliin ja siten seksuaaliseen reseptiivisyyteen voidaan perustella erilaisia ennen sukukypsyysikää suoritettavia altistuskokeita. Erityistapauksissa voi olla hyväksyttävää, että P-naaraiden käsittely aloitetaan vasta sen jälkeen, kun saadaan siemennesteen osoittava näyte (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)).

28. Kun pariutumista edeltävä annostelujakso on otettu käyttöön, eläinten pitäisi saada testikemikaalia jatkuvasti seitsemänä päivänä viikossa ruumiinavaukseen saakka. Samaa antotapaa on käytettävä kaikille eläimille. Annosta annetaan edelleen kahden viikon pariutumisjakson aikana ja P-naaraille koko tiineyden ja imetyksen ajan vieroituksen jälkeiseen lopettamispäivään saakka. Uroksille annetaan annos samalla tavalla F_1-eläinten vieroitukseen saakka, jolloin ne lopetetaan. Ruumiinavauksessa etusijalla pitäisi olla naaraat, joille suoritetaan ruumiinavaus samana/samantapaisena imetyspäivänä. Urosten ruumiinavaus voidaan jakaa pidemmälle aikavälille laboratoriotiloista riippuen. Valituille F_1-uroksille ja -naaraille suoraan annettava annos pitäisi aloittaa vieroituksen yhteydessä, ellei sitä jo aloitettu imetyksen aikana, ja sen pitäisi jatkua ruumiinavausajankohtaan kohortin tehtävästä riippuen.

29. Kun testikemikaalit annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalin määrät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annos; käytetty tapa on mainittava.

30. Jos testikemikaali annetaan mahaletkulla, kerralla annettavan nesteen tilavuus ei saa ylittää 1:tä ml/100 g eläimen painoa (öljyä, kuten maissiöljyä, käytettäessä tilavuus saa olla enintään 0,4 ml/100 g eläimen painoa). Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Testiaineen nestemäärän tilavuusvaihtelua olisi minimoitava pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla varmistetaan tilavuudeltaan sama nestemäärä. Annokset annetaan samaan aikaan joka päivä. Kunkin eläinyksilön annoksen tulee yleensä perustua viimeiseen eläimen ruumiin painon määritykseen, ja sitä on mukautettava vähintään viikoittain, kun kyseessä ovat täysikasvuiset urokset ja täysikasvuiset naarat, jotka eivät ole tiineinä, ja kahden päivän välein, kun kyseessä ovat tiineenä olevat naaraat ja F_1-eläimet, jolloin annos annetaan ennen vieroitusta ja kahden viikon ajan vieroituksen jälkeen. Jos toksikokineettiset tiedot osoittavat, että testikemikaali leviää heikosti istukan kautta, letkun kautta annettavaa annosta voidaan joutua mukauttamaan tiineyden viimeisen viikon aikana, jotta emolle ei annostella liian myrkyllistä annosta. Naaraille ei anneta annosta ruokintaletkun tai minkään muun reitin kautta, jos eläintä on käsiteltävä synnytyspäivänä; testikemikaalin antamatta jättäminen kyseisenä päivänä on suositeltavaa, jotta synnytystä ei häiritä.

▼M5

Pariutuminen

31. Kukin P-naaras olisi sijoitettava yhden samasta annosryhmästä satunnaisesti valitun uroksen, joka ei ole samaa alkuperää (1:1 paritus), pariksi siihen saakka, että parituksen voidaan todeta tapahtuneen taikka on kulunut kaksi viikkoa. Jos uroksia ei ole riittävä määrä esimerkiksi uroksen kuoltua ennen paritusta, uros (tai urokset), joka on jo paritellut, voidaan parittaa (1:1) toisen naaraan (toisten naaraiden) kanssa niin, että kaikki naaraat ovat paritelleet. Tiineyspäivä 0 määritellään päiväksi, jolloin todisteet pariutumisesta vahvistetaan (vaginan tulpitus tai sperma havaitaan). Eläimet olisi eroteltava mahdollisimman pian, kun todisteet pariutumisesta vahvistetaan. Jos parittelua ei ole tapahtunut kahden viikon jälkeen, eläimet olisi eroteltava, ja niitä ei enää käytetä paritteluun. Pariutuneet parit olisi selvästi täsmennettävä tiedoissa.

Poikueiden koko

32. Kunkin poikueen kokoa olisi mukautettava syntymän jälkeisenä päivänä 4 poistamalla ylimääräiset poikaset niin, että poikueeseen jää mahdollisimman tarkasti viisi urosta ja neljä naarasta. Poikasten valikoiva poistaminen esimerkiksi ruumiinpainon perusteella ei ole tarkoituksenmukaista. Jos uros- tai naaraspuolisten poikasten määrä on sellainen, että poikueeseen ei jää viittä poikasta kumpaakin sukupuolta, voidaan tehdä osittaismukautus (esimerkiksi kuusi urosta ja neljä naarasta).

Poikasten valitseminen vieroituksen jälkeisiä tutkimuksia varten (ks. kuva 1)

33. Vieroitushetkellä (noin syntymän jälkeinen päivä 21) kaikista saatavilla olevista poikueista valitaan korkeintaan 20 poikasta annos- ja kontrolliryhmää kohti jatkotutkimuksiin ja niitä pidetään siinä sukukypsyysikään saakka (ellei vaadita aiempaa testausta). Poikaset valitaan satunnaisesti, mutta ilmeisen kitukasvuisia eläimiä (eläimiä, joiden ruumiinpaino on enemmän kuin kahden keskihajonnan osalta kunkin poikueen keskimääräistä poikasen painoa alempi) ei pitäisi sisällyttää niihin, koska ne eivät ole todennäköisesti koeryhmän osalta edustavia.

Syntymän jälkeisenä päivänä 21 valitut F_1-poikaset jaetaan kolmeen kohorttiin seuraavasti:

Kohortti 1 (1A ja 1B) = lisääntymiseen ja kehitykseen liittyvän toksisuuden testaaminen

Kohortti 2 (2A ja 2B) = hermostonkehitykseen kohdistuvan toksisuuden testaaminen

Kohortti 3 = immuunijärjestelmän kehitykseen kohdistuvan toksisuuden testaaminen

Kohortti 1A: yksi uros ja yksi naaras/poikue/ryhmä (20/sukupuoli/ryhmä): etusijainen valinta lisääntymiselimille aiheutuvien vaikutusten ja yleisten toksisten vaikutusten ensisijaista arviointia varten.

Kohortti 1B: yksi uros ja yksi naaras/poikue/ryhmä (20/sukupuoli/ryhmä): etusijainen valinta F_1-eläinten lisääntymiselinten toimintaa koskevaa seurantatutkimusta varten, kun tätä tutkitaan (ks. OECD:n ohjeasiakirja 117 (39)); lisäksi pyritään saamaan histopatologisia tietoja tapauksista, joissa epäillään lisääntymis- tai hormonijärjestelmään vaikuttavia toksisia aineita, tai kun kohortin 1A tulokset ovat epävarmoja.

Kohortti 2A: yhteensä 20 poikasta ryhmää kohti (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti; yksi uros ja yksi naaras poikuetta kohti), jotka osoitetaan hermostoperäisiä käyttäytymisoireita koskeviin testeihin, ja sen jälkeen täysikasvuisina neurohistopatologisiin arviointeihin.

Kohortti 2B: yhteensä 20 poikasta ryhmää kohti (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti; yksi uros ja yksi naaras poikuetta kohti), jotka osoitetaan neurohistopatologisiin arviointeihin vieroitusajankohdalla (syntymän jälkeinen päivä 21 tai 22). Jos eläimiä ei ole riittävästi, etusijalle on asetettava eläinten osoittaminen kohorttiin 2A.

▼M5

Kohortti 3: yhteensä 20 poikasta ryhmää kohti (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti; yksi uros ja yksi naaras poikuetta kohti, jos se on mahdollista). Kontrolliryhmästä voidaan tarvita muita poikasia positiivisen kontrollin eläimiksi T-soluriippuvaista vasta-ainevastetta koskevaa testiä varten syntymän jälkeisenä päivänä 56 ± 3.

34. Jos poikueessa ei ole tarpeeksi poikasia kaikkia kohortteja varten, kohortti 1 on etusijalla, koska sitä voidaan laajentaa F_2-sukupolven tuottamiseen. Muita poikasia voidaan osoittaa kaikkiin kohortteihin erityisten syiden vuoksi, esimerkiksi jos kemikaalia epäillään hermostolle, immuunijärjestelmälle tai lisääntymiselle vaaralliseksi aineeksi. Näitä poikasia voidaan käyttää tutkimuksissa eri ajankohtina tai arvioitaessa täydentäviä päätetapahtumia. Poikaset, joita ei ole osoitettu kohortteihin, toimitetaan kliiniseen biokemialliseen määritykseen (55 kohta) ja ruumiinavausta (68 kohta) varten.

P-eläinten toinen parittelu

35. Toista parittelua ei yleensä suositella P-eläimille, koska sen vuoksi menetetään tärkeitä tietoja ensimmäisen poikueen implantaatiopaikkojen määrästä (ja siten implantoinnin jälkeen tapahtuneen tiineyden keskeytymistä ja perinataalikuolemaa koskevista tiedoista, jotka osoittavat mahdollisen teratogeenisuuden). Testikemikaalia saaneille naaraille aiheutuneen vaikutuksen varmentamista tai selventämistä varten olisi parempi, jos tutkimukseen sisällytetään F_1-sukupolven pariutuminen. P-urosten toista parittelua naaraiden, jotka eivät ole saaneet testikemikaalia, kanssa voidaan kuitenkin aina käyttää vaihtoehtona epäselvien havaintojen selventämiseksi tai ensimmäisen parittelun aikana havaittujen hedelmällisyysvaikutusten määrittämiseksi laajemmin.

ELÄVIÄ ELÄIMIÄ KOSKEVAT HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

36. P-eläinten ja valittujen F_1-eläinten osalta tehdään yleiset kliiniset havainnot kerran päivässä. Jos käytetään letkuruokintaa, kliiniset havainnot olisi tehtävä annostelua ennen ja sen jälkeen (mahdollisten plasman huippupitoisuuteen liittyvien toksisuusoireiden vuoksi). Testiin liittyvät käyttäytymistavan muutokset, vaikeat tai pitkittyneet synnytysoireet ja kaikki toksisuusoireet kirjataan. Kahdesti päivässä ja viikonloppuna kerran päivässä havainnoidaan kaikkien eläinten myrkytysvaikutuksia, sairastuvuutta ja kuolleisuutta.

37. Lisäksi kaikkien P- ja F_1-eläinten yksityiskohtaisempi tarkastelu (vieroituksen jälkeen) suoritetaan viikoittain, ja se voidaan tehdä helposti eläintä punnittaessa, millä minimoidaan käsittelyyn liittyvä rasitus. Havainnot on suoritettava tarkkaan ja kirjattava käyttämällä koelaboratorion määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä. Olisi pyrittävä varmistamaan, että testiolosuhteiden muutokset ovat mahdollisimman vähäiset. Kirjattaviin oireisiin sisältyvät, mutta eivät pelkästään, ihon, turkin, silmien, limakalvojen eritteiden eritykseen sekä autonomisen hermoston toimintaan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeava hengitys) liittyvät muutokset. Muutokset käynnissä ja käsittelyyn liittyvässä reaktiivisuudessa sekä klooniset tai tooniset liikkeet, kaavamaiset liikkeet (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) on kirjattava.

▼M5

Eläimen paino ja ravinnon/veden kulutus

38. P-eläimet punnitaan ensimmäisenä altistuspäivänä ja sen jälkeen ainakin viikoittain. Lisäksi P-naaraat punnitaan imetyksen aikana samoina päivinä kuin poikueen poikaset (ks. 44 kohta). Kaikki F_1-eläimet punnitaan yksitellen vieroituksen yhteydessä (syntymän jälkeinen päivä 21) ja sen jälkeen ainakin viikoittain. Ruumiinpaino kirjataan myös päivänä, jolloin poikaset tulevat puberteetti-ikään (esinahka on eronnut tai emätin avautuu). Kaikki eläimet punnitaan lopetettaessa.

39. Tutkimuksen aikana ravinnon ja veden kulutus (jos testikemikaalia annostellaan juomaveden välityksellä) kirjataan ainakin kerran viikossa samoina päivinä kuin eläimen ruumiinpaino (paitsi silloin, kun eläimiä pidetään yhdessä). F_1-eläinten kunkin häkin ravinnon kulutus kirjataan viikoittain aloittaen siitä, kun eläin valitaan kuhunkin kohorttiin.

Kiimasyklit

40. Ennakkotietoja testikemikaalin kiimakierrolle aiheuttamista vaikutuksista voi olla jo saatavilla aikaisemmista toistuvan annostelun tutkimuksista, ja niitä voidaan käyttää, kun kemikaalikohtaista protokollaa suunnitellaan pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevassa tutkimuksessa. Tavanomaisesti kiimakierron arviointi (emättimen solututkimuksilla) aloitetaan käsittelyjakson alussa ja jatketaan, kunnes pariutuminen vahvistetaan tai kahden viikon pituinen pariutumisjakso päättyy. Jos naaraiden normaalia kiimakiertoa on seulottu ennen käsittelyä, niin näytteenottoa on hyödyllistä jatkaa, kun altistus aloitetaan. Jos kuitenkin altistuksen alussa esiintyy huolta epäspesifisistä vaikutuksista (kuten aluksi havaittavasta ravinnon kulutuksen vähentymisestä), eläinten voidaan antaa tottua altistukseen korkeintaan kahden viikon ajan ennen kuin aloitetaan kahden viikon näytteenottoaika, joka johtaa pariutumiseen. Jos naaraan käsittelyjaksoa jatketaan tällä tavoin (eli neljän viikon käsittely ennen parittelua), tämä olisi otettava huomioon siten, että hankitaan nuorempia eläimiä ja jatketaan urosten käsittelyjaksoa ennen parittelua. Emättimen/kohdunkaulan solujen näytteenotossa on varottava limakalvojen vahingoittamista ja siitä seuraavaa valetiineyttä (10)(11).

41. Kohortin 1A F_1-naaraiden emättimen solunäytteitä on tarkasteltava päivittäin emättimen avautumisesta siihen saakka, että ensimmäinen sarveistumisen osoittava näyte kirjataan, jotta näiden kahden tapahtuman aikaväli määritetään. Kaikkien kohortin 1A F_1-naaraiden kiimasykliä olisi myös seurattava kahden viikon ajan syntymän jälkeisestä päivästä 75 alkaen. Lisäksi, jos F_1-sukupolven parittaminen on tarpeen, kohortin 1B emättimen solututkimuksia seurataan paritteluhetkestä siihen saakka, että pariutumisesta saadaan todisteita.

Paritus ja tiineys

42. Vakiomuotoisten päätetapahtumien (kuten ruumiinpaino, ravinnon kulutus, kliiniset havainnot mukaan lukien kuolleisuuden ja sairastuvuuden tarkistaminen) lisäksi kirjataan paritusajankohdat, siemennysajankohta ja synnytysajankohta sekä lasketaan yhdyntää edeltävä väli (parituksesta siemennysajankohtaan) ja tiineyden kesto (siemennysajankohdasta synnytysajankohtaan). P-naaraiden oletetulla synnytysajankohdalla olisi tutkittava huolellisesti kaikki synnytyshäiriöihin viittaavat oireet. Kaikki pesäkäyttäytymiseen tai imetyskykyyn liittyvät poikkeavuudet olisi kirjattava.

▼M5

43. Synnytysajankohta on emolle imetyspäivä 0 ja poikasille syntymän jälkeinen päivä 0. Vaihtoehtoisesti kaikki vertailut voivat myös perustua yhdynnän jälkeiseen ajankohtaan, jotta vältetään sekaannus syntymän jälkeisten kehitystietojen kanssa tiineyden kestoon liittyvien erojen vuoksi; synnytyksen ajoitus olisi myös kirjattava. Tämä on erityisen tärkeää silloin, kuin testikemikaali vaikuttaa tiineyden kestoon.

Poikasia koskevat parametrit

44. Kukin poikue tutkitaan mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen (syntymän jälkeinen päivä 0 tai 1), jolloin määritetään poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena ja elävänä syntyneiden poikasten määrä sekä merkittävien poikkeavuuksien esiintyminen (ulkoisesti havaittavat poikkeamat, kuten suulakihalkio; ihonalainen verenvuoto, epänormaali ihon väri tai pinta; napanuoraa koskevat havainnot, maidon puuttuminen vatsassa; kuivat eritteet). Lisäksi vastasyntyneiden ensimmäiseen kliiniseen tarkasteluun olisi sisällyttävä ruumiin lämpötilan, aktiivisuuden ja käsittelyyn liittyvän reaktiivisuuden kvalitatiivinen arviointi. Poikasista, jotka löydetään kuolleina päivänä 0, on tutkittava mahdolliset kehityshäiriöt ja kuolinsyy. Elävät poikaset lasketaan ja punnitaan kukin erikseen syntymän jälkeisenä päivänä 0 tai 1 sekä säännöllisesti sen jälkeen, ainakin syntymän jälkeisinä päivinä 4, 7, 14 ja 21. Eläimen iän perusteella sovellettavia kliinisiä tutkimuksia olisi toistettava, kun jälkeläisiä punnitaan tai useammin, jos syntymähetkellä on tehty tapauskohtaisia havaintoja. Kirjattaviin oireisiin voivat sisältyä, mutta eivät pelkästään, ulkoiset poikkeavuudet, ihon, turkin, silmien, limakalvojen eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toimintaan liittyvät muutokset. Muutokset käynnissä ja käsittelyyn liittyvässä reaktiivisuudessa sekä klooniset tai tooniset liikkeet, kaavamaiset liikkeet tai omituinen käytös on kirjattava.

45. Peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys on mitattava kultakin poikaselta ainakin kerran syntymän jälkeisen päivän 0 ja 4 välillä. Poikasen ruumiinpaino olisi punnittava samana päivänä, kun peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys mitataan, ja tämä mittaus olisi normalisoitava poikasen koon mittauksen perusteella, mieluiten kuutiojuureen ruumiinpainosta (12). Urosten nännien/nänninpihojen esiintyvyys olisi tarkastettava syntymän jälkeisenä päivänä 12 tai 13.

46. Kaikkien valittujen F_1-eläimentä osalta tarkastellaan päivittäin urosten terskan ja esinahan eroamista tai naaraiden emättimen avautumista. Tämä aloitetaan ennen päivää, jolloin oletetaan, että päätetapahtuma tapahtuu. Näin havainnoidaan, saavutetaanko sukukypsyys varhaisessa vaiheessa. Kaikki sukuelimiin liittyvät poikkeavuudet, kuten pitkittyneet emättimessä olevat haavaumat, hypospadia tai peniksen halkeama, olisi kirjattava. F_1-eläinten sukukypsyyttä verrataan fyysiseen kehitykseen määrittelemällä ikä ja ruumiinpaino ajankohdalla, jolloin urosten terska ja esinahka eroavat toisistaan tai naaraiden emätin avautuu (13).

Hermostonkehitykseen liittyvien myrkyllisyysvaikutusten arviointi (kohortti 2A ja 2B)

47. Kymmenen urosta ja 10 naarasta kohortin 2A eläimistä ja 10 urosta ja 10 naarasta kohortin 2B eläimistä, kummastakin annosryhmästä (kutakin kohorttia kohti yksi uros ja yksi naaras; kaikissa poikueissa on ainakin yksi poikanen; satunnaisesti valittu) olisi käytettävä hermostonkehitykseen liittyvien myrkyllisyysvaikutusten arvioimiseen. Kohortin 2A eläinten osalta olisi tehtävä arvio akustisesta säpsähdysvasteesta, toimintaa ja havainnointia koskeva testisarja sekä motorista aktiviteettia koskevat (ks. 48–50 kohta) ja neuropatologiset arvioinnit (ks. 74–75 kohta). Olisi pyrittävä varmistamaan, että testiolosuhteiden muutokset ovat mahdollisimman vähäiset ja että ne eivät

▼M5

liity järjestelmällisesti käsittelyyn. Muuttujat, jotka voivat vaikuttaa käyttäytymiseen, ovat äänitaso (kuten äkkinäiset kovat äänet), lämpötila, kosteus, valaistusolosuhteet, hajut, ajankohta ja ympäristön häiriötekijät. Hermostonkehitykseen liittyvien myrkyllisyysvaikutusten testien tuloksia olisi tulkittava suhteessa asianmukaisen aikaisemman kontrollin vertailuväleihin. Kohortin 2B eläimiä olisi käytettävä hermostonkehitykseen liittyvien myrkytysvaikutusten arvioinnissa syntymän jälkeisenä päivänä 21 tai 22 (ks. 74–75 kohta).

48. Akustista säpsähdysvastetta koskeva testi olisi suoritettava syntymän jälkeisenä päivänä 24 (± 1 päivä) käyttäen kohorttia 2A. Testauspäivää olisi tasapainotettava annosta saaneiden ryhmien ja kontrolliryhmien välillä. Jokaiseen testikokonaisuuteen sisältyy 50 testiä. Akustista säpsähdysvastetta koskevan testin suorituksessa olisi määriteltävä keskimääräinen vasteamplitudi kussakin 10 testin ryhmässä (viisi 10 testin ryhmää), ja testausolosuhteita olisi optimoitava testijakson sisäisen sopeutumisen aikaansaamiseksi. Näiden menettelyiden olisi oltava yhdenmukaisia testimenetelmän B.53 kanssa (35).

49. Syntymän jälkeisen päivän 63 ja 75 välisellä asianmukaisella ajankohdalla kohortin 2A eläimille suoritetaan toimintaa ja havainnointia koskeva testisarja ja motorista aktiviteettia koskeva automaattinen testi. Näiden menettelyiden olisi oltava yhdenmukaisia testimenetelmän B.43 (33) ja B.53 kanssa (35). Toimintaa ja havainnointia koskevaan testisarjaan sisältyy eläimen ulkonäköä, käyttäytymistä ja toiminnallista eheyttä koskeva yksityiskohtainen kuvaus. Tätä arvioidaan tekemällä havaintoja kotihäkissä, sen jälkeen kun eläin on siirretty havainnointia varten avoimelle kentälle, jossa se liikkuu vapaasti, ja eläinten käsittelyyn liittyvillä testeillä. Testauksen on edettävä vähiten interaktiivisesta eniten interaktiiviseen testiin. Luettelo toimenpiteistä esitetään liitteessä 1. Koulutettujen teknikoiden, jotka eivät ole tietoisia eläinten käsittelytiedoista, olisi havainnoitava tarkasti kaikkia eläimiä, käyttäen standardoituja menettelyitä, joilla vähimmäistetään tarkkailijan ennakkokäsitykset. On suositeltavaa, että eläimiin liittyvät havainnoinnit tietyssä tutkimuksessa tekee sama teknikko, kun tämä on mahdollista. Jos tämä ei ole mahdollista, tarvitaan jotain näyttöä tarkkailijoiden keskinäisen toiminnan luotettavuudesta. Käytöstä mittaavan testisarjan kunkin parametrin osalta käytetään nimenomaisia toiminnallisesti määriteltyjä asteikkoja ja pisteytyskriteerejä. Jos mahdollista, havaintoja koskevia päätetapahtumia, joissa on kyse subjektiivisista sijalukutesteistä, varten olisi kehitettävä objektiivisia määrällisiä toimenpiteitä. Kutakin eläintä testataan erikseen motorisen aktiviteetin osalta. Testikokonaisuuden olisi kestettävä riittävän kauan, jotta kontrolleja varten voidaan osoittaa, että eläin on sopeutunut testeihin. Motorista toimintaa olisi valvottava toimintaa mittaavalla automaattilaitteella, jolla voidaan selvittää toiminnan vähentyminen ja lisääntyminen (eli laitteen mittaaman lähtötilanteen ei pitäisi olla niin alhainen, että toiminnan vähentymisen havaitseminen estetään, eikä niin suuri, että estetään toiminnan lisääntymisen havaitseminen). Kutakin laitetta olisi testattava vakiomuotoisilla menettelyillä, jotta toiminnan luotettavuus varmistetaan mahdollisuuksien mukaan laitteiden ja tutkimuspäivien osalta. Testiryhmiä olisi mahdollisuuksien mukaan tasapainotettava laitteisiin nähden. Testiryhmiä olisi tasapainotettava testiajankohtiin nähden, jotta vältetään häiritsemästä toiminnan vuorokausirytmiä.

50. Jos olemassa olevat tiedot osoittavat, että tarvitaan muuta toimintaa koskevaa testausta (esim. aistien, sosiaalinen tai kognitiivinen testaus), nämä sisällytetään toimiin ilman, että tutkimuksessa käytettyjen muiden arviointien eheyttä häiritään. Jos tällaiset testit suoritetaan samoilla eläimillä, joita on käytetty vakiomuotoisiin akustista säpsähdysvastetta, toimintaa ja havainnointia sekä motorista aktiviteettia koskeviin testeihin, olisi suunniteltava erilaisia testejä, joilla vähimmäistetään riski näiden testien eheyden vaarantamisesta. Täydentävät tutkimukset voivat olla erityisen hyödyllisiä, kun empiiriset havainnot tai ennakoidut vaikutukset taikka menettely/vaikutustapa osoittavat tietyntyyppisen neurotoksisen vaikutuksen.

▼M5

Immuunijärjestelmän kehitykseen kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten arviointi (kohortti 3)

51. Syntymän jälkeisenä päivänä 56 (± 3 päivää) kymmenen urosta ja 10 naarasta kohortin 3 eläimistä kummastakin koeryhmästä (kutakin kohorttia kohti yksi uros ja yksi naaras; kaikissa poikueissa on ainakin yksi poikanen; satunnaisesti valittu poikanen) olisi käytettävä T-soluriippuvaista vasta-ainevastetta koskevaa testiä varten — eli primaarista IgM-vasta-ainevastetta T-soluriippuvaiseen antigeeniin, kuten lampaan punasoluihin (SRBC) tai maljakotilon hemosyaniiniin (keyhole limpet hemocyanin, KLH) –, joka on yhdenmukainen tämänhetkisten immuunijärjestelmään kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten testausmenetelmien kanssa (14)(15). Vastetta voidaan arvioida laskemalla erityiset plakkia muodostavat solut (PFC) pernassa tai määrittämällä ELISA-testissä SRBC- tai KLH-spesifisen IgM-vasta-aineen titteri vastehuipun aikana. Vasteen huippu on tavanomaisesti neljän (PFC-vaste) tai viiden (ELISA-testi) vuorokauden kuluttua laskimonsisäisestä immunisaatiosta. Jos primaarista vasta-ainevastetta testaan laskemalla plakkia muodostavat solut, eläinten alaryhmiä voidaan arvioida eri päivinä edellyttäen, että: alaryhmien immunisaatio ja lopettaminen ajoitetaan siten, että PFC:t lasketaan reaktiohuipun aikana; alaryhmiin sisältyy yhtä monta uros- ja naaraspuolista poikasta kaikista koeryhmistä, mukaan lukien kontrolliryhmät; ja että alaryhmiä arvioidaan suunnilleen samalla syntymän jälkeisellä iällä.Testikemikaalille altistaminen jatkuu ajankohtaan, jolloin perna kerätään PFC-vastetta tai seerumi kerätään ELISA-testiä varten.

Lisääntymiseen mahdollisesti kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten arvioinnin seuranta (kohortti 1B)

52. Kohortin 1B eläinten altistusta voidaan jatkaa syntymän jälkeisen päivän 90 jälkeen ja ne voivat tarvittaessa saada F_2-sukupolven poikasia. Saman annosryhmän urosten ja naaraiden olisi oltava samassa häkissä (välttäen sisarusten parittamista) enintään kahden viikon ajan syntymän jälkeisestä päivästä 90 alkaen tai sen jälkeen, mutta ei kauempaa kuin syntymän jälkeinen päivä 120. Menettelyiden pitäisi olla samankaltaisia kuin mitä sovelletaan P-eläimiin. Näytön perusteella voi kuitenkin riittää, että poikueet lopetetaan syntymän jälkeisenä päivänä 4 sen sijaan, että niitä seurataan vieroitukseen saakka tai sen jälkeen.

LOPETTAMISTA KOSKEVAT NÄKÖKOHDAT

Kliininen biokemia/hematologia

53. P-eläimille aiheutuvia systeemisiä vaikutuksia olisi seurattava. Paaston jälkeisiä verinäytteitä otetaan määritellyistä paikoista kymmeneltä satunnaisesti valitulta P-urokselta ja naaraalta annosryhmää kohti lopetettaessa. Ne säilytetään asianmukaisissa olosuhteissa, ja niille tehdään osittainen tai täysimittainen veritutkimus, kliininen biokemiallinen tutkimus, T4:ää tai TSH:tä mittaava testi tai muita testejä testikemikaalin tunnettuja vaikutuksia koskevan profiilin perusteella (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)). Seuraavia verenkuvan parametreja olisi tarkasteltava: hematokriitti, hemoglobiinipitoisuus, punasolujen määrä, valkosolujen määrä yhteensä ja erittelylaskenta, verihiutaleiden määrä ja veren hyytymisaika ja/tai -potentiaali. Plasman tai seerumin tarkasteluun olisi sisällyttävä: glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, kreatiniini, valkuaisaine yhteensä, albumiini ja ainakin kaksi entsyymiä, jotka osoittavat maksasoluvaikutuksia (kuten alaniiniaminotranferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitranspeptidaasi ja sorbitolidehydrogenaasi). Muiden entsyymien ja sappihappojen mittaus voi tarjota joissain tapauksissa hyödyllistä tietoa. Lisäksi kaikista eläimistä voidaan ottaa

▼M5

verta ja säilyttää sitä mahdolliseen myöhemmin toteutettavaan analyysiin, jolla autetaan selventämään epäselviä vaikutuksia tai tuottamaan sisäistä altistumista koskevia tietoja. Jos P-eläimiä ei aiota parittaa toisen kerran, verinäytteet kerätään juuri ennen tai osana menetelmää suunnitellun lopettamisen yhteydessä. Jos eläimiä ei lopeteta, verinäytteet olisi kerättävä muutama päivä ennen kuin eläimet paritetaan toisen kerran. Elleivät olemassa olevat tiedot toistuvan annostelun tutkimuksista osoita, että testikemikaali ei vaikuta parametreihin, ennen lopettamista olisi tehtävä virtsa-analyysi, ja seuraavia parametreja olisi arvioitava: ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH-arvo, valkuaisaine, glukoosi, veri ja verisolut, solujäte. Virtsaa voidaan myös kerätä testikemikaalin ja/tai metaboliittien erittymisen seurantaa varten.

54. F_1-eläimille aiheutuvia systeemisiä vaikutuksia olisi myös seurattava. Paaston jälkeisiä verinäytteitä otetaan määritellyistä paikoista kymmeneltä satunnaisesti valitulta kohortin 1A urokselta ja naaraalta annosryhmää kohti lopetettaessa. Ne säilytetään asianmukaisissa olosuhteissa, ja niille tehdään vakiomuotoinen kliininen biokemiallinen tutkimus, mukaan lukien kilpirauhashormonien (T4 ja TSH) seerumitason arviointi, veritutkimus (punasolujen ja valkosolujen määrä yhteensä ja erittelylaskenta) ja virtsa-analyysi.

55. Lopuille poikasille tehdään syntymän jälkeisenä päivänä 4 ruumiinavaus. Samalla harkitaan seerumin kilpirauhashormonin (tetrajodityroniini, T4) pitoisuuksien mittaamista. Tarvittaessa vastasyntyneiden (syntymän jälkeinen päivä 4) veri voidaan eritellä poikueittain biokemiallisia/kilpirauhashormonin analyyseja varten. Verta kerätään T4- ja TSH-analyysiin vastavieroitetuilta eläimiltä, joille tehdään ruumiinavaus syntymän jälkeisenä päivänä 22 (F_1-poikasia, joita ei ole valittu kohortteihin).

Siemennestettä koskevat parametrit

56. Kaikkien P-sukupolven urosten siemennestettä koskevia parametreja olisi mitattava, ellei ole tietoja, jotka osoittavat, että näihin parametreihin ei kohdistu vaikutuksia 90 vuorokauden tutkimuksessa. Kaikille kohortin 1A uroksille olisi tehtävä siemennestettä koskevien parametrien tarkastelu.

57. Lopettamisen yhteydessä kaikkien P- ja F_1- (kohortti 1A) urosten kivesten ja lisäkivesten paino kirjataan. Ainakin yksi kives ja yksi lisäkives varataan histopatologista tutkimusta varten. Jäljelle jäänyttä lisäkivestä käytetään lisäkiveksen hännän siemennesteen varastojen määrittelyyn (16)(17). Lisäksi lisäkiveksen hännän (tai siemenjohtimen) siemenneste kerätään käyttämällä menettelyitä, joilla vähimmäistetään siittiöiden liikkuvuuden ja morfologian arvioinnille aiheutuvat vahingot (18).

58. Siittiöiden liikkuvuutta voidaan arvioida välittömästi lopettamisen jälkeen tai tämä voidaan merkitä muistiin myöhempää analyysiä varten. Progressiivisesti liikkuvien siittiöiden prosenttiosuus voidaan määritellä subjektiivisesti tai objektiivisesti tietokoneavusteisella liikkuvuusanalyysilla (19)(20)(21)(22)(23)(24). Siittiöiden morfologista arviota varten lisäkiveksen tai siemenjohtimen siemenneste tutkitaan fiksatiivikäsiteltynä tai märkäpreparaattina (25) ja vähintään 200 siittiötä/näyte luokitetaan joko normaaliksi (pää ja keskiosa/häntä vaikuttavat normaalilta) tai epänormaaliksi. Morfologisiin siemennesteen epänormaaliuksiin kuuluvat siittiöiden fuusio, eristyneet päät sekä päiden tai häntien epämuodostuma (26). Siittiöiden epämuodostuneet tai suuret päät voivat osoittaa kehityshäiriön spermiaatiossa.

59. Jos siittiönäytteet pakastetaan, näytteet fiksoidaan ja siittiöiden liikkuvuuden arviointia koskevat kuvat otetaan talteen ruumiinavaushetkellä (27), myöhempää analyysiä voidaan rajoittaa kontrolliryhmän ja korkean annosryhmän uroksiin. Jos kuitenkin käsittelyyn liittyviä vaikutuksia havaitaan, alempia annosryhmiä olisi myös arvioitava.

▼M5

Ruumiinavaus

60. Kun eläimet lopetetaan tai ne kuolevat testin aikana, kaikille P- ja F_1-eläimille tehdään ruumiinavaus ja ne tutkitaan silmämääräisesti mahdollisten rakenteellisten epämuodostumien tai patologisten muutosten vuoksi. Erityistä huomiota olisi kiinnitettävä lisääntymiselimiin. Kuolemaisillaan olevat inhimillisellä tavalla lopetettavat poikaset ja kuolleet poikaset olisi kirjattava, ja mikäli niiden ruumiin kunto sallii, olisi tutkittava niiden mahdolliset kehityshäiriöt ja/tai kuolinsyy, ja ruumiit säilötään.

61. Täysikasvuisten P- ja F_1-naaraiden osalta emättimen solunäytettä tarkastellaan ruumiinavauspäivänä, jotta kiimasyklin vaihe määritellään ja jotta voidaan mahdollistaa korrelaatio lisääntymiselinten histopatologisen tutkimuksen kanssa. Kaikkien P-sukupolven naaraiden (ja soveltuvin osin F_1-naaraiden) kohdut tutkitaan implantaation esiintyvyyden ja määrän osalta niin, että histopatologista arviointia ei haitata.

Elinten paino ja kudosten säilyttäminen — täysikasvuiset P- ja F_1-eläimet

62. Kun eläin lopetetaan, asiaankuuluvien kohorttien kaikkien P-eläinten ja kaikkien F_1-eläinten ruumiinpaino ja (jäljempänä lueteltujen) elinten märkäpainot määritetään mahdollisimman nopeasti dissektion jälkeen, jotta ne eivät pääse kuivumaan. Näitä elimiä olisi säilytettävä sen jälkeen asianmukaisissa olosuhteissa. Ellei toisin mainita, parilliset elimet voidaan punnita erikseen tai yhdessä, testin suorittavan laboratorion tavanomaisen käytännön mukaisesti.

— kohtu (ja munajohtimet sekä kohdunkaula), munasarjat

— kivekset, lisäkivekset (kokonaispaino ja häntä siittiöiden määrän laskemiseen käytetyissä näytteissä)

— eturauhanen (dorsolateraalinen ja ventraalinen osa yhdessä). Eturauhasen yhdistelmää puhdistettaessa olisi pidettävä huolta, että nestettä sisältäviä rakkularauhaisia ei puhkaista. Jos eturauhasen kokonaispainolle aiheutuu vaikutuksia käsittelystä, dorsolateraalinen ja ventraalinen osa olisi leikattava huolellisesti erilleen fiksaation jälkeen ja punnittava erikseen

— rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa sekä niiden nesteet (yhtenä kokonaisuutena)

— aivot, maksa, munuaiset, sydän, perna, kateenkorva, aivolisäke, kilpirauhanen (fiksaation jälkeen) ja lisämunuaiset sekä määritetyt kohde-elimet ja -kudokset.

63. Edellä mainittujen elinten lisäksi asianmukaisissa olosuhteissa olisi säilytettävä näytteitä seuraavista: ääreishermosto, lihakset, selkäydin, silmät ja näköhermo, maha-suolikanava, virtsarakko, keuhkot, henkitorvi (ja siihen liittyvä kilpirauhanen ja lisäkilpirauhanen), luuydin, siemenjohdin (urokset), rintarauhasen rauhanen (urokset ja naaraat) ja emätin.

64. Kohortin 1A eläinten kaikki elimet punnitaan ja säilytetään histopatologista tutkimusta varten.

65. Ennen syntymää ja sen jälkeen aiheutettujen immunotoksisten vaikutusten tutkintaa varten kymmenelle urokselle ja 10 naaraalle kohortin 1A eläimistä kummastakin annosryhmästä (yksi uros ja yksi naaras poikuetta kohti; kaikissa poikueissa on ainakin yksi poikanen; satunnaisesti valittu poikanen) olisi toteutettava seuraavat toimenpiteet niiden lopettamisen jälkeen:

— punnitaan imusolmukkeet, jotka liittyvät altistumisreittiin ja jotka sijaitsevat siitä etäämmällä (kaikille kohortin 1A eläimille jo tehdyn lisämunuaisten, kateenkorvan ja pernan punnituksen lisäksi)

▼M5

— analysoidaan pernan lymfosyyttien alapopulaatioita (CD4+- ja CD8+-lymfosyytit, T-lymfosyytit, B-lymfosyytit ja luonnolliset tappajasolut) käyttäen pernan yhtä puoliskoa, ja toinen puolisko säilytetään histopatologista arviointia varten.

Pernan lymfosyyttien alaluokkien analyysilla eläimillä, joita ei ole immunisoitu (kohortti 1 A), määritetään, liittyykö altistus muutoksiin ”auttajasolun” (CD4+) tai sytotoksisten (CD8+) kateenkorvasta peräisin olevien lymfosyyttien taikka luonnollisten tappajasolujen immunologisesti vakaassa jakaumassa (nopea reagointi neoplastisiin soluihin ja patogeeneihin).

66. Kohortin 1 B eläinten seuraavat elimet punnitaan ja vastaavat kudokset käsitellään ryhmätasoa varten:

— emätin (ei punnita)

— kohtu ja kohdunkaula

— munasarjat

— kivekset (ainakin yksi)

— lisäkivekset

— rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa

— eturauhanen

— aivolisäke

— määritetyt kohde-elimet.

Kohortin 1B histologinen tutkimus suoritetaan, jos kohortin 1A tulokset ovat epävarmoja tai jos epäillään lisääntymis- tai hormonijärjestelmään vaikuttavia toksisuutta aiheuttavia aineita.

67. Kohortit 2A ja 2B: hermostonkehitykseen kohdistuvan myrkyllisyysvaikutuksen testaaminen (syntymän jälkeinen päivä 21 tai 22 ja täysikasvuiset poikaset). Kohortin 2A eläimet lopetetaan käyttäytymistä mittaavan testin jälkeen, aivojen painot kirjataan ja täydellinen neurohistologinen tutkimus tehdään neurotoksisuutta koskevaa arviota varten. Kohortin 2B eläimet lopetetaan syntymän jälkeisenä päivänä 21 tai 22, aivojen painot kirjataan ja aivoista tehdään mikroskooppitutkimus neurotoksisuutta koskevaa arviota varten. Kohortin 2A eläimille on käytettävä perfuusiofiksaatiota, mikä on vapaaehtoista kohortin 2B eläimille testimenetelmän B.53 mukaisesti (35).

Elinten paino ja kudosten säilyttäminen — vastavieroitetut F_1-eläimet

68. Poikaset, joita ei ole valittu kohortteihin, mukaan lukien kitukasvuiset eläimet, lopetetaan vieroituksen jälkeen syntymän jälkeisenä päivänä 22, elleivät tulokset osoita tarvetta täydentäville elävillä eläimillä tehtäville tutkimuksille. Lopetetuille poikasille tehdään ruumiinavaus mukaan lukien lisääntymiselimiä koskeva arviointi, kuten kuvataan 62 ja 63 kohdassa. Enintään 10 poikaselta sukupuolta ja ryhmää kohti (mahdollisimman monesta poikueesta) punnitaan aivot, perna ja kateenkorva, ja ne säilytetään asianmukaisissa olosuhteissa. Lisäksi näiden uros- ja naaraspuolisten poikasten rintarauhaskudosta voidaan säilyttää täydentävää mikroskooppianalyysia varten ([1]) (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)). Paljain silmin havaittavat poikkeavuudet ja kohdekudokset on säilytettävä mahdollista histologista tutkimusta varten.

([1]) Tutkimuksissa on käynyt ilmi, että rintarauhanen ja erityisesti rintarauhasen kehittyminen varhaisessa kehitysvaiheessa on estrogeenisen toiminnan osalta herkkä päätetapahtuma. On suositeltavaa, että päätetapahtumat, joihin käytetään kumpaakin sukupuolta olevien poikasten rintarauhasia, sisällytetään tähän testimenetelmään, kun se validoidaan.

▼M5

Histopatologia — P-eläimet

69. Edellä 62 ja 63 kohdassa lueteltujen elinten täydellinen histopatologia suoritetaan kaikista suuren annoksen ja kontrolliryhmän P-eläimistä. Ne elimet, joissa todetaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, olisi tutkittava myös kaikilta pienempiä annoksia saavilta eläimiltä, jotta haitaton vaikutustaso voidaan määritellä. Histopatologinen arviointi olisi tehtävä lisäksi kaikista suurista vaurioista sekä kaikista sellaisten eläinten lisääntymiselimistä, joiden hedelmällisyyden epäillään vähentyneen, eli niiden, jotka eivät paritelleet, tulleet tiineiksi, siittäneet tai synnyttäneet terveitä poikasia tai joiden kiimakiertoon tai siittiöiden määrään, liikkuvuuteen tai morfologiaan vaikutettiin.

Histopatologia — F_1-eläimet

Kohortin 1 eläimet

70. Edellä 62 ja 63 kohdassa lueteltujen elinten täydellinen histopatologia suoritetaan kaikista suuren annoksen ryhmän ja täysikasvuisten kontrolliryhmän 1A-eläimistä. Kaikissa poikueissa olisi oltava ainakin 1 poikanen sukupuolta kohti. Elimet ja kudokset, joissa todetaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, ja kaikki suuret vauriot olisi tutkittava myös kaikilta eläimiltä, jotka saavat pienempiä annoksia, jotta voidaan määritellä haitaton vaikutustaso. Syntymää ennen ja sen jälkeen imukudoselimille aiheutettujen vaikutusten arviointia varten myös kerättyjen imusolmukkeiden ja luuytimen histopatologia olisi arvioitava kohorttiin 1A kuuluvalta 10 urokselta ja 10 naaralta kaikkien 1A eläinten keskuudessa tehdyn kateenkorvan, pernan ja lisämunuaisten arvioinnin lisäksi.

71. Kaikkien kohortin 1 B eläinten lisääntymiselinten kudoksia ja endokriinisia kudoksia, jotka on käsitelty 66 kohdassa tarkoitetulle ryhmätasolle, olisi tutkittava histopatologisesti, jos epäillään lisääntymis- tai hormonijärjestelmään vaikuttavia toksisia aineita. Kohortista 1B olisi tehtävä myös histologinen tutkimus, jos kohortin 1A tulokset ovat epäselvät.

72. Täysikasvuisten naaraiden munasarjoihin pitäisi sisältyä varhaismunarakkuloita ja kasvavia munarakkuloita sekä suuria keltarauhasia; tästä syystä histopatologisessa tutkimuksessa on pyrittävä osoittamaan F_1-naaraiden varhaismunarakkuloiden ja pienten kasvavien munarakkuloiden sekä suurten keltarauhasten määrällinen arvio; eläinten määrän, munasarjaleikkeen valinnan sekä leikkeen näytekoon olisi oltava tilastollisesti asiamukainen käytettyyn arviointimenettelyyn nähden. Munarakkuloiden määrä lasketaan ensin kontrolli- ja korkean annoksen ryhmän eläimillä, ja jos jälkimmäisessä ryhmässä esiintyy haitallisia vaikutuksia, olisi tarkasteltava alemman annoksen ryhmiä. Tutkimukseen sisältyy varhaismunarakkuloiden määrän laskenta. Tämä voidaan yhdistää pienten kasvavien munarakkuloiden määrän laskentaan, jotta käsiteltyjä munasarjoja ja kontrolliryhmän munasarjoja voidaan verrata (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)). Keltarauhasen arviointi olisi suoritettava samanaikaisesti kiimakiertoa koskevan testin kanssa, jotta kiimakierron vaihe voidaan ottaa huomioon arvioinnissa. Munajohtimet, kohtu ja emätin tutkitaan asianmukaisen elimelle tyypillisen kehityksen suhteen.

73. F_1-uroksille tehdään yksityiskohtaiset kivesten histopatologiset tutkimukset, jotta käsittelyyn liittyvät vaikutukset kivesten erilaistumiselle ja kehitykselle sekä spermatogeneesille tunnistetaan (38). Jos mahdollista, tutkitaan kiveksen verkon (rete testis) osia. Lisäkiveksen pää, runko ja häntä sekä siemenjohdin tutkitaan elimelle tyypillisen kehityksen suhteen samoin kuin P-uroksilta edellytetyt parametrit.

▼M5

Kohortin 2 eläimet

74. Neurohistopatologinen tutkimus suoritetaan kaikille korkean annoksen ja kontrolliryhmän kohortin 2A eläimille sukupuolta kohden hermostoperäisiä käyttäytymisoireita koskevan testin loppuunsaattamisen jälkeen (syntymän jälkeisen päivän 75 jälkeen, mutta ennen päivää 90). Aivojen histopatologinen tutkimus suoritetaan kaikille korkean annoksen ja kontrolliryhmän kohortin 2A eläimille sukupuolta kohden syntymän jälkeisenä päivänä 21 tai 22. Elimet ja kudokset, joissa todetaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, olisi tutkittava myös kaikilta eläimiltä, jotka ovat pienempiä annoksia saavissa ryhmissä, jotta haitaton vaikutustaso voidaan määritellä. Kohortin 2A ja 2B eläinten osalta olisi tutkittava useita aivojen osia, jotta voidaan tarkastella hajukäämejä, aivokuorta, hippokampusta, tyvitumakkeita, talamusta, hypotalamusta, keskiaivoja (keskiaivojen kattoa, keskiaivojen peitettä ja pikkuaivovarsia), aivorunkoa ja pikkuaivoja. Pelkästään kohortin 2A osalta tarkastellaan silmiä (verkkokalvo ja silmähermo) ja näytteitä ääreishermostosta, lihaksista ja selkäytimestä. Kaikkien neurohistologisten menettelyiden olisi oltava yhdenmukaisia testimenetelmän B.53 kanssa (35).

75. Aivojen edustavista alueista olisi tehtävä morfometriset (kvantitatiiviset) arvioinnit (homologiset kohdat, jotka on valittu huolellisesti luotettavien mikroskooppisten tuntomerkkien perusteella), ja niihin voi sisältyä lineaarinen ja/tai pinta-alaa koskeva mittaus tietyistä aivojen alueista. Kunkin tunnusmerkin (taso) osalta olisi otettava ainakin kolme yhdensuuntaista leikettä, jotta valitaan homologisin ja edustavin osa arvioitavasta tietystä aivon alueesta. Neuropatologin olisi ratkaistava asianmukaisesti, ovatko mittausta varten valmistellut leikkeet homologisia muiden näytteiden kanssa ja voidaanko ne sisällyttää tutkimukseen, koska erityisesti lineaariset mittaustulokset voivat muuttua suhteellisen lyhyellä etäisyydellä (28). Ei-homologisia leikkeitä ei saa käyttää. Tarkoitus on ottaa näytteitä kaikilta tähän tarkoitukseen varatuilta eläimiltä (10/sukupuoli/annosryhmä), mutta pienempi määrä voi silti riittää. Alle kuudelta eläimeltä/sukupuoli/annosryhmä otettavia näytteitä ei pidetä kuitenkaan yleensä riittävänä tätä testimenetelmää varten. Stereologiaa voidaan käyttää täsmentämään testeihin liittyvät vaikutukset, jotka kohdistuvat parametreihin, kuten tiettyjen neuroanatomisten alueiden volyymi tai solumäärä. Kaikissa kudosnäytteiden valmistelua koskevissa toimissa kudosten fiksoinnista kudosnäytteiden dissektioon, kudosten käsittelyyn ja objektilasien värjäykseen saakka olisi käytettävä tasapainottavaa mallia, jotta jokaiseen erään sisältyy edustavia näytteitä kustakin annosryhmästä. Morfometristä tai stereologista analyysia varten aivokudos olisi valettava sopivaan aineeseen kaikilla annostasoilla samaan aikaan, jotta vältetään kutistuneet artefaktit, jotka voivat liittyä pitkäaikaiseen säilytykseen fiksatiivissa.

TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Tiedot

76. Tiedot olisi esitettävä erikseen ja yhteenvetona taulukossa. Kustakin testiryhmästä ja sukupolvesta ilmoitetaan soveltuvissa tapauksissa seuraavaa: eläinten määrä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten määrä, kuoleman tai lopettamisen aika, lisääntymiskykyisten eläinten määrä, tiineiden naaraiden määrä, niiden naaraiden määrä, jotka synnyttävät poikueen ja niiden eläinten määrä, joissa myrkyllisyysvaikutuksia on havaittavissa. Myrkytysoireet olisi kirjattava mukaan lukien oireiden alkamispäivä, kesto ja voimakkuus.

77. Numeeriset tulokset arvioidaan tarkoituksenmukaista ja hyväksyttyä tilastollista menetelmää käyttäen. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimuksen suunnitteluvaiheessa, ja niissä olisi otettava asianmukaisesti huomioon faktuaaliset tiedot (esim. laskutiedot), tiettyjen arvojen määrää mittaavat tiedot (esim. rajoitettu havainnointiaika) ei-riippumattomat tiedot (esim. vaikutukset poikueisiin ja toistetut toimenpiteet) ja erisuuret varianssit. Yleistetyt lineaariset sekamallit ja annosvastemallit kattavat laajan luokan analyyttisiä välineitä, jotka voivat soveltua tästä testimenetelmästä saaduille tiedoille. Raporttiin

▼M5

pitäisi sisältyä riittävästi tietoa analyysimenetelmästä ja käytetystä tietokoneohjelmasta, jotta riippumaton arvioija/tilastoasiantuntija voi niiden avulla arvioida/arvioida uudelleen analyysin.

Tulosten arviointi

78. Löydökset — mukaan lukien ruumiinavauslöydökset ja mikroskooppiset löydökset — on arvioitava havaittujen vaikutusten pohjalta. Arviointiin sisältyy annoksen ja epämuodostumien tai häiriöiden, mukaan lukien vakavat vauriot, esiintyvyyden ja vaikutusten vakavuuden välinen mahdollinen suhde. Kohde-elimiä, vaikutuksia hedelmällisyyteen, kliinisiä häiriöitä, vaikutuksia lisääntymiskykyyn ja poikueen kokoon/laatuun, ruumiinpainon muutoksia, vaikutuksia kuolleisuuteen sekä muita myrkyllisyysvaikutuksia ja kehitysvaikutuksia olisi myös arvioitava. Sukupuolikohtaisiin muutoksiin olisi kiinnitettävä erityistä huomiota. Testikemikaalin fysikokemialliset ominaisuudet ja toksikokineettiset tiedot, kun ne ovat saatavilla, mukaan lukien kemikaalin leviäminen istukan kautta ja maidon erittyminen, olisi otettava huomioon testitulosten arvioinnissa.

Tutkimusseloste

79. Tutkimusselosteen on sisällettävä seuraavat tiedot, jotka on saatu tässä tutkimuksessa P-, F_1- ja F_2-eläimiltä (soveltuvin osin):

Testikemikaali:

— kaikki asianmukaiset saatavilla olevat tiedot testikemikaalin kemiallisista, toksikokineettisista ja toksikodynaamisista ominaisuuksista

— tunnistetiedot

— puhtaus.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji ja kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— toimittaja, häkit, ravinto, pesäntekoaineet ja niin edelleen

— kunkin eläimen paino testin alussa

— P-naaraiden emättimen solunäytetiedot ennen käsittelyn alkua (jos tiedot kerätään tuolloin)

— P-sukupolven paritusta koskevat tiedot, joissa mainitaan uros- ja naaraspuolinen parittelukumppani ja parittelun onnistuminen

— alkuperäispoikuetta koskevat tiedot täysikasvuisista F_1-sukupolven eläimistä

Testiolosuhteet:

— annostasojen valintaperusteet

— yksityiskohdat testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta

▼M5

— valmisteen stabiliteetti ja homogeenisuus kantaja-aineessa tai välittäjässä (esim. ravinto, juomavesi), veressä ja/tai maidossa käyttöä ja varastointia koskevien edellytysten mukaisesti käyttökertojen välillä

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin antotavasta

— muuntokerroin ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudelle (ppm) todelliseen annokseen (mg/painokilo/vrk) nähden (tarvittaessa)

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan lukien ravinnon koostumus, mikäli saatavissa)

— yksityiskohtainen kuvaus satunnaisotosta koskevista menettelyistä, joita käytetään poikasten karsitaan ja kun niitä valitaan koeryhmiin

— ympäristöolosuhteet

— luettelo tutkimushenkilöstöstä mukaan lukien ammatillinen koulutus.

Tulokset (yhteenveto ja yksilökohtaiset tiedot sukupuolittain ja annostason perusteella):

— ravinnonotto sekä nautitun veden määrä, mikäli se on mitattu, ravinnon tehokkuus (ruumiinpainon lisäys nautittua ravintogrammaa kohti lukuun ottamatta sitä aikaa, kun eläimet pidetään yhdessä, ja imetysaikaa) ja saadun testiaineen määrä P- ja F1-eläimillä (ravintoon/juomaveteen sekoitettuna)

— absorptiotiedot (jos mitattu)

— P-eläinten painotiedot

— valittujen F_1-eläinten painotiedot vieroituksen jälkeen

— eläinten kuolinaika tutkimusaikana tai eloonjääneet sen päätyttyä

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (ovatko kumottavissa vai eivät)

— hematologia, virtsa-analyysi ja kliinisen kemian tiedot, mukaan lukien TSH ja T4

— pernan solujen fenotyypin analyysi (T-, B-, tappajasolut)

— luuytimen solujen määrä

— toksista vastetta koskevat tiedot

— niiden P- ja F_1-naaraiden määrä, joilla on normaali tai epänormaali kiimasykli, ja syklin pituus

— pariutumiseen tarvittava aika (yhdyntää edeltävä väli, parituksen ja pariutumisen välisten päivien määrä)

— toksiset ja muut vaikutukset lisääntymiseen, mukaan lukien lukumäärä ja prosenttiosuus eläimistä jotka parittelevat, tulevat tiineiksi, synnyttävät ja imettävät, uroksista, jotka saavat naaraan tiineeksi, ja naaraista, joilla esiintyy merkkejä synnytyshäiriöstä, pitkittyneestä tai vaikeasta synnytyksestä

— tiineyden kesto ja, jos on tietoja, synnytyksen kesto

— implantaatioiden lukumäärä, poikueiden koko ja urospuolisten pentujen prosenttiosuus

— implantaation jälkeen tapahtuneiden tiineyden keskeytymisten, elävänä syntyneiden ja kuolleena syntyneiden lukumäärä ja prosenttiosuus

▼M5

— poikueen paino ja poikasen painotiedot (urokset ja naaraat erikseen sekä kummatkin yhdessä), kitukasvuisten eläinten määrä, jos tämä määritellään

— selvästi näkyvistä epämuodostumista kärsivien poikasten lukumäärä

— toksiset tai muut vaikutukset poikasiin, syntymän jälkeiseen kasvuun, elinkykyyn jne.

— tiedot poikasten fyysisistä kehitysvaiheista ja muut syntymän jälkeiseen kehitykseen liittyvät tiedot

— F_1-eläinten sukukypsyyttä koskevat tiedot

— poikasten ja täysikasvuisten toimintoja koskevat havainnot tarvittaessa

— P-eläinten ja täysikasvuisten F_1-eläinten ruumiinpaino lopettamishetkellä sekä elinten absoluuttinen ja suhteellinen paino

— ruumiinavauslöydökset

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä

— P- ja F_1-sukupolvien urosten lisäkiveksen hännän siittiöiden kokonaismäärä, progressiivisesti liikkuvien siittiöiden prosenttiosuus, morfologisesti normaalien siittiöiden prosenttiosuus ja poikkeavien siittiöiden prosenttiosuus kunkin havaitun poikkeavuuden mukaan

— P- ja F_1-naaraiden munasarjoihin sisältyvien munarakkuloiden määrä ja kypsyysaste tarvittaessa

— F_1-naaraiden munasarjojen keltarauhasten laskenta

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Kohortin 2 parametrit:

— yksityiskohtainen kuvaus menettelyistä, joita käytetään standardoimaan havainnot ja menettelyt sekä operatiiviset määritelmät pisteytykseen liittyville havainnoille

— luettelo kaikista käytetyistä testimenettelyistä ja perustelut niiden käytölle

— yksityiskohtaiset tiedot käytetyistä käyttäytymisoireisiin/toimintaan liittyvistä, neuropatologisista ja morfometrisistä menettelyistä mukaan lukien yksityiskohtaiset tiedot automaattilaitteista

— laitteiden kalibrointia ja vastaavuuden varmistamista koskevat menettelyt ja koeryhmien tasapainottaminen testimenettelyissä

— lyhyt perustelu, jossa selvitetään mahdollisia päätöksiä, joihin liittyy asiantuntija-arvio

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista käyttäytymisoireisiin/toimintaan liittyvistä, neuropatologisista ja morfometrisistä löydöksistä sukupuolen ja annosryhmän perusteella, mukaan lukien kontrolliryhmiä koskevat lisäykset ja vähennykset

— aivojen paino

— havainnot hermostollisista oireista tai vaurioista mukaan lukien luonnollisesti esiintyvät sairaudet tai tilat

— kuvat esimerkkilöydöksistä

— morfometriassa käytettyjen leikkeiden homologian arviointiin käytetyt vähän tehoa kuluttavat kuvat

▼M5

— tulosten tilastollinen käsittely, mukaan lukien tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset mallit ja tulokset riippumatta siitä, olivatko ne merkittävät

— muiden toksisten vaikutusten yhteys testikemikaalin mahdollisesta neurotoksisuudesta tehtyihin johtopäätöksiin sukupuolen ja annosryhmän perusteella

— toksikokineettisten tietojen vaikutus päätelmiin

— testimenetelmän luotettavuutta ja herkkyyttä tukevat tiedot (kuten positiiviset ja aikaisemmat kontrollitiedot)

— mahdolliset suhteet neuropatologisten ja toiminnallisten vaikutusten välillä

— haitaton tai vertailukohtana oleva annos emoille ja poikasille sukupuolen ja annosryhmän perusteella.

— pohdinta tietojen yleisestä tulkinnasta tulosten perusteella, mukaan lukien johtopäätös siitä, aiheuttiko kemikaali hermostonkehitykseen vaikuttavia myrkyllisyysvaikutuksia, ja haitattomasta vaikutustasosta.

Kohortin 3 parametrit:

— seerumin IgM-vasta-aineiden titteri (herkistys SRBC:lle tai KLH:lle) tai pernan IgM:n PFC-yksiköt (herkistys SRBC:lle)

— T-solujen antigeenin reaktiota (TDAR) koskeva menettely pitäisi vahvistaa osaksi optimointiprosessia laboratoriossa, joka suorittaa testin ensimmäisen kerran, ja se olisi toteutettava säännöllisesti (esimerkiksi vuosittain) kaikissa laboratorioissa

— pohdinta tietojen yleisestä tulkinnasta tulosten perusteella, mukaan lukien johtopäätös siitä, aiheuttiko kemikaali immuunijärjestelmän kehitykseen vaikuttavia myrkyllisyysvaikutuksia, ja haitattomasta vaikutustasosta.

Tulosten pohdinta

Päätelmät, mukaan lukien haitatonta vaikutustasoa koskevat arvot poikasia saaneille täysi-ikäisille ja poikasille aiheutuvista vaikutuksista

Kaikki tiedot, joita ei saatu tutkimuksen aikana mutta jotka ovat hyödyllisiä tulosten tulkintaa varten (kuten vaikutusten yhtäläisyydet joihinkin tunnettuihin neurotoksisiin aineisiin), pitäisi myös esittää.

Tulosten tulkinta

80. Pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevassa tutkimuksessa tarjotaan tarvittaessa tietoja toistuvasta altistumisesta kemikaalille lisääntymissyklin kaikissa vaiheissa. Tutkimuksella tarjotaan erityisesti tietoa poikasten lisääntymiselimistä ja kehityksestä, kasvusta, selviytymisestä sekä toiminnallisista päätetapahtumista syntymän jälkeiseen päivään 90 saakka.

81. Tutkimustulosten tulkinnassa olisi otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot kemikaalista, kuten fysikaalis-kemialliset, toksikokineettiset ja toksikodynaamiset ominaisuudet, saatavilla olevat asiaankuuluvat tiedot rakenteeltaan vastaavista aineista ja tulokset aikaisemmin tehdyistä myrkyllisyystutkimuksista, joissa on käytetty testikemikaalia (esim. välitön myrkyllisyys, myrkyllisyys toistuvan käsittelyn jälkeen, mekaaniset tutkimukset tai tutkimukset, joissa arvioidaan, liittyykö metabolisiin ominaisuuksiin *in vivo/in vitro* huomattavia laadullisia ja määrällisiä lajikohtaisia eroja). Ruumiinavausta ja elinten painoja koskevia tuloksia olisi arvioitava muiden toistuvilla annoksilla tehtyjen tutkimusten yhteydessä, kun tämä on mahdollista Poikasten kasvun hidastumista voidaan tarkastella suhteessa testikemikaalin maidon koostumukselle aiheuttamaan vaikutukseen (29).

▼M5

Kohortti 2 (hermostonkehitykseen kohdistuva toksisuus)

82. Hermostoperäisiä käyttäytymisoireita koskevia tuloksia olisi tulkittava kaikkien löydösten yhteydessä käyttäen painoarvoanalyysiä ja asiantuntija-arviota. Käytöstä koskevia tai morfologisia löydöksiä, jos niitä on, sekä annosvasteita koskevaa näyttöä olisi käsiteltävä. Tähän olisi sisällyttävä hermostonkehitykseen vaikuttavien myrkyllisyysvaikutuksien arviointi, mukaan lukien ihmisen epidemiologiset tutkimukset tai tapausselostukset ja koe-eläimillä tehdyt tutkimukset (esim. toksikokineettiset tiedot, rakenne-aktiivisuustiedot, tiedot muista toksisuustutkimuksista). Tietojen arviointiin olisi sisällyttävä pohdinta biologisista ja tilastollisesta merkityksestä. Arviointiin pitäisi sisältyä havaittujen neuropatologisten ja käyttäytymiseen liittyvien muutosten välinen mahdollinen suhde. Ohjeita hermostonkehitykseen kohdistuvaa myrkyllisyysvaikutusta koskevien tulosten tulkinnasta esitetään testimenetelmässä B.53 (35) ja lähteessä Tyl et al., 2008 (31).

Kohortti 3 (Immuunijärjestelmän kehitykseen kohdistuva toksisuus)

83. T-soluriippuvaisella vasta-ainevasteella (TDAR) arvioitavaa immuunitoiminnan suppressiota tai tehostumista olisi arvioitava kaikkien tehtyjen havaintojen yhteydessä. TDAR:in tulosten merkitsevyyttä voivat tukea muut vaikutukset immunologisesti samankaltaisiin indikaattoreihin (kuten luuytimen solut, imukudosten paino ja histopatologia, lymforsyyttien alaryhmien jakautuminen). TDAR:in osoittamat vaikutukset voivat olla vähemmän merkitseviä, jos alemmilla altistuspitoisuuksilla todetaan muita haittavaikutuksia.

84. OECD:n ohjeasiakirjaa 43 olisi käytettävä lisääntymiseen ja hermostonkehitykseen kohdistuviin myrkyllisyysvaikutuksiin liittyvien tulosten tulkinnan apuna (26).

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530–536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87–94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.

▼**M5**

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.

(9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408–415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84–97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383–390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.

(14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103–107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39–44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

▼M5

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), ‘Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer’, *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. s. 319–333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), ‘The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations’, *Journal of Andrology*, 10, 401–415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), ‘Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants’, *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.

(26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), ‘Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility’, *Journal of Andrology*, 8, 330–337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), ‘A “Best Practices” Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today”, *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), ‘Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components’, *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), ‘Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats’, *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717–1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), ‘Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints’, *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.

(32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

(33) Tämän liitteen B.43 luku, ”Neurotoksisuustutkimus jyrsijöillä”.

(34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(35) Tämän liitteen B.53 luku, ”Hermostonkehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia koskeva tutkimus”.

(36) Tämän liitteen B.54 luku, ”Kohtuun aiheutuvien vaikutuksien biologinen määritysmenetelmä jyrsijöillä: lyhytaikainen seulontatesti estrogeenisista ominaisuuksista”

(37) Tämän liitteen B.55 luku, ”Rotilla tehtävä Hershbergerin biotesti: lyhytaikainen seulontatesti androgeenisista (antiandrogeenisista) ominaisuuksista”

▼**M5**

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

(40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼**M5**

Lisäys 1

Toimenpiteet ja havainnot, jotka sisältyvät toimintaa ja havainnointia koskevaan testiin (Kohortti 2A)

Kotihäkissä ja avoimella kentällä	Käsittely	Fysiologia
Asento	Vaivaton siirtäminen	Lämpötila
Tahattomat kouristusliikkeet ja jäykkyys	Vaivaton käsittely	Ruumiinpaino
Luomen sulkeutuminen	Lihaskunto	Pupillien vaste
Karvojen jäykistyminen	Lähestymiseen liittyvä vaste	Pupillien koko
Syljeneritys	Kosketusvaste	
Kyyneleet	Kuulovaste	
Äänteley	Hännänpuristusvaste	
Tukeminen pystyyn	Suoristusvaste	
Epätavallinen käynti	Käpälän leviäminen pudotessa	
Herätysreaktio	Eturaajan puristusvoima	
Kaavamainen liike	Takaraajan puristusvoima	
Omituinen käyttäytyminen		
Laikut		
Epätavallinen hengitys		

▼**M5**

Lisäys 2

MÄÄRITELMÄT:

Kemikaali: aine tai aineiden seos.

Testikemikaali: mikä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

▼M5

B.57. **H295R-STEROIDOGENEESIÄ KOSKEVA TESTI**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 456 (2011). OECD aloitti vuonna 1998 korkean prioriteetin toimenpiteet, jotta voimassa olevia testiohjeita tarkistetaan ja jotta kehitetään uusia ohjeita, joilla mahdollisia hormonaalisia haitta-aiheita seulotaan ja testataan. Vuonna 2002 annettuihin hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeviin OECD:n käsitteellisiin puitteisiin (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) sisältyy viisi tasoa, joista kukin vastaa biologisen monimuotoisuuden eri tasoa (1). Tässä testimenettelyssä kuvatussa H295R-steroidogeneesiä koskevassa testissä *in vitro*, jäljempänä 'H295R-testi', käytetään ihmisen adreno-karsinooma-solulinjaa (NCI-H295R-soluja). Kyseessä on tason 2 *in vitro* -testi, jolla tarjotaan mekanistisia tietoja, joita käytetään seulontaa ja etusijajärjestystä varten. Testin kehittäminen ja standardointi steroidogeneesin kemiallisten vaikutusten seurantaan, erityisesti 17-beeta-estradiolin, jäljempänä 'E2', ja testosteronin, jäljempänä 'T', tuotannon osalta, toteutettiin monivaiheisessa prosessissa. H295R-testiä on optimoitu ja se on validoitu (2)(3)(4)(5).

2. H295R-testin tavoitteena on havaita kemikaalit, jotka vaikuttavat E2:n ja T:n tuotantoon. H295R-testillä on tarkoitus tunnistaa vierasaineet, joiden kohteena ovat ne endogeeniset komponentit, jotka muodostavat solunsisäisen biokemiallisen reitin, joka alkaa reaktiosarjalla kolesterolista E2:n ja/tai T:n tuottamiseen. H295R-testillä ei ole tarkoitus tunnistaa kemikaaleja, jotka vaikuttavat steroidogeneesiin hypotalamusta, aivolisäkettä ja sukupuolirauhasia koskevan akselin (HPG-akseli) vaikutusten vuoksi. Testin tavoitteena on antaa vastaukseksi KYLLÄ tai EI siihen, voiko kemikaali aiheuttaa tai estää T:n ja E2:n tuotannon. Joissain tapauksissa voidaan kuitenkin saada kvantitatiivisia tuloksia (ks. 53 ja 54 kohta) Testin tulokset ilmaistaan suhteellisina muutoksina hormonituotantoon liuotinkontrolleihin verrattuna. Testillä ei pyritä tarjoamaan erityistä mekanistista tietoa testikemikaalin vuorovaikutuksesta umpieritysjärjestelmän kanssa. On tehty tutkimuksia, joissa solulinjoja käytetään havaitsemaan vaikutuksia tiettyihin entsyymeihin ja reaktion välituotteina oleviin hormoneihin, kuten progesteroniin (2).

3. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet määritellään liitteessä. Yksityiskohtainen testiprotokolla, johon sisältyvät tiedot siitä, miten valmistetaan liuoksia, viljellään soluja ja toteutetaan testin eri aspekteja, on saatavilla OECD:n asiakirjassa 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' olevassa liitteessä I–III (4).

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

4. Sukupuolisteroidihormonien biosynteesiin liittyy viisi erilaista entsyymiä, jotka katalysoivat kuusi erilaista reaktiota. Kolesterolin entsymaattinen muuntaminen pregnonoloniksi sytokromin P450 (CYP) kolesterolin sivuketjun pilkkovalla entsyymillä (CYP11A) muodostaa ensimmäisen vaiheen sarjassa biokemiallisia reaktioita, jotka johtavat steroidien lopputuotteiden synteesiin. Seuraavan kahden reaktion järjestyksestä riippuen steroidogeeninen reitti jakaantuu kahteen reittiin, Δ^5-hydroksisteroidi-reittiin ja Δ^4-ketosteroidi-reittiin, jotka lähenevät toisiaan androsteenidionin tuottamiseksi (kuva 1).

5. Androstenedioni muunnetaan testosteroniksi 17β-hydroksisteroididehydrogenaasin välityksellä (17β-HSD). Testosteroni on reaktion välituotteena oleva hormoni ja lopputuote. Urosten osalta T voidaan muuntaa dihydrotestosteroniksi, jäljempänä 'DHT', 5-alfareduktaasilla. Sitä on solukalvoissa, tumakotelossa ja androgeenien kohdekudosten, kuten eturauhasen ja rakkularauhasten endoplasmakalvostoissa. DHT on huomattavasti vahvempi androgeeni kuin T ja sitä pidetään lopputuotteena olevana hormonina. H295R-testissä ei mitata DHT:tä (ks. 10 kohta).

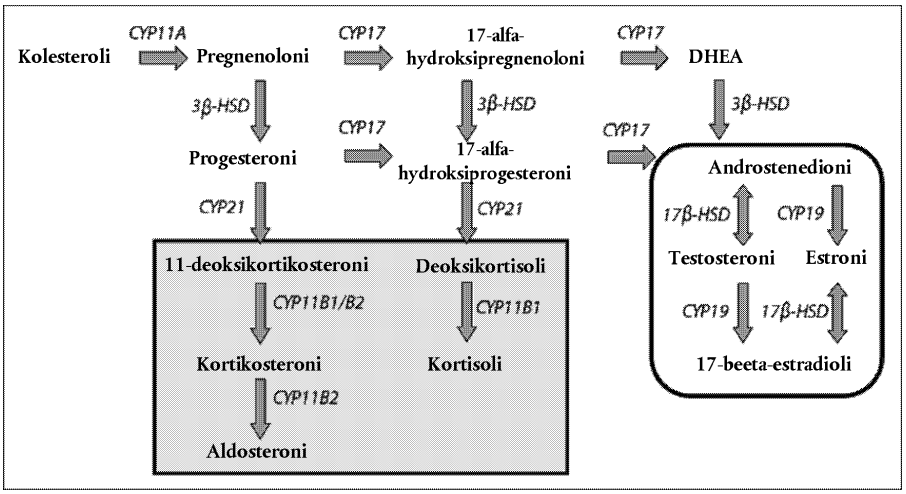
▼M5

6. Steroidogeenisen reitin entsyymi on aromataasi, jäljempänä ’CYP19’. Se muuntaa kemikaalit, joilla on androgeenivaikutus, kemikaaleiksi, joilla on estrogeenivaikutus. CYP19 muuntaa T:n 17β-estradioliksi (E2) ja androstenedionin estroniksi. E2:ta ja T:tä pidetään steroidogeneesin lopputuotteina.

7. CYP17:n lyaasiaktiivisuuden spesifiys eroaa substraattina toimivien välituotteiden osalta lajien välillä. Ihmisellä entsyymi suosii Δ^5-hydroksisteroidi-reitin substraatteja, kuten pregnenoloni, ja rotilla Δ^4-ketosteroidi-reitin substraatteja, kuten progesteroni (19). Tällaiset erot CYP17:n lyaasiaktiivisuudessa voivat selittää eräät lajiriippuvaiset erot reaktiossa kemikaaleihin, jotka muuttavat steroidogeneesiä *in vivo* -olosuhteissa (6). H295-solujen on osoitettu vastaavan parhaiten aikuisen ihmisen lisämunaisen entsyymin ilmentymistä ja steroidituotannon kaavaa (20), mutta niiden tiedetään ilmentävän entsyymejä sekä Δ^5-hydroksisteroidi-reitillä että Δ^4-ketosteroidi-reitillä androgeenisynteesiä varten (7)(11)(13)(15).

Kuva 1

Streoidogeeninen reitti H295R-soluissa



Huom.

Entsyymit on kirjoitettu kursiivilla, hormonit on lihavoitu ja nuolet osoittavat synteesin suunnan. Harmaa tausta osoittaa kortikosteroidin reitit/tuotteet. Sukupuolisteroidireitit/tuotteet on ympyröity. CYP = sytokromi P450; HSD = hydroksisteroididehydrogenaasi; DHEA = dehydroepiandrosteroni.

8. Ihmisen adreno-karsinooma-solulinja on hyödyllinen *in vitro* -malli, jolla selvitetään steroidihormonien synteesin vaikutuksia (2)(7)(8)(9)(10). H295R-solulinja ilmentää geenejä, jotka koodaavat kaikkia steroidogeneesin pääasiallisia entsyymejä, jotka on esitetty edellä (11)(15) (kuva 1). Tämä on ainutlaatuista, koska näiden geenien *in vivo* ilmiasu on kudos, ja se on kehitysvaihespesifinen, ja tavallisesti yhdessäkään kudoksessa tai kehitysvaiheessa ei ilmene kaikkia steroidogeneesiin osallistuvia geenejä (2). H295R-soluilla on ihmisen sikiön erilaistumattomien lisämunuaissolujen fysiologiset ominaisuudet (11). Nämä solut ovat ainutlaatuinen *in vitro* -järjestelmä, koska niillä on mahdollista tuottaa kaikkia aikuisen lisämunuaisten kuoressa ja sukurauhasissa olevia steroidihormoneja. Niillä voidaan siten testata vaikutuksia kumpaankin kortikosteroidin synteesiin ja sukupuolisteroidihormonien, kuten androgeenien ja estrogeenien tuotantoon, vaikka testi validoitiin ainoastaan T:n ja E2:n havainnointia varten. Testijärjestelmässä kirjatut muutokset, jotka liittyvät T:n ja E2:n tuotannon muutoksiin, voivat olla tulos testikemikaalien hyvin erilaisista vuorovaikutuksista steroidogeenisten toimintojen kanssa, joita ilmentävät H295-solut. Näihin sisältyvät steroidihormonien tuotantoon, muuntamiseen tai poistamiseen osallistuvien

▼M5

entsyymien ilmentymisen, synteesin tai toiminnan modulointi (12)(13)(14). Hormonituotannon inhibitio voi johtua suorasta kompetitiivisesta sitoutumisesta entsyymiin reitillä, kofaktoreiden, kuten NADPH:n (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti) ja cAMP:in (syklinen adenosiinimonofosfaatti) vaikutuksesta ja/tai steroidiaineenvaihdunnan lisääntymisestä taikka tiettyjen entsyymien geenien ilmentymisen vaimenemisesta steroidogeneesiä koskevalla reitillä. Vaikka inhibitio voi olla hormonituotannon suoraan ja epäsuoraan prosesseihin liittyvä toiminta, induktio liittyy siihen tyypillisesti epäsuorasti, eli se vaikuttaa kofaktoreiden, kuten NADPH:n ja cAMP:n välityksellä (kuten forskoliinin tapauksessa), steroidiaineenvaihduntaa alentamalla (13) ja/tai se voi johtaa steroidogeenisen geenin ilmentymän ylössäätymiseen.

9. H295R-testillä on useita etuja:

— sillä voidaan havaita T:n ja E2:n tuotannon lisääntyminen ja väheneminen

— sen perusteella voidaan arvioida suoraan kemikaalin mahdollista vaikutusta solujen elinkykyyn/sytotoksisuuteen. Tämä on tärkeä seikka, koska tällä voidaan todeta ero sytotokisuudesta johtuvien vaikutusten ja niiden vaikutusten välillä, jotka johtuvat suorasta vuorovaikutuksesta kemikaaleihin, joilla on steroidogeeninen reitti. Tämä ei ole mahdollista kudosten eksplanttien järjestelmissä, jotka koostuvat useista solutyypeistä, joiden herkkyys ja toiminta vaihtelevat

— se ei edellytä eläinten käyttöä

— H295R-solulinja on saatavissa kaupallisesti.

10. Testin pääasialliset rajoitukset ovat seuraavat:

— sen metabolointikyky on tuntematon, mutta se on luultavasti melko rajallinen; tästä syystä kemikaalit, jotka edellyttävät metabolista aktivointia, jätetään todennäköisesti pois tästä testistä

— koska H295R on peräisin lisämunuaisen kudoksesta, siinä on entsyymejä, jotka voivat tuottaa gluko- ja mineraalikortikoideja sekä sukupuolihormoneja; tästä syystä gluko- ja mineraalikortikoiden tuotannon vaikutus voi vaikuttaa testissä havaittavaan T:n ja E2:n tasoon

— sillä ei mitata DHT:tä ja tästä syystä ei oleteta, että sillä havaitaan kemikaaleja, jotka estävät 5-alfa-reduktaasin, missä tapauksessa voidaan käyttää Hershbergerin testiä (16)

— H295R-testillä ei tunnisteta kemikaaleja, jotka häiritsevät steroidogeneesiä vaikuttamalla hypotalamusta, aivolisäkettä ja sukupuolirauhasia koskevaan akseliin (HPG-akseli), koska tätä voidaan tutkia ainoastaan leikkaamattomilla eläimillä.

TESTIN PERIAATE

11. Testin tarkoituksena on havaita kemikaalit, jotka vaikuttavat T:n ja E2:n tuotantoon. Testosteroni on myös reaktion välituote E2:n tuotantoreitillä. Tällä testillä voidaan havaita kemikaalit, jotka yleensä inhiboivat tai indusoivat stereidogeneesin reitin entsyymejä.

▼M5

12. Testi tehdään yleensä vakiomuotoisissa soluviljelyolosuhteissa käyttämällä 24-kuoppalevyjä. Testin suorittamiseen voidaan käyttää vaihtoehtoisesti muita levykokoja; istutusta ja koeolosuhteita olisi kuitenkin vastaavasti mukautettava, jotta suorituskriteereitä noudatetaan.

13. Soluja sopeutetaan monikuoppalevyillä 24 tunnin ajan, jonka jälkeen ne altistetaan 48 tunnin ajan testikemikaalin seitsemälle pitoisuudelle ainakin kolmena näytekappaleena. Liuotinta sekä hormonituotannon tunnettua inhibiittoria ja indusoijaa käytetään vakiokonsentraatiossa negatiivisena ja positiivisena kontrollina. Altistusjakson jälkeen kasvatusliuos poistetaan kustakin kuopasta. Kunkin kuopan solujen elinkykyä analysoidaan välittömästi kasvatusliuoksen poistamisen jälkeen. Hormonipitoisuus kasvatusliuoksessa voidaan mitata käyttäen erilaisia menetelmiä, kuten kaupallisesti saatavilla olevia hormonimittaussarjoja ja/tai instrumenttitekniikoita, kuten nestekromatografiaa-massaspektrometriaa (LC-MS). Tiedot ilmaistaan kerrannaismuutoksena suhteessa liuotinkontrolliin ja alhaisimman havaittavan vaikutuksen aiheuttavaan pitoisuuteen (LOEC). Jos testi on negatiivinen, korkein testattu pitoisuus ilmoitetaan pitoisuutena, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC). Päätelmän siitä, vaikuttaako kemikaali steroidogeneesiin, olisi perustuttava vähintään kahteen toisistaan riippumattomaan testiin. Ensimmäinen testi voi olla haarukointitesti, jonka jälkeen pitoisuuksia mukautetaan tarvittaessa toista ja kolmatta testiajoa varten, jos havaitaan liukoisuutta tai sytotoksisuutta koskevia ongelmia tai jos kemikaalin aktiivisuus vaikuttaa olevan testattavien pitoisuuksien sarjan loppupäässä.

VILJELMÄÄ KOSKEVA MENETTELY

Solulinja

14. NCI-H295R-solut ovat kaupallisesti saatavilla American Type Culture Collections -organisaatiolta (ATCC) materiaalin siirtosopimuksen allekirjoittamisen jälkeen ([1]).

Johdanto

15. Koska E2:n kapasiteetti tuottaa soluja muuttuu iän/pasaasien myötä (2), solut olisi viljeltävä erityisen menetelmän perusteella, ennen kuin niitä käytetään. Samalla olisi kirjattava pasaasinumero (jakamiskertojen määrä), sen jälkeen kun solut sulatetaan, sekä pasaasinumero, jolloin solut pakastettiin ja säilöttiin nestemäiseen typpeen. Ensimmäinen numero osoittaa todellisen solun pasaasin numeron ja toinen numero sen pasaasin numeron, jolloin solut pakastettiin ja säilöttiin. Esimerkiksi solut, jotka pakastettiin pasaasin viisi jälkeen ja sulatettiin ja jaettiin sen jälkeen kolme kertaa (4 jakamiskertaa, jolloin juuri sulatetut solut lasketaan jakamiskerraksi 1), ennen kuin ne viljeltiin uudelleen, merkittäisiin pasaasinumerolla 4.5. Numerointijärjestelmää koskeva esimerkki sisältyy validointiraportin liitteeseen I (4).

16. Kasvatusliuoksen kantaliuosta käytetään pohjana lopulliselle kasvatusliuokselle ja pakastusliuokselle. Lopullinen kasvatusliuos on tarpeellinen komponentti solujen viljelyssä. Pakastusliuos on suunniteltu niin, että solut voidaan pakastaa ilman, että niille aiheutuu vaikutuksia pitkän aikavälin varastoinnista. Seeruminkorviketta (Nu-serum) (tai vastaavaa seerumia, jolla on samanlaiset ominaisuudet ja jonka on osoitettu tuottavan tietoa, joka on testin suoritusta ja laadunvalvontaa koskevien edellytysten mukainen), joka on lopullisen kasvatusliuoksen ainesosa, olisi analysoitava ennen käyttöä T:n ja E2:n taustapitoisuuksien osalta. Näiden liuosten valmistusta kuvataan validointiraportin liitteessä II (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, Yhdysvallat [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Sen jälkeen, kun alkuperäisen ATCC-sarjan H295R-soluviljelmä otetaan käyttöön, soluja olisi kasvatettava viiden pasaasin ajan (eli solut jaetaan neljä kertaa). Pasaasin viisi solut pakastetaan nestemäiseen typpeen varastointia varten. Ennen kuin solut pakastetaan, näyte edellisen pasaasin 4 soluista tehdään laadunvalvontalevyllä (ks. 36 ja 37 kohta), jotta varmistetaan, täyttävätkö hormonien perustuotanto ja positiivisen kontrollin kemikaalien vaste taulukossa 5 määritellyt testin laadunvalvontakriteerit.

18. H295R-solut on viljeltävä, pakastettava ja säilytettävä nestemäisessä typessä, jotta varmistetaan, että viljelyä ja käyttöä varten on aina pasaasiltaan ja iältään asianmukaisia soluja. Pasaasien enimmäismäärä sen jälkeen, kun viljelyyn on otettua uusien ([1]) tai pakastettujen ([2]) solujen erä, jonka käyttö H295R-testissä on hyväksyttävää, ei saisi ylittää 10 kertaa. Esimerkiksi hyväksyttävä jakamiskerta pakastetusta erästä peräisin olevien solujen viljelmälle jakamiskerralla 5 olisi 4.5 aina jakamiskertaan 10.5 saakka. Näistä pakastetuista eristä kasvatettavien solujen osalta olisi noudatettava 19 kohdassa kuvattua menetelmää. Nämä solut olisi viljeltävä vielä ainakin neljän (4) pasaasin ajan (pasaasinumero 4.5), ennen kuin niitä käytetään testaukseen.

Pakastetusta varastosta peräisin olevat kasvatettavat solut

19. Pakastetusta erästä kasvatettavia soluja koskevaa menettelyä käytetään, kun uusi erä soluja poistetaan nestemäisen typen varastosta viljelyä ja testausta varten. Tämän menettelyn yksityiskohtia kuvataan validointiraportin liitteessä III (4). Solut siirretään nestemäisen typen varastosta, ne sulatetaan nopeasti, sijoitetaan sentrifugiputkeen lopulliseen kasvatusliuokseen, sentrifugoidaan huoneenlämmössä, suspensoidaan jälleen lopulliseen kasvatusliuokseen ja siirretään soluviljelypulloon. Kasvatusliuos pitäisi vaihtaa seuraavana päivänä. H295R-soluja kasvatetaan inkubaattorissa 37 °C:ssa ja ilman seoksessa johon sisältyy 5 % CO_2:ta normaali-ilmanpaineessa. Kasvatusliuos vaihdetaan 2–3 kertaa viikossa. Kun solujen konfluenssi on noin 85–90 %, niiden pitäisi jakautua. Solujen jakaminen on tarpeen, jotta solujen terveys ja kasvu varmistetaan ja jotta niitä ylläpidetään biotestien suorittamista varten. Solut huuhdellaan kolme kertaa fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS, ilman Ca^{2+} Mg^{2+}) ja irrotetaan soluviljelypullosta lisäämällä asianmukaista irrottamiseen tarkoitettua entsyymiä, esimerkiksi trypsiiniä, PBS:ään (ilman Ca^{2+} Mg^{2+}). Välittömästi sen jälkeen kun solut irtoavat soluviljelypullosta, entsyymien toiminta olisi päätettävä lisäämällä lopullista kasvatusliuosta suhteessa 3 × entsyymikäsittelyyn käytetty tilavuus. Solut sijoitetaan sentrifugiputkeen, sentrifugoidaan huoneenlämmössä, supernatantti poistetaan ja solupelletti resuspensoidaan lopulliseen kasvatusliuokseen. Asianmukainen määrä soluliuosta sijoitetaan uuteen soluviljelypulloon. Soluliuoksen määrää olisi mukautettava, jotta solut ovat konfluentteja 5–7 päivän kuluessa. Suositeltu jatkoviljelmien suhde on 1:3–1:4. Levy olisi merkittävä huolellisesti. Soluja voidaan sen jälkeen käyttää testissä ja ylimääräiset solut voidaan pakastaa nestemäiseen typpeen 20 kohdassa tarkoitetulla tavalla.

([1]) Uudella erällä tarkoitetaan ATCC:lta vastaanotettua uutta soluerää.

([2]) Pakastetulla erällä tarkoitetaan soluja, joita on viljelty aikaisemmin ja joita on sen jälkeen pakastettu laboratoriossa, joka ei ole ATCC.

▼M5

H295R-solujen pakastaminen (solujen valmistelu nestemäiseen typpeen varastointia varten)

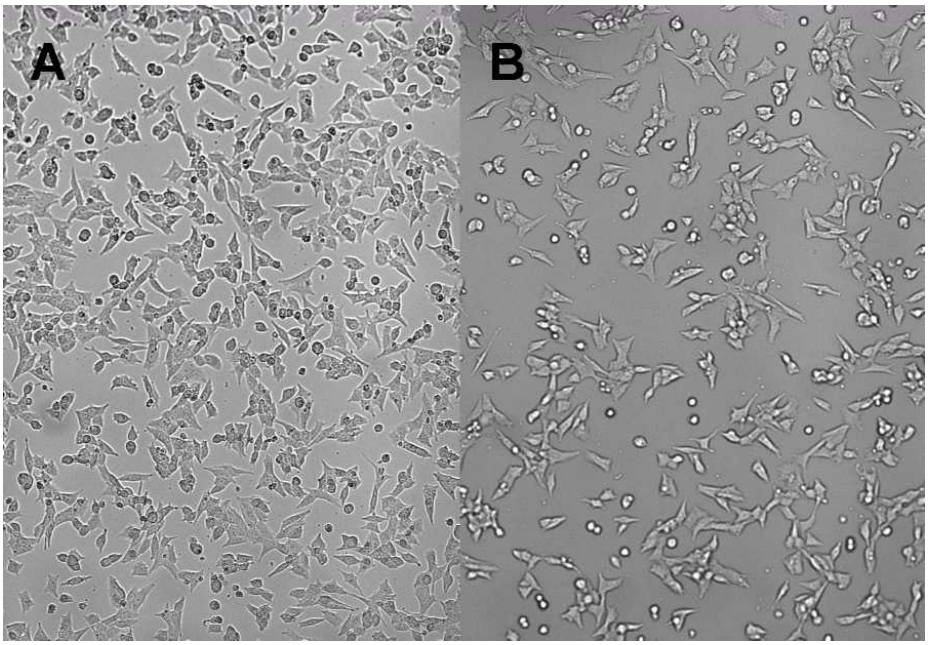
20. H295R-solujen pakastamisen valmistelemiseksi olisi noudatettava edellä esitettyä solujen jakamista koskevaa menettelyä siihen vaiheeseen saakka, että solupelletti resuspendoidaan sentrifugiputken pohjaan. Tämän jälkeen solupelletti resuspendoidaan pakastusliuokseen. Liuos siirretään kryogeeniseen pulloon, se merkitään asianmukaisesti ja jäädytetään – 80 °C:een 24 tunniksi, jonka jälkeen kryogeeninen pullo siirretään nestemäiseen typpiin varastointia varten. Tämän menettelyn yksityiskohtia kuvataan validointiraportin liitteessä III (4).

Levyt ja solujen esi-inkubointi

21. Edellä 19 kohdassa tarkoitetulla tavalla käsiteltyjen 24-kuoppalevyjen tarvittava määrä riippuu testattavien kemikaalien määrästä ja viljelyyn käytettyihin astioihin sisältyvien solujen konfluenssista. Pääsääntöisesti yksi soluviljelypullo (75 cm^2) soluja, joiden konfluenssi on 80–90 %, tuottaa tarpeeksi soluja yhdestä puolelletoista levylle (24-kuoppalevy), ja tavoitetiheys on 200 000–300 000 solua millilitrassa, mikä johtaa arviolta 50–60 % konfluenssiin kuopissa 24 tunnin viljelyn aikana (kuva 2). Tämä on tyypillisesti optimaalinen solutiheys hormonin tuottamiseksi testissä. Korkeammilla tiheysasteilla T:n ja E2:n tuotantotapaa muutetaan. Ennen kuin testi tehdään ensimmäisen kerran, suositellaan, että erilaisia istutustiheyksiä (200 000–300 000 solua millilitraa kohti) testataan ja että näin kuopissa 24 tunnin viljelyn aikana aikaansaatu 50–60 % konfluenssi valitaan lisäkokeita varten.

Kuva 2

Mikrovalokuva H295R-soluista istutustiheydellä 50 % 24-kuoppalevyllä 24 tunnin viljelyn jälkeen otettuna kuopan laidalta (A) ja keskeltä (B)



22. Kasvatusliuos poistetaan pipetillä soluviljelypullosta ja solut huuhdellaan 3 kertaa steriilillä PBS:llä (ilman $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Entsyymiliuosta (joka on sekoitettu PBS:ään) lisätään, jotta solut irtoavat soluviljelypullosta. Sopivan ajan kuluttua siitä, kun solut irtoavat, entsyymien toiminta olisi päätettävä lisäämällä lopullista kasvatusliuosta suhteessa 3 × entsyymikäsittelyyn käytetty tilavuus. Solut sijoitetaan sentrifugiputkeen, sentrifugoidaan huoneenlämmössä, supernatantti poistetaan ja solupelletti suspensoidaan jälleen lopulliseen kasvatusliuokseen. Solutiheys lasketaan käyttäen esimerkiksi

▼M5

hemosytometriä tai solulaskijaa. Soluliuosta olisi laimennettava haluttuun levytiheyteen ja sekoitettava huolellisesti, jotta homogeeninen solutiheys varmistetaan. Solut päällystetään 1 millilitralla soluliuosta kuoppaa kohti, ja levyt ja kuopat merkitään. Istutetut levyt inkuboidaan 37 °C:ssa ja ilman seoksessa, johon sisältyy 5 % CO_2:ta normaali-ilmanpaineessa, 24 tunnin ajan, jotta solut voivat kiinnittyä kuoppiin.

LAADUVALVONTAA KOSKEVAT EDELLYTYKSET

23. On tärkeää, että kuoppiin asetetaan annostuksen aikana liuoksia ja näytteitä tarkka määrä, koska nämä määrät määrittävät pitoisuudet, joita käytetään testitulosten laskennassa.

24. Kunkin laboratorion olisi osoitettava hormonimittausjärjestelmänsä herkkyys ennen soluviljelmän aloittamista ja sitä seuraavia testejä (29–31 kohta).

25. Jos käytetään vasta-aineisiin perustuvia hormonin mittaustestejä, testattavia kemikaaleja olisi analysoitava sen perusteella, mikä on niiden potentiaali häiritä T:n ja E2:n määrän selvittämiseen käytettävää mittausjärjestelmää (siten kuin se esitetään 32 kohdassa) ennen testauksen aloittamista.

26. Testiliuottimeksi suositellaan DMSO:ta. Jos käytetään muuta liuotinta, olisi määriteltävä seuraava:

— testikemikaalin, forskoliinin ja prokloratsin liukoisuus liuottimessa, ja

— sytotoksisuus liuottimen pitoisuuden funktiona.

On suositeltavaa, että suurinta sallittua liuottimen pitoisuutta ei ylitetä niin, että se on laimennusaineena olevan vähiten sytotoksisen liuottimen pitoisuutta yli kymmenen kertaa suurempi.

27. Ennen kuin testi tehdään ensimmäisen kerran, laboratorion olisi tehtävä soveltuvuutta koskeva koe, jossa osoitetaan, että laboratorio pystyy ylläpitämään ja luomaan asianmukaisen soluviljelmän ja testiolosuhteet, joita edellytetään 33–35 kohdassa tarkoitettua kemikaalin testausta varten.

28. Kun testi aloitetaan käyttäen uutta erää, ennen uuden solujen erän käyttämistä olisi käytettävä apuna kontrollikuoppalevyä, jolla arvioidaan solujen tehokkuutta, kuten kuvataan 36 ja 37 kohdassa.

Hormonien mittausjärjestelmän tehokkuus

Menetelmän herkkyys, tarkkuus, täsmällisyys ja ristireaktiivisuus näytematriisin kanssa

29. Kukin laboratorio voi käyttää valitsemaansa hormonien mittausjärjestelmää analysoimaan H295R-solujen tuottamaa T:tä ja E2:ta niin kauan, kuin se täyttää suorituskykyä koskevat kriteerit, kuten määritysrajan. Nämä ovat tavanomaisesti T:n osalta 100 pg/ml ja E2:n osalta 10 pg/ml, ja ne perustuvat validointitutkimuksissa havaittuihin hormonin perustasoihin. Kuitenkin korkeammat tai alemmat tasot voivat olla asianmukaisia riippuen testin suorittavan laboratorioiden saavuttamista hormonien perustasoista. Ennen kuin laadunvalvontalevy tutkitaan ja testiajot suoritetaan, laboratorion olisi osoitettava, että käytettävällä hormonitestillä voidaan mitata hormonien pitoisuuksia lopullisessa kasvatusliuoksessa tarpeeksi tarkasti ja täsmällisesti siten, että testi täyttää taulukossa 1 ja 5 eritellyt laadunvalvontakriteerit, ja

▼M5

se analysoi kasvatusliuosta, johon on lisätty kontrollihormoni. Lopulliseen kasvatusliuokseen lisätään ainakin kolme pitoisuutta kustakin hormonista (eli 100, 500 ja 2 500 pg/ml testosteronia; 10, 50 ja 250 pg/ml E2:ta; tai alhaisimpia mahdollisia pitoisuuksia, jotka perustuvat valitun hormonin mittausjärjestelmän havaitsemisrajoihin, voidaan käyttää T:n ja E2:n alhaisimpia lisättäviä pitoisuuksia varten) ja ne analysoidaan. Näytteiden, joita ei ole uutettu, mitattujen hormonipitoisuuksien olisi oltava alle 30 % nimellisistä pitoisuuksista, ja vaihtelu saman näytteen toisten mittauksien osalta ei saisi ylittää 25:tä prosenttia (ks. myös taulukko 8 täydentävistä laadunvalvontakriteereistä). Jos nämä laadunvalvontakriteerit täytetään, oletetaan, että valittu hormonien mittausta koskeva testi on riittävän tarkka, täsmällinen ja että se ei reagoi ristiin viljelynesteen komponenttien (näytematriisi) kanssa niin, että voidaan olettaa, että sillä vaikutetaan merkittävästi kokeen tulokseen. Tässä tapauksessa näytteitä ei tarvitse uuttaa ennen hormonien mittausta.

30. Jos taulukoissa 1 ja 8 olevat laadunvalvontakriteerit eivät täyty, voi esiintyä merkittävää matriisivaikutusta, ja olisi tehtävä koe uutetulla kasvatusliuoksella, johon on lisätty kontrollihormoni. Uuttamista koskevaan menettelyyn liittyvä esimerkki sisältyy validointiraportin liitteeseen II (4). Uutettujen näytteiden hormonipitoisuuksien mittauksia olisi tehtävä kolme ([1]). Jos voidaan osoittaa, että kasvatusliuoksen komponentit eivät häiritse uuttamisen jälkeen hormonien havaitsemista koskevaa menettelyä, joka määritellään laadunvalvontakriteereissä, kaikki muut kokeet olisi tehtävä käyttäen uutettuja näytteitä. Jos laadunvalvontakriteerejä ei voida täyttää uuttamisen jälkeen, käytetty hormonien mittausjärjestelmä ei sovellu H295R-testin tavoitteita varten. Tässä tapauksessa olisi käytettävä toista hormonien havaitsemista koskevaa menettelyä.

Standardikäyrä

31. Liuotinkontrollin hormonipitoisuuksien olisi oltava standardikäyrän lineaarisen mittausalueen puitteissa. Liuotinkontrollin arvojen pitäisi olla mieluummin lineaarisen mittausalueen keskiosassa, jotta varmistetaan, että hormonisynteesin induktio ja inhibitio voidaan mitata. Mitattavat kasvatusliuoksen laimennokset (tai uutokset) valitaan tämän mukaisesti. Lineaarinen suhde määritellään sopivalla tilastollisella lähestymistavalla.

Kemikaalin interferenssiä koskeva testi

32. Jos vasta-aineisiin perustuvia testejä, kuten entsyymivälitteisiä immunosorbenttimäärityksiä (ELISA-testit) ja radioimmunoanalyysejä käytetään mittaamaan hormoneja, kutakin kemikaalia olisi testattava sen osalta, häiritseekö se mahdollisesti hormonin mittausjärjestelmää, jota käytetään, ennen kuin varsinainen kemikaalien testaus aloitetaan (validointiraportin lisäys III (4)), koska jotkut kemikaalit voivat häiritä näitä testejä (17). Jos esiintyy interferenssiä, jonka vaikutus testosteronin ja/tai E2:n hormonin perustuotannon osalta on ≥ 20 %, kaikkien testikemikaalien kantaliuoksen laimennoksista olisi tehtävä testi, jossa arvioidaan, häiritseekö kemikaali hormonituotantoa

([1]) *Huom.* Jos edellytetään ekstratktiota, kutakin ekstraktiota varten tehdään kolme rinnakkaista mittausta. Kukin näyte otetaan vain kerran.

▼M5

(Chemical Hormone Assay Interference Test) (kuten testi, jota kuvataan validointiraportin liitteessä III (4) olevassa 5.0 kohdassa), ja tunnistettava raja-annos, joka aiheuttaa merkittävän interferenssin (≥ 20 %). Jos interferenssi on alle 30 %, tuloksia voidaan korjata interferenssin osalta. Jos se on yli 30 %, tiedot eivät ole päteviä, ja näitä pitoisuuksia koskevat tiedot on hylättävä. Jos testikemikaali aiheuttaa merkittävää interferenssiä hormonimittausjärjestelmässä enemmän kuin yhdessä ei-sytotoksisessa pitoisuudessa, olisi käytettävä erilaista hormonimittausjärjestelmää. Jotta kemikaaliepäpuhtauksien aiheuttama interferenssi vältetään, suositellaan, että hormonit uutetaan kasvatusliuoksesta sopivaa liuotinta käyttäen. Validointiraportissa esitetään mahdollisia menetelmiä (4).

Taulukko 1

Hormonien mittausjärjestelmien suorituskriteerit

Parametri	Kriteeri
Mittausmenetelmän herkkyys	Määritysraja T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ([a])
Hormonien uuttamistehokkuus (ainoastaan silloin, kun uuttamista tarvitaan)	Keskimääräinen talteenotto (perustuen kolmen näytekappaleen toimenpiteisiin) hormonimäärien, johon on lisätty ainetta, osalta ei saisi poiketa yli 30:tä % määrästä, joka lisättiin.
Kemikaalien aiheuttama interferenssi (ainoastaan vasta-aineisiin perustuvat järjestelmät)	Ei merkittävää (≥ 30 % kyseisen hormonin perustuotannosta) ristireaktiivisuutta minkään solujen tuottaman hormonin kanssa ([b]) ([c])

([a]) *Huom.* Mittausmenetelmän rajat perustuvat taulukossa 5 annetun hormonin perustuotannon arvoihin ja ne ovat tulosperusteiset. Jos voidaan saada aikaan laajempi hormonin perustuotanto, raja voi olla laajempi.

([b]) Jotkut T:n vasta-aineet voivat reagoida ristiin androstendionin ja E2:n vasta-aineet estronin kanssa, jolloin prosenttiosuus on suurempi. Tällaisissa tapauksissa ei ole mahdollista määrittää tarkasti vaikutuksia 17β-hydroksisteroididehydrogenaasille. Näillä tiedoilla voidaan kuitenkin tarjota hyödyllistä tietoa estrogeenin ja androgeenin tuotannon vaikutuksista yleensä. Tällaisissa tapauksissa tiedot olisi ilmaistava androgeenivasteena tai estrogeenivasteena E2:n ja T:n sijasta.

([c]) Näihin sisältyvät: kolesteroli, pregnenoloni, progesteroni, 11-deoksikortikosteroni, kortikosteroni, aldosteroni, 17-alfa-pregnenoloni, 17-alfa-progesteroni, deoksikortisoli, kortisoli, DHEA, androsteenidioni, estroni.

Laboratorion pätevyyttä koskeva testi

33. Laboratorion olisi osoitettava ennen tuntemattomien kemikaalien testausta, että se voi luoda ja ylläpitää asianmukaista soluviljelmää ja testiolosuhteita, joita tarvitaan testin onnistuneeseen suorittamiseen, tekemällä laboratorion pätevyyttä koskevan testin. Koska testin suorittaminen liittyy suoraan testin suorittavan laboratorion henkilöstöön, näitä menettelyjä olisi toistettava osittain, jos laboratorion henkilöstössä tapahtuu muutoksia.

34. Tämä pätevyyttä mittaava testi suoritetaan samoissa olosuhteissa, jotka on esitetty 38–40 kohdassa, niin että solut altistetaan seitsemälle kasvavalle pitoisuudelle voimakkaita, kohtalaisen voimakkaita ja heikkoja induktoreja ja inhibiittoreita sekä negatiiviselle kemikaalille (ks. taulukko 2). Testattaviin kemikaaleihin sisältyvät erityisesti voimakas induktori forskoliini (CAS-nro 66575-29-9); voimakas inhibiittori prokloratsi (CAS-nro 67747-09-5) kohtalaisen voimakas induktori atratsiini (CAS-nro 1912-24-9) kohtalaisen voimakas inhibiittori aminoglutetimidi (CAS-nro 125-84-8); heikko

▼M5

induktori (E2:n tuotanto) ja heikko inhibiittori (T:n tuotanto) bisfenoli A (CAS-nro 80-05-7) ja negatiivinen kemikaali istukkagonadotropiini (hCG) (CAS-nro 9002-61-3), kuten esitetään taulukossa 2. Erillisillä levyillä tehdään testiajo kaikista kemikaalista käyttäen taulukossa 6 esitettyä muotoa. Yksi laadunvalvontalevy (taulukko 4, 36–37 kohta) olisi sisällytettävä jokaiseen päivittäiseen testiajoon pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja varten.

Taulukko 2

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut kemikaalit ja altistuspitoisuudet

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu kemikaali	Testin pitoisuudet (μM)
Prokloratsi	0 ([a]), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskoliini	0 ([a]), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30
Atratsiini	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimidi	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenoli A	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

([a]) Liuotinkontrolli (DMSO) (0), 1 μl DMSO/kuoppa.

H295R:n altistaminen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuille kemikaaleille olisi tehtävä 24-kuoppalevyllä laboratorion pätevyyttä koskevan testin aikana. Annosteluyksikkö on μM kaikissa testikemikaalin annoksissa. Annokset olisi annosteltava DMSO:hon 0,1 % v/v kuoppaa kohti. Kaikkia testipitoisuuksia olisi testattava kolmessa eri kuopassa (taulukko 6). Kustakin kemikaalista tehdään testiajo erillisellä levyllä. Kuhunkin päivittäiseen testiajoon sisältyy yksi laadunvalvontalevy.

35. Solujen elinkykyä ja hormoneja koskevat analyysit olisi suoritettava siten kuin 42–46 kohdassa esitetään. Raja-arvo (alhaisin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus, LOEC) ja luokittelu olisi ilmoitettava ja sitä olisi verrattava taulukossa 3 esitettyihin arvoihin. Tietoja pidetään hyväksyttävinä, jos niissä noudatetaan LOEC-arvoja ja luokittelupäätöstä, joka esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

Raja-arvot (LOEC-arvot) ja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja koskeva luokittelupäätös

	CAS-nro	LOEC (μM)		Luokittelupäätös	
		T	E2	T	E2
Prokloratsi	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([v]) (inhibitio)	+ (inhibitio)
Forskoliini	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (induktio)	+ (induktio)
Atratsiini	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (induktio)	+ (induktio)
Aminoglutetimidi	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibitio)	+ (inhibitio)

▼M5

	CAS-nro	LOEC (μM)		Luokittelupäätös	
		T	E2	T	E2
Bisfenoli A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibitio)	+ (induktio)
HCG	9002-61-3	ei sovelleta	ei sovelleta	negatiivinen	negatiivinen

(v) +, positiivinen
ei sovelleta: Ei sovelleta, koska mitään muutoksia ei pitäisi tapahtua negatiivisen kontrollin ei-sytotoksisille pitoisuuksille altistamisen jälkeen.

Laadunvalvontalevy

36. Laadunvalvontalevyä käytetään varmistamaan H295R-solujen toiminta vakiomuotoisissa soluviljelyolosuhteissa ja laatimaan määritystiedot hormonipitoisuuksille liuotinkontrolleissa, positiivisissa ja negatiivisissa kontrolleissa sekä ajan mittaan suoritettavissa muissa laadunvalvontatoimissa.

— H295R-solujen tehokkuutta olisi testattava käyttämällä laadunvalvontalevyä kustakin uudesta ATCC-erästä, tai sen jälkeen, kun aikaisemmin pakastettuja soluja käytetään ensimmäisen kerran, ellei tälle soluerälle ole tehty laboratorion pätevyyttä koskevaa testiajoa (32–34 kohta).

— Laadunvalvontalevyllä tehdään täydellinen arviointi testiolosuhteista (kuten solujen elinkyky, liuotinkontrollit, negatiiviset ja positiiviset kontrollit sekä testin sisäinen ja testien välinen vaihtelu) kemikaaleja testattaessa, ja sen pitäisi sisältyä kuhunkin testiajoon.

37. Laadunvalvontatesti tehdään 24-kuoppalevyllä. Sen osalta noudatetaan samaa inkubointia, annostusta, solujen elinkykyä/sytotoksisuutta, hormonien uuttamista ja hormonien analyysiä koskevia menettelyitä, joita kuvattiin testikemikaalien osalta 38–46 kohdassa. Laadunvalvontalevyyn sisältyy pelkkää kasvatusliuosta sisältäviä kohtia, liuotinkontrolleja ja kaksi pitoisuutta tunnettua E2:n ja T:n synteesin induktoria (forskoliini, 1 ja 10 μM) ja inhibiittoria (prokloratsi, 0,1 ja 1 μM). Lisäksi MeOH:ia käytetään valituissa kuopissa positiivisena kontrollina elinkykyä/sytotoksisuutta koskevassa testissä. Yksityiskohtainen kuvaus levyn asettelusta esitetään taulukossa 4. Laadunvalvontalevyn osalta täytettävät kriteerit luetellaan taulukossa 5. Hormonin perustuotannon vähimmäismäärä T:n ja E2:n osalta olisi täytettävä liuotinkontrollikuopissa ja nollakoekuopissa.

Taulukko 4

Laadunvalvontalevyn asettelu, jossa testataan altistamattomien H295R-solujen toimintaa ja tunnetuille E2:n ja T:n tuotannon inhibiittoreille (PRO = prokloratsi) ja stimulaattoreille (FOR = forskoliini) altistettuja soluja. Alistamiskokeen päätyttyä ja kasvatusliuoksen poiston jälkeen kaikkiin MeOH-kuoppiin lisätään 70 % metanoliliuosta positiivisena kontrollina sytotoksisuudelle (ks. sytotoksisuutta koskeva koe, validointiraportin lisäys III (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Nollakoe (a)	Nollakoe (a)	Nollakoe (a)	Nollakoe (a) (+ MeOH) (b)	Nollakoe (a) (+ MeOH) (b)	Nollakoe (a) (+ MeOH) (b)
B	DMSO (c) 1 μl	DMSO (c) 1 μl	DMSO (c) 1 μl	DMSO (c) 1 μl (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1 μl (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1 μl (+ MeOH) (b)

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

([a]) Nollakokeen kuoppiin sisältyy pelkästään kasvatusliuosta (eli ei liuotinta).
([b]) Metanoli (MeOH) lisätään altistuksen jälkeen, ja kasvatusliuos poistetaan näistä kuopista.
([c]) DMSO-liuotinkontrolli (1 μl/kuoppa).

Taulukko 5

Laadunvalvontalevyn suorituskriteerit

	T	E2
Hormonin perustuotanto liuotinkontrollissa	≥ 5 kertaa määritysraja	≥ 2,5 kertaa määritysraja
Induktio (10 μM forskoliini)	≥ 1,5 kertaa liuotinkontrolli	≥ 7,5 kertaa liuotinkontrolli
Inhibitio (1μM proklo-ratsi)	≤ 0,5 kertaa liuotinkontrolli	≤ 0,5 kertaa liuotinkontrolli

KEMIKAALIALTISTUSTA KOSKEVA MENETTELY

38. Esi-inkuboinnin jälkeen solut otetaan pois inkubaattorista (21 kohta) ja niitä tarkastellaan mikroskoopilla. Tarkoitus on varmistaa, että ne ovat hyvässä kunnossa (kiinnittyminen, morfologia) ennen annostelua.

39. Solut sijoitetaan biosuojakaappiin, lopullinen kasvatusliuos poistetaan ja korvataan uudella lopullisella kasvatusliuoksella (1 ml/kuoppa). DMSO:ta pidetään parhaana liuottimena tätä testimenetelmää varten. Jos on syitä käyttää muita liuottimia, tieteellisiä perusteita olisi selvitettävä. Solut altistetaan testikemikaalille lisäämällä 1 μl asianmukaista kantaliuosta DMSO:hon (ks. validointiraportin lisäys II (4)) 1 ml lopullista kasvatusliuosta kohti (kuopan tilavuus). Tämän perusteella DMSO:n lopullinen pitoisuus kuopissa on 0,1 %. Riittävän sekoituksen varmistamiseksi yleensä pidetään etusijaisena, että testikemikaalin asianmukaista kantaliuosta DMSO:ssa sekoitetaan lopullisen kasvatusliuoksen kanssa, jotta kunkin annoksen osalta saadaan haluttu lopullinen pitoisuus, ja että seos lisätään kuhunkin kuoppaan välittömästi vanhan lopullisen kasvatusliuoksen poistamisen jälkeen. Jos tätä vaihtoehtoa käytetään, DMSO:n pitoisuuden (0,1 %) pitäisi pysyä tasaisena kaikissa kuopissa. Kuoppia, joihin sisältyy kaksi suurinta pitoisuutta, arvioidaan visuaalisesti saostumien tai sameuden muodostumisen osalta. Tämä on merkki siitä, että testikemikaalin liukoisuus on puutteellista. Arvioinnissa käytetään binokulaariluuppia. Jos tällaisia olosuhteita (saostumat, sameuden muodostumat) havaitaan, tutkitaan myös kuopat, joihin sisältyy alempia pitoisuuksia (ja niin edelleen), ja pitoisuudet, jotka eivät täysin liuenneet liuokseen, poistetaan myöhemmistä arvioinneista ja analyyseistä. Levy siirretään jälleen inkubaattoriin 37 °C:een ja ilman seokseen, johon sisältyy 5 % CO_2:ta normaali-ilmanpaineessa, 48 tunnin ajaksi. Testikemikaalin levyn asettelu esitetään taulukossa 6. Kantaliuokset 1–7 osoittavat testikemikaalin annoksien kasvavan määrän sijainnin.

▼M5

Taulukko 6

Annostelukaava H295R-solujen altistamiselle testikemikaaleilla 24-kuoppalevyllä

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Kantaliuos 4	Kantaliuos 4	Kantaliuos 4
B	Kantaliuos 1	Kantaliuos 1	Kantaliuos 1	Kantaliuos 5	Kantaliuos 5	Kantaliuos 5
C	Kantaliuos 2	Kantaliuos 2	Kantaliuos 2	Kantaliuos 6	Kantaliuos 6	Kantaliuos 6
D	Kantaliuos 3	Kantaliuos 3	Kantaliuos 3	Kantaliuos 7	Kantaliuos 7	Kantaliuos 7

40. Altistukseen käytetyt levyt poistetaan inkubaattorista 48 tunnin jälkeen ja jokainen levy tutkitaan mikroskoopilla solujen kunnon (kiinnittyminen, morfologia, solutiheys) ja sytotoksisuutta koskevien merkkien osalta. Kunkin kuopan kasvatusliuos jaetaan kahteen yhtä suureen annokseen (kukin noin 490 µl) ja siirretään kahteen erilliseen asianmukaisesti merkittyyn pulloon (eli yhtenä eränä, jotta kutakin kuoppaa varten tarjotaan ylimääräinen näyte). Kasvatusliuos poistetaan solujen kuivumisen estämiseksi vaaka- tai pystyrivi kerrallaan ja korvataan kasvatusliuoksella, joka on tarkoitettu solun elinkykyä/sytotoksisuutta koskevaan testiin. Jos solun elinkykyä/sytotoksisuutta ei mitata välittömästi, kuhunkin kuoppaan lisätään 200 µl PBS:ää, johon sisältyy Ca^{2+} ja Mg^{2+}. Kasvatusliuokset pakastetaan – 80 °C:een jatkokäsittelyyn, jossa analysoidaan hormonien pitoisuuksia (ks. 44–46 kohta). Kasvatusliuoksessa – 80 °C:een pakastettu T ja E2 pysyy yleensä vakaana ainakin kolme kuukautta, ja kussakin laboratoriossa olisi dokumentoitava hormonien vakautta varastoinnin aikana.

41. Välittömästi kasvatusliuoksesta poistamisen jälkeen kunkin altistukseen käytetyn levyn solujen elinkyky/sytotoksisuus arvioidaan.

Solujen elinkyvyn määrittäminen

42. Solujen elinkykyä/sytotoksisuutta koskevaa testiä voidaan käyttää määrittämään testikemikaalin potentiaalinen vaikutus solujen elinkykyyn. Testillä pitäisi pystyä tarjoamaan todellinen järjestelmä kuopassa olevien elinkykyisten solujen (elävien solujen) prosenttiosuuden määrittämiseksi, tai sillä pitäisi osoittaa, että se on suoraan verrattavissa Live/Dead®-testiin (sen lineaariseen funktioon) (ks. validointiraportin lisäys III (4)). Vaihtoehtoinen testi, jonka on osoitettu toimivan yhtä hyvin, on MTT-testi (3-(4,5-dimetyylitiatsoli-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi-testi) (18). Solujen elinkyvyn (elävien solujen) arviointi edellä esitettyjä menetelmiä soveltamalla on suhteellinen mittaus, joka ei välttämättä osoita lineaarisia suhteita kuopan solujen absoluuttisen määrän kanssa. Tästä syystä analyysin suorittajan olisi tehtävä samanaikainen subjektiivinen silmämääräinen arvio kustakin kuopasta. Liuotinkontrolleista ja kahdesta suurimmasta ei-sytotoksisesta pitoisuudesta olisi otettava digitaalikuvia ja ne olisi arkistoitava, jotta myöhemmin voidaan arvioida todellista solutiheyttä, jos tätä edellytetään. Jos silmämääräinen arvio tai elinkykyyn/sytotoksisuutta koskeva testi osoittaa, että solujen määrä on nähtävästi lisääntynyt, tämä on tarkistettava. Jos solujen määrän lisääntyminen tarkistetaan, tämä olisi mainittava tutkimusselosteessa. Solujen elinkyky ilmaistaan suhteessa liuotinkontrollien keskimääräiseen vasteeseen, missä elinkykyisten (elävien) solujen osuus on 100 %. Tämä lasketaan tarvittaessa käytettyä solujen elinkykyä/sytotoksisuutta koskevaa testiä varten. MTT-testin osalta voidaan käyttää seuraavaa kaavaa:

▼M5

% elinkykyisiä (eläviä) soluja = (vaste kuopassa – keskimääräinen MeOH-käsitellyssä (= 100 % kuolleita) kuopissa) ÷ (keskimääräinen vaste liuotinkontrollin kuopissa – keskimääräinen vaste MeOH-käsitellyissä (= 100 % kuolleita) kuopissa)

43. Kuoppia, joissa elävien solujen osuus on 80 % alhaisempi kuin liuotinkontrollin kuoppien keskimääräinen elinkyky (= 100 % eläviä soluja), ei pitäisi sisällyttää lopulliseen tietojen analyysiin. Steroidogeneesin inhibitiota, jota esiintyy, kun sytotoksisuus on lähes 20 %, olisi arvioitava huolellisesti, jotta varmistetaan, ettei sytotoksisuus ole syy inhibitioon.

Hormonien analyysi

44. Kukin laboratorio voi käyttää valitsemaansa hormonien mittausjärjestelmää T:n ja E2:n analyysiin. Kasvatusliuoksen ylimääräisiä eriä kustakin koeryhmästä voidaan käyttää valmistelemaan laimennoksia, jotta pitoisuus saadaan sisällytettyä standardikäyrän lineaarisen osan puitteisiin. Kuten 29 kohdassa todettiin, kaikkien laboratorion olisi osoitettava, että niiden hormonimittaukseen käytetty järjestelmä (kuten ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) täyttää laadunvalvontakriteerit siten, että siinä analysoidaan lopullista kasvatusliuosta — johon on lisätty kontrollihormoni –, ennen kuin laadunvalvontaa koskevat testiajot tai kemikaalien testaus suoritetaan. Jotta varmistetaan, että testijärjestelmän komponentit eivät häiritse hormonimittausta, hormonit voidaan joutua uuttamaan kasvatusliuoksesta ennen mittausta (ks. 30 kohta olosuhteista, joiden vallitessa siirtoa edellytetään tai sitä ei edellytetä). On suositeltavaa, että uuttaminen suoritetaan validointiraportin liitteessä III (4) tarkoitettuja menettelyitä noudattaen.

45. Jos hormonituotannon mittaukseen käytetään kaupallista testipakkausta, hormonianalyysi olisi suoritettava testipakkauksen valmistajan antaman käsikirjan mukaisesti. Useimmilla valmistajilla on oma menettely, jolla hormonianalyysit suoritetaan. Näytteiden laimennoksia on muutettava niin, että liuotinkontrollin odotettavissa olevat hormonipitoisuudet sijoittuvat yksittäisen testin standardikäyrän lineaarisen mittausalueen keskelle (validointiraportin lisäys III (4)). Standardikäyrän lineaarisen mittausalueen ulkopuolella olevat arvot olisi hylättävä.

46. Lopulliset hormonipitoisuudet lasketaan seuraavasti:

Esimerkki:

Uutettu:	450 µl kasvatusliuosta
Sekoitetaan määrään:	250 µl testin puskuriainetta
Laimennus testissä:	1:10 (näyte tuodaan standardikäyrän lineaarisen mittausalueen sisälle)
Hormonien pitoisuus testissä:	150 pg/ml (on jo mukautettu pitoisuuteen ml testattua näytettä kohti)
Talteenotto:	89 %
Lopullinen hormonipitoisuus =	(Hormonipitoisuus (ml kohti) ÷ talteenotto) (laimennustekijä)
Lopullinen hormonipitoisuus =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Testipitoisuuksien valinta

47. Olisi tehtävä ainakin kaksi toisistaan riippumatonta testiajoa. Ellei ennakkoon saatavilla olevissa tiedoissa, jotka liittyvät esimerkiksi liukoisuusraja-arvoihin tai sytotoksisuuteen, tarjota perustaa testipitoisuuksien valinnalle, suositellaan, että ensimmäisen testiajon testipitoisuudet sijoitetaan logaritmisin välein $\log_{10}$, jossa 10^{-3} M on maksimipitoisuus. Jos kemikaali liukenee ja se ei ole sytotoksinen missään testatussa pitoisuudessa ja ensimmäinen testiajo oli kaikkien pitoisuuksien osalta negatiivinen, tämä tulisi vahvistaa vielä yhdessä testiajossa soveltaen samoja edellytyksiä kuin ensimmäisessä testiajossa (taulukko 7). Jos ensimmäisen testiajon tulokset ovat *epävarmoja* (eli kerrannaismuutos on tilastollisesti merkitsevä liuotinkontrolliin nähden ainoastaan yhdessä pitoisuudessa) tai positiivinen (eli kerrannaismuutos kahdessa tai useammassa vierekkäisessä pitoisuudessa on tilastollisesti merkittävä), testi olisi toistettava taulukossa 7 esitetyllä tavalla mukauttamalla valittuja testipitoisuuksia. Testipitoisuuksia testiajoissa kaksi ja kolme (jos ne tehdään) olisi mukautettava ensimmäisen testiajon sellaisten näytepitoisuuksien perusteella, jotka aiheuttivat vaikutuksia puolen log:n pitoisuusvälejä käyttämällä (eli jos alkuperäinen testiajo pitoisuuksilla 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM johti induktioihin 1 ja 10 μM käsittelypitoisuuksilla, toisella testiajolla testattavien pitoisuuksien olisi oltava 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), ellei alempia pitoisuuksia pidä käyttää alhaisimman havaittavan vaikutuksen aiheuttavan pitoisuuden saavuttamiseksi. Jälkimmäisessä tapauksessa ainakin viittä pitoisuutta, jotka alittavat ensimmäisessä testiajossa testatun alimman pitoisuuden, olisi käytettävä toisessa testiajossa käyttäen puolen log:n välejä. Jos toisessa testiajossa ei vahvisteta ensimmäistä testiajoa (eli tilastollista merkitsevyyttä ei esiinny aikaisemmin positiiviseksi testatussa pitoisuudessa ± 1 pitoisuuden lisäys), kolmas koe voidaan suorittaa käyttäen alkuperäisiä testiolosuhteita. Epäselviä tuloksia ensimmäisessä testiajossa pidetään negatiivisina, jos havaittua vaikutusta ei voida vahvistaa missään kahdessa peräkkäisessä testiajossa. Epäselviä tuloksia pidetään positiivisina vasteina (vaikutus), kun vaste voidaan vahvistaa ainakin yhdessä muussa testiajossa, jossa on ± 1 pitoisuuden lisäys (ks. 55 kohta tietojen tulkintaa koskevan menettelyn osalta)

Taulukko 7

Päätösmatriisi mahdollisille tuloksia koskeville skenaarioille

Testiajo 1	Testiajo 2		Testiajo 3		Päätös	
Skenaario	Päätös	Skenaario	Päätös	Skenaario	Myönteinen	Kielteinen
Negatiivinen	Vahvista ([a])	Negatiivinen	Lopeta			X
Negatiivinen	Vahvista ([a])	Positiivinen	Tarkenna ([b])	Negatiivinen		X
Epäselvä ([c])	Tarkenna ([b])	Negatiivinen	Vahvista ([a])	Negatiivinen		X
Epäselvä ([c])	Tarkenna ([b])	Negatiivinen	Vahvista ([a])	Positiivinen	X	
Epäselvä ([c])	Tarkenna ([b])	Positiivinen			X	
Positiivinen	Tarkenna ([b])	Negatiivinen	Vahvista ([a])	Positiivinen	X	

▼M5

Testiajo 1	Testiajo 2		Testiajo 3		Päätös	
Skenaario	Päätös	Skenaario	Päätös	Skenaario	Myönteinen	Kielteinen
Negatiivinen	Vahvista ([b])	Positiivinen	Tarkenna ([b])	Positiivinen	X	
Positiivinen	Tarkenna ([b])	Positiivinen	Lopeta		X	

([a]) Vahvista edellinen testiajo käyttämällä samaa koesuunnittelua.
([b]) Tee uusi testiajo käyttäen puolen login pitoisuusvälejä (ryhmitä pitoisuudet, joiden testi erosi huomattavasti edellisessä kokeessa).
([c]) Kerrannaismuutos yhdessä pitoisuudessa poikkeaa tilastollisesti merkitsevästi liuotinkontrollista.

Laadunvalvonta testilevyllä

48. Sen lisäksi, että laadunvalvontalevyn kriteerit täyttyvät, muut laadunvalvontakriteerit, jotka koskevat hyväksyttävää vaihtelua rinnakkaisten levyjen välillä, rinnakkaisia kokeita, hormonien mittausjärjestelmien lineaarisuutta ja herkkyyttä, samaa näytettä koskevien rinnakkaisten hormonien mittausten vaihtelua ja hormonilisäyksien talteenottoprosenttia kasvatusliuoksen uuttamisen jälkeen (jos tämä tehdään, katso 30 kohta uuttamista koskevista vaatimuksista), olisi täytettävä, ja ne esitetään taulukossa 8. Tietojen pitäisi sopia hyväksyttäviin vertailuväleihin, jotka määritellään kutakin sellaista parametria kohden, jota tarkastellaan täydentävää arviointia varten. Jos nämä kriteerit eivät täyty, taulukossa olisi todettava, että kyseinen näyte ei täytä laadunvalvontakriteerejä, ja näytettä olisi analysoitava uudelleen tai se olisi poistettava tietokokonaisuudesta.

Taulukko 8

Hyväksyttävät vertailuvälit ja/tai vaihtelu (%) H295R-testin testilevyn parametreja varten.

LOQ: hormonien mittausjärjestelmän määritysraja. CV: variaatiokerroin; SC: liuotinkontrolli; DPM: hajoaminen minuuttia kohti (disintegration per minute)

	Vertailu välillä	T	E2
Hormonin perustuotanto liuotinkontrollissa	Kertaväli suurempi kuin LOQ	≥ 5-kertainen	≥ 2,5-kertainen
Altistuskokeet — levyllä, variaatiokerroin liuotinkontrolleja varten (rinnakkaiset levyt)	Absoluuttiset pitoisuudet	≤ 30 %	≤ 30 %
Altistuskokeet — levyjen välillä, variaatiokerroin liuotinkontrolleja varten (toistetut kokeet)	Kerrannaismuutos	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonien mittausmenetelmän herkkyys	Liuotinkontrolliin liittyvä havaittavissa oleva kertavähennys	≥ 5-kertainen	≥ 2,5-kertainen
Hormonien mittausmenetelmä — toistetut toimenpiteet, variaatiokerroin liotinkontrolleja varten ([a])	Absoluuttiset pitoisuudet	≤ 25 %	≤ 25 %
Kasvatusliuoksen uuttaminen — sisäisen 3H-standardin uudelleenkäyttö (jos sovelletaan)	DPM	≥ 65 % nimellinen	

([a]) Viittaa samaa näytettä koskeviin toistettuihin toimenpiteisiin.

▼M5

TIETOJEN ANALYSOINTI JA RAPORTOINTI

Tietojen analysointi

49. Kemiallisesti muunnetun hormonintuotannon suhteellisen lisäyksen/vähennyksen arvioimiseksi tuloksia olisi normalisoitava kunkin testilevyn liuotinkontrollin keskiarvoon nähden, ja tulokset olisi ilmaistava muutoksena suhteessa liuotinkontrolliin kullakin testilevyllä. Kaikki tiedot ilmaistaan keskimääräisenä ± 1 keskihajontana.

50. Ainoastaan hormonitiedot kuopista, joissa sytotoksisuus on alle 20 %, pitäisi sisällyttää tietojen analysointiin. Suhteelliset muutokset lasketaan seuraavasti:

Suhteellinen muutos = (hormonien pitoisuus kussakin kuopassa) ÷ (keskimääräinen hormonipitoisuus kaikissa liuotinkontrollin kuopissa).

51. Jos kuopan silmämääräinen tutkimus tai 42 kohdassa kuvattu elinkykyä/sytotoksisuutta koskeva testi osoittaa, että solujen määrä on nähtävästi lisääntynyt, tämä on tarkistettava. Jos solujen määrän lisääntyminen tarkistetaan, tämä olisi mainittava tutkimusselosteessa.

52. Ennen tilastoanalyysien tekoa oletuksia normaalisuudesta ja varianssien homogeenisuudesta olisi arvioitava. Normaalisuutta olisi arvioitava käyttämällä tavallisia todennäköisyyskuvioita tai muita asianmukaisia tilastotieteellisiä menetelmiä (kuten Shapiron-Wilkin testi). Jos tiedot (kertamuutokset) eivät jakaudu normaalisti, tietoja olisi pyrittävä mukauttamaan lähelle normaalia jakaumaa. Jos tiedot jakautuvat normaalisti tai ovat lähellä normaalia jakaumaa, kemikaalipitoisuutta koskevien ryhmien ja liuotinkontrollien välisiä eroja olisi analysoitava käyttämällä parametrista testiä (kuten Dunnettin testiä), jossa *pitoisuus* on riippumaton muuttuja ja *vaste* (kertamuutos) on riippuva muuttuja. Jos tiedot eivät jakaudu normaalisti, olisi käytettävä asianmukaista ei-parametrista testiä (kuten Kruskal Wallis -testiä, Steel's Many-one rank -testiä) Eroja pidetään merkitsevinä, kun $p \leq 0{,}05$. Tilastollisia arviointeja tehdään kunkin kuopan keskimääräisten arvojen perusteella. Ne edustavat riippumattomia kaksoismääritettyjä datapisteitä. On odotettavissa, että ensimmäisen testiajon annosten suuren välin ($\log_{10}$-asteikko) vuoksi monissa tapauksissa ei ole mahdollista määritellä selvää pitoisuus-vaste-suhdetta, jossa kaksi suurinta annosta on sigmoidikäyrän lineaarisessa osassa. Tästä syystä ensimmäisessä testiajossa tai kaikissa muissa tietojen kartoitustoimissa, missä tämä olosuhde esiintyy (eli missä ei voida arvioida suurinta tehokkuutta), sovelletaan edellä mainitut tyypin 1 kiinteitä muuttujia koskevia tilastotietoja.

53. Jos enemmän kuin kaksi datapistettä on käyrän lineaarisessa osassa ja jos suurin tehokkuus voidaan laskea — kuten on odotettavissa joissakin toisissa testiajoissa, jotka suoritetaan käyttäen puolen login pitoisuusvälejä — todellisten pitoisuuksien laskentaan olisi käytettävä probitti- tai logittimallia taikka muuta asiaankuuluvaa regressiomallia (kuten EC50 ja EC20).

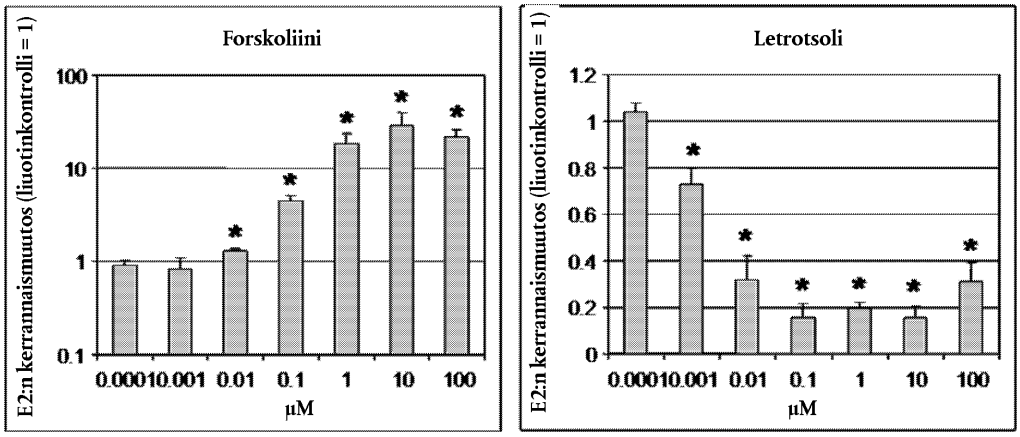
54. Tulokset olisi annettava graafisessa (pylväskuvaajat edustavat keskiarvoa +/– 1 keskihajonta) ja taulukkomuodossa (LOEC/NOEC, vaikutuksen suunta ja suurimman vasteen voimakkuus, joka kuuluu tietojen annos-vasteosaan) (ks. esimerkkiä varten kuva 3) Tietojen arviointia pidetään pätevänä ainoastaan, jos se perustuu ainakin kahteen toisistaan riippumattomasti suoritettuun testiajoon. Testiä tai testiajoa pidetään riippumattoman, jos se on suoritettu eri päivänä käyttäen uudenlaisia liuoksia ja kontrollia. Testiajossa 2 ja 3 (tarvittaessa) käytettyjen pitoisuuksien mittausaluetta voidaan suunnitella ja toteuttaa testiajon 1 tulosten perusteella, jotta määritellään paremmin LOEC:in sisältämä annos-vaste-alue (ks. 47 kohta).

▼M5

Kuva 3

Esimerkki H295R-testin suorittamisen aikana saatujen tietojen esittämisestä ja arvioinnista graafisessa ja taulukkomuodossa.

Asteriskit osoittavat tilastollisesti merkittävät erot liuotinkontrolliin nähden ($p < 0,05$). LOEC: alhaisin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus; Maksimimuutos: missä tahansa pitoisuudessa havaitun vasteen suurin vahvuus verrattuna keskimääräiseen liuotinkontrollin vasteeseen (= 1)



Chemical	LOEC	Max Change
Forskolin	0,01	0,15 fold
Letrozole	0,001	29 fold

Tietojen tulkintaa koskeva menettely

55. Testikemikaalia pidetään positiivisena, jos koetoiminnan suhde kontrolliin on tilastollisesti erilainen ($p \leq 0,05$) liuotinkontrolliin nähden kahden vierekkäisen pitoisuuden osalta ainakin kahdessa toisistaan riippumattomassa testiajossa (taulukko 7). Testikemikaalia pidetään negatiivisena kahden riippumattoman negatiivisen testiajon perusteella, tai kolmen testiajon perusteella, jos kaksi niistä on negatiivista ja yksi epäselvä tai positiivinen. Jos kolmessa riippumattomassa kokeessa saadut tiedot eivät täytä taulukossa 7 lueteltuja päätöskriteereitä, koetulokset eivät ole tulkittavissa. Tuloksia, joissa pitoisuudet ylittävät liukoisuusrajat tai solumyrkyllisyyspitoisuuden rajat, ei pitäisi sisällyttää tulosten tulkintaan.

Tutkimusseloste

56. Tutkimusselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testauslaitos

— laitoksen nimi ja sijainti

— tutkimusjohtaja ja muu henkilöstö ja heidän tutkimusta koskevat vastuualueensa

— testin alku- ja päättymispäivä

▼**M5**

Testikemikaali, reagenssit ja kontrollit

— testikemikaalin, reagenssien ja kontrollien tunnistetiedot (nimi/CAS-nro tarvittaessa) lähde, erän/annoksen numero, puhtaus, toimittaja ja kuvaus

— testikemikaalin fysikaalinen olomuoto ja asiaankuuluvat fysikokemialliset ominaisuudet

— varastointiolosuhteet ja testikemikaalien, reagenssien ja kontrollien valmistuksen menettely ja valmistustiheys

— testikemikaalin stabiilius.

Solut

— solujen lähde ja tyyppi

— testissä käytettyjen solujen pasaasinumerot (solujen jakamiskerran tunniste)

— soluviljelmien ylläpitoa koskevien menettelyiden kuvaus.

Vaatimukset ennen testiä (jos sovelletaan)

— testin, jossa arvioidaan, häiritseekö kemikaali hormonituotantoa (Chemical Hormone Assay Interference Test), kuvaus ja siitä saadut tulokset

— hormonien uuton tehokkuutta koskevien toimenpiteiden kuvaus ja tulokset

— standardikäyrät ja kalibrointikäyrät kaikille toteutettaville analyyttisille määrityksille

— valittujen analyyttisten määritysten määritysrajat.

Testiolosuhteet:

— kasvatusliuoksien koostumus

— testikemikaalin pitoisuus

— solutiheys (arvioidut ja mitatut solutiheydet 24 tunnin ja 48 tunnin välein)

— testikemikaalin liukoisuus (liukoisuusraja, jos se määritetään)

— inkubointiaika ja -olosuhteet.

Testin tulokset

— käsittelemättömät tiedot kustakin kontrollin ja testikemikaalin kuopasta — kaikki toiset toimet, jotka esitetään alkuperäistiedoissa, jotka saadaan hormonintuotannon mittaamiseen käytetyllä välineellä (esim. optinen tiheys, fluoresenssiyksiköt, hajoaminen minuuttia kohti)

— normaalisuuden validointi tai selvitys tietojen muunnoksesta

— keskimääräiset vasteet +/– 1 keskihajonta, kutakin mitattua kuoppaa kohti

— sytotoksisuustiedot (testipitoisuudet, jotka aiheuttavat sytotoksisuutta)

— vahvistus siitä, että laadunvalvontavaatimukset täytettiin

▼M5

— suhteellinen muutos verrattuna liuotinkontrolliin, jota on korjattu sytotoksisuuden osalta

— pylväskuvaaja, joka osoittaa suhteen (kerrannaismuutos) kussakin pitoisuudessa, keskihajonnan ja tilastollisen merkityksen, kuten esitettiin 49–54 kohdassa.

Tietojen tulkinta

— sovella tietojen tulkintaa koskeva menettelyä tuloksiin ja käsittele havaintoja.

Pohdinta

— käykö tutkimuksesta ilmi mahdollisuus, että gluko- ja mineraalikortikoideja koskevien reittien epäsuorat vaikutukset ovat voineet vaikuttaa T/E2-tietoihin?

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) OECD (2002), OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevat käsitteelliset puitteet (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals), tämän liitteen B.54 luvussa oleva lisäys 2.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114–124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res*., 14, 23–30.

(4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Available at [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,
en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Available at: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78–89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44–54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265–272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137–1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488–5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578–584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777–2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137–1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731–737.

(16) Tämän liitteen B.55 luku, ”Rotilla tehtävä Hershbergerin biotesti: lyhytaikainen seulontatesti androgeenisista (antiandrogeenisista) ominaisuuksista”.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222–231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55–63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598–1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484–492.

▼**M5**

Lisäys

MÄÄRITELMÄT:

Konfluenttisuudella tarkoitetaan peittävyyttä tai jakaantuvuutta, joka sallitaan soluille kasvatusliuoksessa.

Kemikaalilla tarkoitetaan ainetta tai aineiden seosta.

Variaatiokertoimella tarkoitetaan keskihajonnan ja aritmeettisen keskiarvon osamäärää

CYP:llä tarkoitetaan sytokromin P450 mono-oksigenaaseja, niistä tuotettua geeni- ja entsyymiperhettä, joka osallistuu erilaisten biokemiallisten reaktioiden katalysointiin, mukaan lukien steroidihormonien synteesi ja aineenvaihdunta.

DPM:llä tarkoittaa hajoamista minuuttia kohti (disintegration per minute). Kyseessä on tietyssä määrässä radioaktiivista materiaalia oleva atomien määrä, jonka havaitaan hajoavan yhden minuutin aikana.

E2:lla tarkoitetaan 17β-estradolia, nisäkkäiden elimistön tärkeintä estrogeenia.

H295R-soluilla tarkoitetaan ihmisen adreno-karsinooma-soluja, jotka ovat fysiologisilta ominaispiirteiltään sikiön erilaistumattomia lisämunuaisen soluja ja jotka ilmentävät kaikkia streroidogeneesin entsyymejä. Ne ovat saatavilla ATCC:ltä.

Pakastusliuosta käytetään pakastamaan ja varastoimaan pakastettuja soluja. Se koostuu kasvatusliuoksen kantaliuoksesta, johon lisätään BD NuSerum -seeruminkorviketta ja dimetyylisulfoksidia.

Lineaarisella mittausalueella tarkoitetaan vaihteluväliä hormonin mittausjärjestelmän standardikäyrällä, jossa tulokset ovat verrannollisia näytteessä läsnä olevan analyytin pitoisuuteen.

Määritysrajalla tarkoitetaan pienintä määrää kemikaalia, joka voidaan erottaa siitä, että kyseistä kemikaalia ei esiinny (tyhjä arvo) todetulla luottamustasolla. Tässä menetelmässä testijärjestelmien valmistaja määrittelee tavanomaisesti määritysrajan, jos ei toisin ilmoiteta.

LOEC:illa tarkoitetaan alhaisimman havaittavaan vaikutuksen aiheuttavaa pitoisuutta, jossa testireaktio poikkeaa tilastollisesti liuotinkontrollista.

NOEC:illa tarkoitetaan pitoisuutta, joka aiheuta havaittavaa vaikutusta, mikä on korkein testattu pitoisuus, jos testi ei tarjoa positiivista reaktiota.

Pasaasilla tarkoitetaan niiden kertojen lukumäärää, jolloin solut jaetaan sen jälkeen kun viljelmä aloitetaan pakastetusta varastosta (jakamiskerta). Ensimmäisen pakastetusta varastosta aloitetun viljelmän pasaasinumero on yksi (1). Solut, jotka jaetaan yhden kerran merkitään pasaasinumerolla 2.

PBS:llä tarkoitetaan Dulbeccon fosfaattipuskuroitua suolaliuosta.

Laadunvalvonnalla tarkoitetaan toimenpiteitä, joita tarvitaan validien tietojen varmistamiseen.

Laadunvalvontalevyllä tarkoitetaan 24-kuoppalevyä, johon sisältyy positiivisen ja negatiivisen kontrollin kaksi pitoisuutta, joilla seurataan uuden soluerän tehokkuutta tai jolla tarjotaan kemikaalien testauksen ohessa positiivinen kontrolli testille.

Testiajolla tarkoitetaan erillistä koetta, jossa käytetään uudenlaisia liuoksia ja kontrolleja.

▼**M5**

Kasvatusliuoksen kantaliuoksella tarkoitetaan muiden reagenssien valmistelua varten käytettävää ainetta. Se koostuu 1:1 seoksesta DMEM-kasvatusliuosta (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ja DMEM/F12-kasvatusliuosta (Ham's F-12 Nutrient mixture) 15 mM:ssa Hepes-puskuria ilman fenoolipunaa tai natriumbikarbonaattia. Natriumbikarbonaatti lisätään puskuriksi, ks. validointiraportin lisäys II (4).

Lopullinen kasvatusliuos koostuu kasvatusliuoksen kantaliuoksesta, johon on lisätty ainetta BD seeruminkorvike ja ITS+ premium mix, ks. validointiraportin lisäys II (4).

Steroidogeneesillä tarkoitetaan synteesireittiä, joka johtaa kolesterolista useisiin steroidihormoneihin. Useat reaktion välituotteet steroidisynteesireitillä, kuten progesteroni ja testosteroni, ovat jo itsessään tärkeitä hormoneja, mutta ne toimivat myös esiasteena synteesireitin loppupäässä oleville hormoneille (lopputuote).

T:llä tarkoitetaan testosteronia, yhtä nisäkkäiden elimistön kahdesta tärkeimmästä androgeenista.

Testikemikaalilla tarkoitetaan mitä tahansa ainetta tai seosta, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

Testilevyllä tarkoitetaan levyä, jolla H295R-solut altistetaan testikemikaaleille. Testilevyille sisältyy liuotinkontrolli ja testikemikaali seitsemällä pitoisuustasolla kolmena kappaleena.

Trypsiini 1X:llä tarkoitetaan laimennettua liuosta, joka koostuu trypsiini-entsyymistä, haiman seriiniproteasista, jota käytetään irrottamaan soluja viljelylevyiltä, ks. validointiraportin lisäys III (4).

▼M5

B.58. SIIRTOGEENISTEN JYRSIJÖIDEN SOMAATTISTEN SOLUJEN JA SUKUSOLUJEN GEENIMUTAATIOTESTIT

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 488 (2013). EU:n testimenetelmiä on saatavilla laajasta valikoimasta *in vitro* -mutaatiotestejä, joissa voidaan havaita kromosomi- ja/tai geenimutaatioita. *In vivo* -päätetapahtumia (eli kromosomimuutokset ja ennakoimaton DNA-synteesi) varten on käytössä testimenetelmiä; niillä ei kuitenkaan mitata geenimutaatioita.Siirtogeenisten jyrsijöiden mutaatiotestit täyttävät geenimutaatioiden osalta käytännöllisten ja laajasti saatavilla olevien *in vivo* -testien tarpeen.

2. Siirtogeenisten jyrsijöiden mutaatiotestejä on tarkasteltu laajasti uudelleen (24)(33). Niissä käytetään siirtogeenisiä rottia ja hiiriä, joissa on useita kopioita kromosomisesti integroituja plasmideja tai faagien sukkulavektoreita. Siirtogeeneihin sisältyy reportterigeenejä, joilla havaitaan monenlaisia mutaatioita, joita testikemikaalit indusoivat *in vivo*.

3. Jyrsijässä aiheutuvat mutaatiot merkitään muistiin ottamalla siirtogeeni talteen ja analysoimalla reportterigeenin fenotyyppiä bakteeri-isännässä, joka on reportterigeenin osalta vaillinainen. Siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotesteissä mitataan mutaatioita, joita ovat aiheuttaneet geneettisesti neutraalit geenit, jotka on otettu talteen lähes mistä tahansa jyrsijän kudoksesta. Tästä syystä näissä testeissä kierretään useita nykyisiä rajoituksia, jotka liittyvät endogeenisten geenien *in vivo* -geenimutaatioita koskevaan tutkimukseen (kuten rajallinen määrä testiin sopivia kudoksia, negatiivinen/positiivinen valinta mutaatioita vastaan).

4. Todisteet viittaavat siihen, että siirtogeenit vastaavat mutageeneihin samalla tavoin kuin endogeenisiin geeneihin erityisesti, kun kyseessä on emäsparien korvauksen, lukukehysmutaatioiden ja pienten deleetioiden ja insertioiden havainnointi (24).

5. Genotoksisuuden testaamista käsittelevissä kansainvälisissä työryhmissä (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) on hyväksytty siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestien sisällyttäminen geenimutaatioiden detektioon *in vivo*, ja se on suositellut testiprotokollaa niiden toteuttamista varten (15)(29). Tämä testimenetelmä perustuu näihin suosituksiin. Täydentävä analyysi, jolla tuetaan tämän testiprotokollan käyttämistä, sisältyy lähteeseen (16).

6. On odotettavissa, että tulevaisuudessa voi olla mahdollista yhdistää siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestit toistuvan annostelun toksisuustutkimuksiin (tämän liitteen B.7 luku). Tietoja tarvitaan kuitenkin sen varmistamiseksi, että siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestien herkkyyteen ei vaikuteta altistusajan lopun ja näytteenottoajan välisellä lyhyemmällä yhden vuorokauden ajanjaksolla, jota sovelletaan toistuvan annostelun tutkimuksissa, verrattuna siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotesteissä käytettyyn kolmeen vuorokauteen. Tarvitaan myös tietoja jotka osoittavat, että toistuvan annostelun tutkimuksiin ei vaikuteta haitallisesti, koska tavanomaisten jyrsijäkantojen sijaan käytetään siirtogeenisiä jyrsijäkantoja. Kun nämä tiedot ovat saatavilla, tätä testimenetelmää päivitetään.

7. Keskeisten termien määritelmät esitetään liitteessä.

▼M5

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT

8. Siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestit, joiden osalta on saatavilla tarpeeksi tietoa, jotta niitä voidaan käyttää tässä testimenetelmässä, ovat: *lacZ* bacteriophage mouse -malli (MutaäMouse -malli); *lacZ* plasmid mouse -malli; *gpt* delta (*gpt* ja Spi–)mouse ja rat -mallit; *lacI* mouse -malli ja *lacI* rat -malli (Big Blue® -malli), sellaisina kuin ne suoritetaan tavanomaisissa olosuhteissa. Lisäksi positiivista valintaa koskevaa *cII*-testiä voidaan käyttää arvioimaan mutaatioita Big BlueÒ- ja MutaäMouse-malleissa. Mutageneesiä siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestien malleissa arvioidaan normaalisti mutaatiofrekvenssillä; lisätietoja voidaan saada tarvittaessa mutaatioiden molekyylianalyysillä (ks. 24 kohta).

9. Nämä jyrsijöiden *in vivo* geenimutaatiotestit soveltuvat erityisesti mutageenisuusvaaran arvioimiseen, sillä testin vasteet riippuvat *in vivo* metaboloinnista, farmakokinetiikasta, DNA:n korjautumisprosesseista ja transleesio-DNA-synteesistä, joskin näissä saattaa esiintyä eroja lajien ja kudosten sekä DNA-vaurioiden tyyppien välillä. Geenimutaatioita koskeva *in vivo* -testi on hyödyllinen, jotta *in vitro* -järjestelmässä havaittua mutageenistä vaikutusta tutkitaan enemmän ja jotta suoritetaan testitulosten seuranta käyttäen muita *in vivo* -päätetapahtumia (24). Sen lisäksi, että geenimutaatiot ovat syy-yhteydellisiä syövän syntyyn, ne muodostavat olennaisen päätetapahtuman, jolla ennustetaan mutaatioon perustuvia muita kuin syöpäsairauksia somaattisissa kudoksissa (12)(13) sekä sairauksia, jotka tarttuvat ituradan välityksellä.

10. Jos on näyttöä siitä, että testikemikaali tai merkityksellinen metaboliitti ei ulotu mihinkään kohdekudoksiin, siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestien suorittaminen ei ole tarkoituksenmukaista.

TESTIN PERIAATE

11. Edellä 8 kohdassa kuvatuissa testeissä kohdegeeni on alkuperältään bakteeri tai bakteriofagi, ja tapa saada näyte jyrsijän genomisesta DNA:sta on siirtogeenin sitoutuminen λ-bakteriofaagiin tai plasmidisukkulavektoriin. Menettelyyn sisältyy genomisen DNA:n ekstraktio jyrsijän kohdekudoksesta, genomisen DNA:n *in vitro* -käsittely (eli λ-vektorien pakkaaminen tai plasmidien ligaatio ja elektroporaatio sukkulavektorin tuottamiseksi) ja sitä seuraava mutaatioiden seulonta bakteeri-isännissä sopivissa olosuhteissa. Testissä käytetään neutraaleja siirtogeenejä, jotka voidaan helposti kerätä useimmista kudoksista.

12. Jyrsijöiden geenimutaatiota mittaavassa perustestissä jyrsijä altistetaan kemikaalille tietyn ajanjakson ajan. Kemikaalit voidaan antaa minkä tahansa annostelureitin, myös implantaation kautta (esim. lääkinnällisten laitteiden testaus). Sitä ajanjaksoa kokonaisuudessaan, jolloin eläimelle annetaan annoksia, kutsutaan *altistusajaksi*. Altistusta seuraa ennen lopettamista yleensä ajanjakso, jonka aikana kemikaalia ei anneta ja jonka aikana korjaamattomat DNA-vauriot kiinnittyvät stabiileihin mutaatioihin. Tätä ajanjaksoa kutsutaan ammattikirjallisuudessa usein ilmenemisajaksi (manifestation time), kiinnitysajaksi (fixation time) tai ilmentymisajaksi (expression time), tämän ajanjakson loppua kutsutaan näytteenottoajaksi (15)(29). Eläimen lopettamisen jälkeen genominen DNA eristetään testin kohteena olevasta kudoksesta (kudoksista) ja se puhdistetaan.

▼M5

13. Tiedot yhdestä kudoksesta eläintä kohti useista pakkauksista/ligaatioista kootaan yleensä yhteen ja mutaatiotaajuus arvioidaan yleensä käyttäen yhteensä 10^5 ja 10^7 plakkia muodostavaa tai pesäkkeitä muodostavaa yksikköä. Jos käytetään positiivisia valintamenetelmiä, plakkia muodostavien yksiköiden kokonaismäärä määritellään käyttäen erillisiä ei-selektiivisiä maljoja.

14. Positiivisia valintamenetelmiä on kehitetty, jotta mutaatioiden seulontaa *helpotetaan* gpt-geenissä (*gpt delta mouse and rat* -malli, *gpt*$^-$-fenotyyppi (20)(22)(28)) ja *lacZ*-geenissä (Muta™Mouse- tai *lacZ* plasmid mouse -malli (3)(10)(11)(30)); *lacI*-geenimutaatiot Big Blue® -eläimissä seulotaan non-selektiivisellä mallilla, jossa mutantit seulotaan värillisten (sinisten) plakkien syntymisen välityksellä. Käytössä on myös positiivinen valintamenettely, jolla havaitaan pistemutaatioita, jotka syntyvät λ-bakteriofaagin sukkulavektorin *cII*-geenissä (Big Blue® mouse -malli tai rat -malli ja Muta™-Mouse -malli (17)) ja deleetiomutaatioina λ *red*- ja *gam*-geeneissä(Spi$^-$-valinta *gpt* delta mouse- ja rat-malleissa (21)(22)(28)). *Mutaatiotaajuus* lasketaan jakamalla siirtogeenin mutaatioita sisältävien plakkien/plasmidien määrä samasta DNA-näytteestä kerättyjen plakkien/plasmidien kokonaismäärän kanssa. Siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotutkimuksissa ilmoitettu parametri on mutaatiotaajuus. Lisäksi *mutaatiotaajuus* voidaan määritellä niiden solujen osuudeksi, joissa on *yksittäisiä* mutaatioita; tämä laskentatapa vaatii korjausta kloonaalisen laajenemisen osalta sekvensoimalla kerätyt mutantit (24).

15. Mutaatioita, joita tutkitaan *lacI-, lacZ-, cII-* ja *gpt point mutation* -mallien testeissä, koostuvat pääosin emäsparin korvautumista koskevista mutaatioista, lukukehysmutaatioista ja pienistä insertioista/deleetioista. Näiden mutaatiotyyppien suhteellinen osuus spontaanien mutaatioiden keskuudessa on samankaltainen, mikä voidaan havaita endogeenisessa *Hprt*-geenissä. Suuria deleetioita havaitaan ainoastaan Spi$^-$-valintaaja *lacZ* plasmid -malleja koskevassa testissä (24). Testin kannalta merkittävät mutaatiot ovat hiirelle tai rotalle aiheutuvat *in vivo* -mutaatiot. *In vitro*- ja *ex vivo* -mutaatiot, jotka voivat aiheutua faagin/plasmidin näytteenoton, replikoinnin tai korjautumisen aikana, ovat erittäin harvinaisia, ja ne voidaan joissain järjestelmissä erityisesti havaita tai sulkea pois bakteeri-isäntää/positiivista valintaa koskevalla järjestelmällä.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Eläinlajin valinta

16. Tällä hetkellä on saatavilla useita siirtogeenisten hiirten geenimutaatioiden seulontamalleja, ja näitä on käytetty laajemmin kuin siirtogeenisiä rottia koskevia malleja. Jos rotta on selkeästi tarkoituksenmukaisempi malli kuin hiiri (esim. jos tutkitaan karsinogeneesin mekanismia ainoastaan rotilla esiintyvästä kasvaimesta, jos saatetaan tiedot vastaavuussuhteeseen rotilla tehtävien myrkyllisyystutkimusten kanssa tai jos rotan metabolian tiedetään olevan ihmisen metabolian kannalta edustavampi), olisi harkittava siirtogeenisiä rottia koskevien mallien käyttöä.

Koe-eläinen häkit ja ruokinta

17. Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla ihanteellisesti 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden pitäisi olla vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa olisi käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, jonka jälkeen 12 tuntia

▼M5

pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Samaa sukupuolta olevat eläimet olisi pidettävä häkeissä pienissä ryhmissä (enintään viisi), jos minkäänlaista aggressiivista käytöstä ei ole odotettavissa. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

18. Terveet nuoret ja sukukypsät täysikasvuiset eläimet (8–12 viikon ikäiset käsittelyn alkaessa) jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmiin. Jokainen eläinyksilö tunnistetaan. Eläimiä totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan. Häkit on sijoitettava siten, että niiden sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Tutkimuksen alkaessa eläinten painonvaihtelun olisi oltava vähäistä, ja se saa vaihdella korkeintaan ± 20 % kunkin sukupuolen tavanomaisesta keskiarvosta.

Annosten valmistelu

19. Kiinteät testattavat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testattavat kemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitystien kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikokemiallisista ominaisuuksista riippuen. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Testiolosuhteet

Liuotin/kantaja-aine

20. Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan kemikaalin kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista.

Positiiviset kontrollit

21. Tavanomaisesti käytetään rinnakkaisia positiivisen kontrollin eläimiä. Kuitenkin laboratoriot, joiden pätevyys on osoitettu (ks. 23 kohta) ja jotka soveltavat rutiininomaisesti näitä testejä, edellisen positiivisen kontrollin koe-eläimien DNA voidaan sisällyttää kuhunkin tutkimukseen, jotta menetelmän onnistunut lopputulos vahvistetaan. Tällaiset edellisten kokeiden DNA:t olisi saatava samoilta lajeilta ja tutkimuksen kohteena olevista kudoksista, ja ne olisi säilytettävä asianmukaisesti (ks. 36 kohta). Kun käytetään rinnakkaisia positiivisia kontrolleja, niitä ei tarvitse antaa samaa reittiä kuin testikemikaalia; olisi kuitenkin oltava tiedossa, että positiiviset kontrollit aiheuttavat mutaatioita yhdessä tai useammassa testikemikaalin kohdekudoksessa. Positiivisen kontrollin kemikaalien annokset olisi valittava siten, että aiheutetaan heikkoja tai kohtalaisia vaikutuksia, joilla arvioidaan kriittisesti kokeen suorituskykyä ja herkkyyttä. Taulukkoon 1 sisältyy esimerkkejä positiivisen kontrollin kemikaaleista ja joistain niiden kohdekudoksista.

▼M5

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisen kontrollin kemikaaleista ja joistain niiden kohdekudoksista

Positiivisen kontrollin kemikaali ja CAS-nro	Einecs-nimi ja Einecs-nro	Ominaisuudet	Mutaation kohdekudos	
			Rotta	Hiiri
N-etyyli-N-nitrosourea (CAS-nro 759-73-9)	N-etyyli-N-nitrosourea (212-072-2)	Suoraan vaikuttava mutageeni	Maksa, keuhkot	Luuydin, paksusuoli, paksusuolen epiteeli, suolisto, maksa, keuhkot, perna, munuainen, munasolujen granuloosasolut, uroksen sukusolut
Etyylikarbamaatti (uretaani) (CAS-nro 51-79-6)	Uretaani (200-123-1)	Mutageeni, edellyttää metabolista aktivointia, mutta aiheuttaa ainoastaan heikkoja vaikutuksia		Luudin, etumaha, ohutsuoli, maksa, keuhkot, perna
2,4 diaminotolueeni (CAS-nro 95-80-7)	4-metyyli-m-fenyleenidiamiini (202-453-1)	Mutageeni, edellyttää metabolista aktivointia, myös positiivinen Spi^--testissä	Maksa	Maksa
Bentso(a)pyreeni (CAS-nro 50-32-8)	Bentso[def]kryseeni (200-028-5)	Mutageeni, edellyttää metabolista aktivointia	Maksa, keuhkot	Luudin, rinta, paksusuoli, etumaha, rauhasmaha, sydän, maksa, keuhkot, uroksen sukusolut

Negatiiviset kontrollit

22. Negatiivisia kontrolleja, joissa käytetään pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita käsitellään muuten samalla tavalla kuin koeryhmiä, olisi sisällytettävä kuhunkin näytteenottokertaan. Jos käytettävissä ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja, joissa osoitetaan, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta mitään haitallisia tai mutageenisiä vaikutuksia, olisi käytettävä myös kontrollia, jossa eläimiä ei käsitellä, kutakin näytteenottokertaa kohti, jotta kantaja-ainekontrollin hyväksyttävyys voidaan todeta.

Laboratorioiden pätevyyden varmistaminen

23. Näiden testien pätevyys olisi varmistettava osoittamalla, että niillä voidaan tuottaa julkaistujen tietojen (24) perusteella edellytettyjä tuloksia, kun kyseessä ovat: 1) mutaatiotaajuudet positiivisen kontrollin kemikaalien kanssa (mukaan lukien heikot vasteet), kuten ne, jotka luetellaan taulukossa 1, ei-mutageenit, kantaja-ainekontrollit; ja 2) siirtogeenin talteenotto genomisesta DNA:sta (esim. pakkauksien tehokkuus).

Mutanttien sekvensointi

24. Mutanttien DNA-sekvensointia ei tarvita sääntelyyn liittyvien vaatimusten osalta erityisesti, jos saadaan selkeä positiivinen tai negatiivinen tulos. Sekvensointitiedot voivat olla kuitenkin hyödyllisiä, kun tarkastellaan yksilöiden välistä korkeaa vaihtelua. Näissä tapauksissa sekvensointia voidaan käyttää, jotta ”jackpot-mutaatioiden” tai klonaalisten tapahtumien mahdollisuus suljetaan pois, tunnistamalla tietystä kudoksesta peräisin olevien ainutlaatuisten mutanttien osuus. Noin 10 mutantin sekvensointi kutakin kudosta ja kutakin eläintä kohti pitäisi riittää sen määrittämiseksi, vaikuttavatko klonaaliset mutantit mutaatiotaajuuteen; jopa 25 mutantin sekvensointi voi

▼M5

olla tarpeen, jotta mutaatiotaajuutta korjataan matemaattisesti klonaalisuuden osalta. Mutanttien sekvensointia voidaan myös harkita, kun mutaatiotaajuudessa havaitaan pientä lisäystä (eli kun ylitetään jonkin verran käsittelemättömän kontrollin arvot). Erot käsiteltyjen ja käsittelemättömien eläinten mutanttiryhmien mutaatiokirjon välillä voivat tukea mutageenistä vaikutusta (29). Mutaatiokirjo voi olla myös hyödyllinen mekanististen hypoteesien kehittämiseksi. Kun sekvensointi sisällytetään tutkimussuunnitelmaan, tällaisten tutkimusten suunnittelussa olisi erityisesti otettava huomioon, etenkin näytettä kohti sekvensointujen mutanttien määrän osalta, riittävän tilastollisen voiman aikaansaaminen sovellettavan tilastollisen mallin mukaisesti (ks. 43 kohta).

TESTIN SUORITTAMINEN

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

25. Eläinten lukumäärä ryhmää kohti olisi määriteltävä ennalta, jotta näin tarjotaan riittävä tilastollinen voima havaita ainakin mutaatiotaajuuden kaksinkertaistuminen. Ryhmä koostuu vähintään viidestä eläimestä; jos tilastollinen voima ei riitä, eläinten määrää on lisättävä tarpeen mukaan. Normaalisti olisi käytettävä uroksia. Voi olla tapauksia, joissa pelkästään naaraiden testaaminen on perusteltua; esimerkiksi silloin, kun testataan nimenomaan naisia varten tarkoitettuja lääkkeitä tai kun tutkitaan nimenomaan naisten aineenvaihduntaa. Jos sukupuolten välillä on huomattavia eroja myrkyllisyysvaikutusten tai metaboloitumisen osalta, tarvitaan uroksilla ja naarailla suoritettavia malleja.

Altistusaika

26. Koska seulonnan perusteella mutaatiot kertyvät kussakin käsittelyssä, tarvitaan toistuvan annostelun tutkimusta, jossa annos annetaan päivittäin 28 vuorokauden ajan. Tätä pidetään yleisesti hyväksyttävänä, koska näin tuotetaan riittävä kertymä heikkojen mutageenien aiheuttamia mutaatioita ja koska tarjotaan riittävän pitkä altistusaika mutaatioiden seulonnalle elimissä, joiden proliferaatio on hidasta. Vaihtoehtoiset käsittelytavat voivat sopiva joihinkin arviointeihin, ja näitä vaihtoehtoisia annostussuunnitelmia olisi perusteltava tieteellisesti testiprotokollassa. Altistusten kesto ei saisi olla lyhyempi kuin ajanjakso, jota tarvitaan kaikkien asiaankuuluvien entsyymien täydelliseen induktioon, ja lyhyempikestoisten altistusten vuoksi voidaan joutua käyttämään useita näytteenottoaikoja, jotka ovat asianmukaisia elimille, joiden proliferaatioaste on erilainen. Joka tapauksessa kaikkia saatavilla olevia tietoja (esim. yleisestä myrkyllisyydestä tai metaboloitumisesta ja farmakokinetiikasta) olisi käytettävä, kun protokollaa perustellaan erityisesti, jos edellä mainituista vakiomuotoisista suosituksista poiketaan. Vaikka herkkyyttä lisättäisiin kahdeksan viikkoa pidemmillä altistusajoilla, niitä pitäisi selvittää ja perustella, koska pitkät altistusajat voivat tuottaa ilmeistä kasvua mutaatiotaajuudessa kloonaalisen laajenemisen välityksellä (29).

Annostasot

27. Annostasojen pitäisi perustua samasta annostelureitistä tehdyn yleistä toksisuutta mittaavan raja-annostutkimuksen tuloksiin tai olemassa oleviin subakuuttia toksisuutta koskeviin tutkimuksiin. Saman jyrsijäkannan ei-siirtogeenisiä eläimiä voidaan käyttää annosrajojen määrittelyssä. Annosvastetietojen saamisen vuoksi päätestin täydelliseen tutkimukseen olisi sisällyttävä negatiivinen kontrolliryhmä (ks. 22 kohta) ja vähintään kolme toisistaan asianmukaiselle välille sijoitettua annostasoa, paitsi silloin, kun on käytetty rajaannosta (ks. 28 kohta). Suurimman annoksen olisi oltava suurin siedettävä annos. Suurin siedettävä annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sellaisia myrkyllisyysoireita, että samaan annostussuunnitelmaan perustuvan korkeamman annostason voidaan odottaa johtavan kuolemaan. Kemikaalit, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä myrkyttöminä annoksina

▼M5

(kuten hormonit ja mitogeenit), ja kemikaalit, joissa esiintyy toksikokineettisten ominaisuuksien saturaatiota, voivat olla annosten asettamista koskevien kriteerien osalta poikkeustapauksia, ja niitä olisi arvioitava tapauskohtaisesti. Käytetyillä annostasoilla olisi katettava mittausalue, joka ulottuu enimmäismäärästä vähäiseen toksisuuteen tai toksisuuden puuttumiseen.

Raja-annostesti

28. Jos raja-annoksen määrittelyä koskevissa kokeissa tai samankaltaisista jyrsijäkannoista olemassa olevissa tiedoissa osoitetaan, että käsittelyjärjestelmässä, jossa annetaan vähintään raja-annos (ks. jäljempänä), ei tuoteta mitään havaittavia myrkyllisyysvaikutuksia ja jos genotoksisuutta ei oleteta rakenteellisesti samankaltaisia kemikaaleja koskevien tietojen perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ole ehkä välttämätön. Kun kyseessä on 28 vuorokauden altistusaika (eli 28 päivittäistä käsittelyä), raja-annos on 1 000 mg/painokilo/vrk. Kun altistusaika on 14 päivää tai lyhyempi, raja-annos on 2 000 mg/painokilo/vrk (28 päivittäisestä käsittelystä poikkeavat annostelusuunnitelmat olisi perusteltava tieteellisesti protokollassa; ks. 26 kohta).

Antotapa

29. Testikemikaalia annetaan yleensä letkuruokinnassa mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Yleensä testin suunnittelussa olisi otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Sen vuoksi muut altistusreitit (kuten altistus juomaveden välityksellä, ihonalaista tai laskimonsisäistä reittiä, paikallisesti iholle applikoituna, inhalaationa, henkitorveen tiputettuna, ravinnon tai implantaation kautta) voivat olla hyväksyttäviä, jos niitä voidaan perustella. Injektiota vatsaonteloon ei suositella, koska se ei ole ihmisen kannalta fysiologisesti merkityksellinen altistusreitti. Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus ei saisi ylittää 2:ta ml/100 g eläimen painoa. Tätä suurempien määrien käyttöä olisi perusteltava. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Testiaineen nestemäärän tilavuusvaihtelu minimoidaan pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla varmistetaan tilavuudeltaan sama nestemäärä.

Näytteenottoaika

Somaattiset solut

30. Näytteenottoaika on kriittinen muuttuja, koska se määräytyy sen ajanjakson perusteella, jota tarvitaan mutaatioiden fiksoitumiseen. Tämä ajanjakso on kudosspesifinen ja se vaikuttaa liittyvän solupopulaation korvautumista koskevaan ajanjaksoon. Luuydin ja suolisto reagoivat nopeasti ja maksa paljon hitaammin. Sopiva kompromissi mutaatiotaajuuksien mittaamiseksi nopeasti ja hitaasti proliferoituvissa kudoksissa on 28 peräkkäisen vuorokauden käsittely (kuten 26 kohdassa todetaan) ja kolmen vuorokauden näytteenotto lopullisen käsittelyn jälkeen; voi olla mahdollista, että mutaatiotaajuuden maksimi ei ilmene näissä olosuhteissa sellaisten kudosten osalta, joiden proliferaatio on hidasta. Jos tällaisilla kudoksilla on erityistä merkitystä, myöhempi 28 päivän näytteenottoajankohta, joka seuraa 28 päivän altistusaikaa, voi olla tarkoituksenmukaisempi (16)(29). Tällaisissa tapauksissa myöhempi aika korvaisi 3 päivän näytteenottoajan ja edellyttäisi tieteellisiä perusteluja.

▼M5

Sukusolut

31. Siirtogeenisillä jyrsijöillä tehtävät testit soveltuvat hyvin tutkimuksiin, jotka koskevat geenimutaatioiden syntyä uroksen sukusoluissa (7)(8)(27), joissa spermatogeneesin ajoitus ja kinetiikka on määritelty hyvin (27). Koska analyysia varten saatavilla olevia munasoluja on vähän jopa superovulaation jälkeen ja koska oosyytissä ei ole DNA-synteesiä, siirtogeenisten eläinten testeissä ei voida määritellä naaraiden sukusolujen mutaatiota (31).

32. Uroksen sukusolujen näytteenottoajat olisi valittava niin, että näytteet otetaan sarjasta altistettuja solutyyppejä koko sukusolujen kehityksen ajan ja että soluja on altistettu tarpeeksi vaiheessa, joka on näytteenoton kohteena. Kehittyvien sukusolujen kehittymisaika spermatogoniaalisista kantasoluista kypsiksi siittiöiksi, jotka siirtyvät siemenjohtimeen/lisäkiveksen häntään, on hiirellä noin 49 vuorokautta (36) ja rotalla noin 70 vuorokautta (34)(35). Kolmen päivän näytteenottoaikana, joka seuraa 28 vuorokauden altistusta, siemenjohtimen/lisäkiveksen hännästä (7)(8) kerätty siemenneste edustaa solupopulaatiota, joka on altistettu suunnilleen spermatogeneesin jälkipuoliskolla. Tähän sisältyy siis meioottinen ja postmeioottinen vaihe, mutta ei spermatogoniota tai kantasoluja koskevaa vaihetta. Jotta siemenjohtimen/lisäkiveksen hännän soluista, jotka olivat siittiökehityksen kantasoluja altistusaikana, otetaan näyte asianmukaisesti, altistuksen jälkeen tarvitaan täydentävää 7 viikon (hiiret) tai 10 viikon (rotat) näytteenottoaikaa.

33. Soluihin, jotka irrotetaan siementiehyeistä 28 + 3 vuorokauden jälkeen, sisältyy sekapopulaatioita, joita on käsitelty kehittyvien sukusolujen kaikissa eri vaiheissa (7)(8). Näytteenotolla näistä soluista geenimutaation seulontaa varten ei tarjota yhtä täsmällistä arviointia vaiheista, jolloin sukusolujen mutaatioita aiheutetaan, kuin silloin, jos näyte otetaan siemenjohtimesta/lisäkiveksen hännästä (koska tiehyeistä otetussa näytteissä esiintyy sukusolujen tyyppien osalta vaihtelua ja näytteeseen sisältyy joitain somaattisia soluja, jotka kontaminoivat tämän solupopulaation). Solunäytteen otto siementiehyistä siemenjohtimen/lisäkiveksen hännän siemennesteen näytteiden lisäksi pelkästään 28 + 3 vuorokauden näytteenotto-ohjelmassa tarjoaa kuitenkin jotain tietoja soluista, jotka on altistettu sukusolujen useampien kehitysvaiheiden aikana, ja tämä voi olla hyödyllinen keino seuloa joitain sukusolujen mutageenejä.

Tarkkailu

34. Yleisiä kliinisiä havaintoja pitäisi tehdä ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen ennakoidut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten terveydentila on kirjattava. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa. Kaikki eläimet olisi punnittava ainakin kerran viikossa ja lopetettaessa. Ravinnon kulutus olisi mitattava ainakin kerran viikossa. Mikäli testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutusta olisi mitattava, kun vesi vaihdetaan tai ainakin kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta myrkytysvaikutuksesta, olisi lopetettava ennen tutkimusajan päättymistä (23).

▼M5

Kudosnäytteiden kerääminen

35. Kudosnäytteiden keräämistä koskevat perusteet olisi määritettävä selkeästi. Koska mutaatioiden muodostumista voidaan tutkia lähes kaikista kudoksista, kerättävien kudosten valinnan olisi perustuttava tutkimuksen suorittamisen taustalla olevaan syyhyn ja olemassa oleviin tutkittavana olevan kemikaalin mutageenisyyttä, karsinogeenisyyttä tai toksisuutta koskeviin tietoihin. Tärkeisiin tarkasteltaviin näkökohtiin pitäisi sisältyä altistusreitti (joka perustuu todennäköisiin ihmisen altistumista koskevaan reittiin (reitteihin)), ennustettava kudosjakauma ja mahdollinen vaikutusmekanismi. Jos taustatietoja ei ole, useita tutkimuksen kannalta mahdollisesti merkittäviä somaattisia kudoksia voidaan kerätä. Niiden pitäisi edustaa nopeasti lisääntyviä, hitaasti lisääntyviä ja kontaktikohdan kudoksia. Lisäksi siemenjohtimen/lisäkiveksen hännän siittiöitä ja siementiehyeiden kehittyviä sukusoluja (kuten kuvataan 32 ja 33 kohdassa) olisi kerättävä, ja ne olisi säilytettävä, jos myöhemmin tarvitaan lisätutkimuksia sukusolujen mutageenisyydestä. Elinten painot olisi mitattava. Suurempien elinten osalta kaikista eläimistä olisi punnittava sama ala.

Kudoksien ja DNA:n säilyttäminen

36. Kudokset (tai kudoshomogenaatit) olisi säilytettävä –70 °C:ssa tai alemmassa lämpötilassa, ja niitä voidaan käyttää DNA:n eristämiseen viiden vuoden aikana. Eristetty DNA, joka varastoidaan jäähdytettynä 4 °C:een asianmukaisessa puskuriliuoksessa, olisi käytettävä mutaatioanalyysia varten optimaalisesti vuoden sisällä.

Kudosten valitseminen mutaatioanalyysia varten

37. Kudosten valinnan olisi perustuttava seuraaviin näkökohtiin: 1) altistusreitti tai ensimmäinen kontaktikohta (esim. rauhasmaha, jos annos annetaan suun kautta; keuhkot, jos annos annetaan inhalaationa; tai iho, jos käytetään paikallisesti ihon alueelle aplikoitavaa annosta); ja 2) yleisiä myrkyllisyysvaikutuksia koskevissa tutkimuksessa havaitut farmakokineettiset parametrit, jotka osoittavat kudoksen disposition, pidättymisen tai kertymisen, tai myrkyllisyysvaikutuksien kohde-elimet. Jos tutkimukset suoritetaan karsinogeenisyystutkimusten seurantaa varten, olisi tarkasteltava karsinogeenisyysvaikutuksien kohdekudoksia. Kudosten valitsemisella tutkimusta varten pitäisi maksimoida sellaisten kemikaalien havaitsemista, jotka toimivat suoraan *in vitro* -mutageeneinä, metaboloituvat nopeasti, jotka ovat erittäin reaktiivisia tai huonosti imeytyviä tai joiden kohdekudos määräytyy altistusreitin perusteella (6).

38. Jos taustatietoja ei ole käytettävissä — ja kun otetaan huomioon altistusreitistä johtuva kontaktikohta –, olisi arvioitava maksan ja ainakin yhden nopeasti jakaantuvan kudoksen (kuten rauhasmaha, luuydin) mutageenisyytta. Useimmissa tapauksissa edellä mainitut vaatimukset voidaan saavuttaa kahden huolellisesti valitun kudoksen analyyseista, mutta joissain tapauksessa tarvitaan kolmea tai useampaa kudosta. Jos on syytä tarkastella erityisesti sukusoluihin aiheutuvia vaikutuksia, kuten positiivisia vasteita somaattisissa soluissa, sukusolujen kudoksia olisi arvioitava mutaatioiden osalta.

Mittausmenetelmät

39. Vakiomuotoisia laboratoriomenettelyjä tai julkaistuja menetelmiä mutanttien seulomiseksi saadaan suositelluista siirtogeenisiä eläimiä koskevista malleista: *lacZ* lambda bacteriophage and plasmid -malli (30); *lacI* mouse -malli (2)(18); *gpt* delta mouse -malli (22); *gpt* delta rat -malli (28); *cII*-malli (17). Muutoksia olisi perusteltava ja dokumentoitava asianmukaisesti. Tietoja useista pakkauksista voidaan yhdistää ja käyttää, jotta saadaan sopiva määrä plakkeja tai pesäkkeitä. Tarve suurelle määrälle pakkausten reaktioita — jotta saadaan sopiva määrä plakkeja — voi kuitenkin olla osoitus heikkolaatuisesta DNA:sta. Tällaisissa tapauksissa tietoja olisi tarkasteltava varovaisesti, koska ne voivat olla epäluotettavia. Plakkien tai pesäkkeiden optimaalista kokonaismäärää DNA-näytettä kohti sääntelee tilastollinen todennäköisyys seuloa riittävän monta mutanttia tietyllä spontaanimutaatiotaajuudella. Yleisesti ottaen tarvitaan vähintään 125 000–300 000 plakkia, jos spontaanimutaatiotaajuus on 3×10^{-5} (15). Big Blue® *lacI* -testimallin osalta on

▼M5

tärkeää osoittaa, että koko sarja mutanttien värin fenotyyppejä voidaan havaita sisällyttämällä sopivia värikontrolleja rinnakkain kunkin maljauksen kanssa. Kudoksia ja saatua näytteitä (eriä) olisi käsiteltävä ja analysoitava käyttäen lohkokoetta, jossa kantaja-ainekontrollin/liuotinkontrollin ryhmän, positiivisen kontrollin ryhmän (jos sitä käytetään) tai positiivisen kontrolli-DNA:n ryhmän (tarvittaessa) ja kunkin koeryhmän erät käsitellään yhdessä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

40. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot olisi esitettävä taulukossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Raporttiin olisi sisällyttävä kustakin eläimestä plakkia muodostavien yksiköiden tai pesäkkeitä muodostavien yksiköiden kokonaismäärä, mutanttien määrä ja kunkin kudoksen mutaatiotaajuus. Jos esiintyy useita reaktioita pakkausta/vapautumista kohti, olisi ilmoitettava reaktioiden määrä DNA-näytettä kohti. Tiedot kustakin yksittäisestä reaktiosta olisi säilytettävä, mutta ainoastaan plakkia muodostavien yksiköiden tai pesäkkeitä muodostavien yksiköiden kokonaismäärä olisi ilmoitettava. Tiedot 34 kohdassa tarkoitetuista myrkyllisyysvaikutuksista ja kliinisistä oireista olisi ilmoitettava. Sekventointitulokset olisi esitettävä kustakin analysoidusta mutantista. Tästä johtuvat mutaatiotaajuutta koskevat laskelmat kustakin eläimestä ja kudoksesta olisi esitettävä.

Tilastollinen arviointi ja tulosten tulkinta

41. Positiivisen tuloksen määrittelemistä varten on useita kriteerejä, kuten annoksesta riippuva mutaatiotaajuuden lisääntyminen, tai mutaatiotaajuuden selkeä lisääntyminen yhdessä koeryhmässä verrattuna liuotinta/kantaja-ainetta saavaan kontrolliryhmään. Vähintään kolmea annosryhmää olisi analysoitava, jotta tarjotaan riittävästi tietoa altistumis-vastesuhdetta koskevaa analyysia varten. Vaikka tulosten biologinen merkitys on ensisijainen näkökohta, asianmukaisia tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testin tulosten arvioinnissa (4)(14)(15)(25)(26). Käytetyissä tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä olisi pidettävä eläintä.

42. Testikemikaalia, joiden osalta tulokset eivät täytä edellä mainittuja kriteerejä missään kudoksessa, pidetään tässä testissä ei-mutageenisenä. Negatiivisen tuloksen biologista merkitystä varten kudosten altistus olisi vahvistettava.

43. DNA:n sekvensointianalyysien osalta on saatavilla useita tilastollisia menetelmiä, joilla tuetaan tulosten tulkintaa (1)(5)(9)(19).

44. Sen tarkastelemisella, ovatko havaitut arvot aikaisemman kontrollin arvojen puitteissa, voidaan antaa ohjeita, kun arvioidaan vasteen biologista merkitystä (32).

▼**M5**

Tutkimusseloste

45. Tutkimusselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot mukaan lukien CAS-numero, jos tiedossa,

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— fysikaalinen olomuoto ja puhtaus

— tutkimuksen suorittamiselle merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulointien analyyttiset määritelmät (kuten stabiilius, homogeenisyys, nimelliset pitoisuudet)

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— toimittaja, häkit, ravinto ja niin edelleen

— eläinten yksilöllinen paino testin alussa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

— raja-annostutkimuksen tulokset

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin antotavasta

— antotavan valintaperusteet

— eläinten myrkyllisyysvaikutusten mittaamista koskevat menetelmät, missä käytetään tarvittaessa histopatologisia tai verianalyyseja, ja tiedot siitä, kuinka usein eläimiä koskevat havainnot ja ruumiinpainon mittaukset otettiin

— menettelyt, joilla varmistetaan, että testikemikaali välittyi kohdekudokseen tai verenkiertoon, jos saadaan negatiivisia tuloksia

▼**M5**

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtaiset tiedot koe- ja näyteaikataulusta ja perustelut valinnoille

— lopettamistapa

— menetelmät eristää ja säilöä kudoksia

— menetelmät eristää jyrsijöiden genomista DNA:ta, eristää siirtogeeni genomisesta DNA:sta ja kuljettaa siirtogeeninen DNA bakteeri-isäntään

— kaikkien solujen, mittaussarjojen ja reagenssien lähde ja eränumerot (tarvittaessa)

— mutanttien laskemista koskevat menetelmät

— mutanttien molekyylianalyysi ja käyttö klonaalisuuden ja/tai mutaatiotaajuuden laskennan korjaamisessa (tarvittaessa)

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana, mukaan lukien toksisuusoireet

— ruumiin ja elinten painot lopetettaessa

— kunkin kudoksen/eläimen osalta mutanttien lukumäärä, arvioitujen plakkien tai pesäkkeiden lukumäärä, mutaatiotaajuus

— kunkin kudoksen/eläinryhmän osalta pakkausreaktioiden lukumäärä DNA-näytettä kohti, mutanttien kokonaismäärä, keskimääräinen mutaatiotaajuus, keskihajonta

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— kunkin kudoksen/eläimen osalta yksittäisten mutanttien lukumäärä, keskimääräinen mutaatiotaajuus, jos mutaatioista on tehty molekyylianalyysi

— rinnakkaiset ja aikaisemmat negatiivista kontrollia koskevat tiedot, joihin sisältyvät vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonta

— rinnakkaiset positiivista kontrollia (tai ei-rinnakkaiset DNA:n positiivista kontrollia) koskevat tiedot

— analyyttiset määritelmät, jos saatavilla (kuten DNA, pakkauksessa käytetyt pitoisuudet, DNA:n sekvensointitiedot)

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät

Tulosten pohdinta

Päätelmä

▼**M5**

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol*., 194: 391–396.

(2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice' *, Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485–7489.

(8) Douglas, G.R*.,* J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2–3): 197–212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations' *in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125–136.

(13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96–106.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253–259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003),'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene TARGET', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772–778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi$^-$ and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi$^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*., 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N^{o}19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N^o 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, … G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164–193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71–78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141–151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ T*ransgenic Mice for studying Mutations' *in vivo* in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, s. 391–410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res*., 578(1–2): 117–123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198–236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, s. 1071–1148.

(36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

Lisäys

MÄÄRITELMÄT:

Altistusaika: se ajanjakso kokonaisuudessaan, jolloin eläimelle annetaan annoksia.

Emäsparin korvautuminen: mutaatiotyyppi, joka johtaa yhden DNA:n nukleotidiemäksen korvautumisen toisella DNA:n nukleotidiemäksellä.

Kapsidi: viruspartikkelin kuorena oleva proteiini.

Kemikaali: aine tai aineiden seos.

Kloonaalinen laajeneminen: useiden solujen tuotanto yhdestä solusta (mutanttisolu).

Pesäkkeitä muodostava yksikkö: elinkykyisten (elävien) bakteerien määrän mitta.

Konkatameeri: pitkä jatkuva biomolekyyli, joka koostuu moninkertaisista samanlaisista kopioista, jotka liittyvät sarjaan.

Cos-kohta: 12 nukleotidin segmentti yksijuosteisesta DNA:sta, joka on olemassa lambda-faagin (bakteriofagi lambda) kaksijuosteisen genomin kummassakin päässä.

Deleetio: mutaatio, jossa genomista häviää yksi tai useampi (peräkkäinen) nukleotidi.

Elektroporaatio: sähköiskujen käyttäminen, jolla lisätään solun kalvojen läpäisykykyä.

Endogeeninen geeni: genomiin kuuluva geeni.

Ekstrabinomiaalinen vaihtelu: suurempi vaihtelu populaation osuuden toiston arviossa kuin oletettaisiin, jos populaatio olisi binomijakautunut.

Lukukehysmutaatio: geneettinen mutaatio, jonka aiheuttavat useiden nukleotidien insertiot tai deleetiot ja jota ei voida jakaa tasan kolmella DNA-sekvensissä, joka koodaa proteeinia/peptidiä.

Insertio: yhden tai useamman nukleotidin emäsparin liittyminen DNA-sekvenssiin.

Jackpot-mutaatio: suuri määrä mutantteja, jotka syntyivät klonaalisella laajentamisella yhdestä mutaatiosta.

Suuret deleetiot: usean kiloemäksen deleetiot DNA:ssa (jotka havaitaan tehokkaasti Spi^- selection- ja lacZ plasmid -mallin testeissä).

Ligaatio: DNA-molekyylien kahden pään välinen kovalenttinen side käyttäen DNA-ligaasia.

Mitogeeni: kemikaali, joka stimuloi solua kiihdyttämään solunjakautumista käynnistäen mitoosin (eli solun jakautumisen).

Neutraali geeni: geeni, johon positiivinen tai negatiivinen selektiivinen paine ei vaikuta.

Pakkaus: infektoivan faagin partikkeleiden, jotka ovat peräisin faagin kapsidin ja häntäproteiinien preparaatiosta, ja faagin DNA-molekyylien konkatameerin synteesi. Käytetään yleisesti pakkaamaan DNA:ta, joka on kloonattu lambdavektoriin (jota erottavat cos-kohdat), infektoiviksi lambdahiukkasiksi.

Pakkaustehokkuus: tehokkuus, jolla pakatut bakteriofagit vastaanotetaan bakteeri-isännässä.

▼M5

Plakin muodostava yksikkö (PFU): elinkykyisten bakteriofagien määrän mitta.

Pistemutaatio: yleinen termi mutaatiolle, joka vaikuttaa vain lyhyeen DNA-sekvenssiin mukaan lukien pienet insertiot, deleetiot ja emäsparin korvautumiset.

Positiivinen valinta: menettely, jonka perusteella ainoastaan mutantit voivat selviytyä.

Reportterigeeni: geeni, jonka mutanttigeenituote on helposti havaittavissa

Näytteenottoaika: se eläimen lopettamista edeltävän ajanjakson loppu, jonka aikana kemikaalia ei anneta ja jonka aikana korjaamattomat DNA-vauriot kiinnittyvät stabiileihin mutaatioihin.

Sukkulavektori: vektori, joka on muodostunut niin, että se voi toimia kahdessa eri isäntäsolutyypissä; vastaavasti DNA:ta, joka liitetään sukkulavektoriin, voidaan testata tai käsitellä kahdessa eri solutyypissä tai kahdessa eri organismissa.

Testikemikaali: mikä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

Siirtogeeninen: sellainen organismi (tai organismiin liittyvä tai siitä peräisin oleva organismi), jonka genomia on muutettu siirtämällä siihen toisen lajin geeni tai geenejä.

▼M7

B.59. *IN CHEMICO* -IHOHERKISTYS: DPRA (DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY)

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 442C (2015). Ihoa herkistävällä aineella tarkoitetaan Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) määritelmän mukaisesti ainetta, joka aiheuttaa ihokosketuksen seurauksena allergisen reaktion. ([1]) Tämä testimenetelmä on *in chemico* -menetelmä (Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA), joka auttaa erottamaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista YK:n GHS-järjestelmän sekä CLP-asetuksen mukaisesti.

Ihon herkistymisen taustalla vaikuttavista keskeisistä biologisista tapahtumista vallitsee yleinen yhteisymmärrys. Olemassa olevat tiedot ihon herkistymiseen liittyvistä kemiallisista ja biologisista mekanismeista on esitetty tiivistetysti haittavaikutusreitin (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) muodossa herkistymisen käynnistävästä molekyylitason tapahtumasta välivaiheiden kautta aina haittavaikutukseen eli ihmisen allergiseen kosketusihottumaan tai jyrsijän kosketusallergiaan. Ihon herkistymisen haittavaikutusreitissä herkistymisen käynnistävä molekyylitason tapahtuma on se, että elektrofiiliset aineet muodostavat kovalenttisidoksen ihon proteiinien nukleofiilisiin keskuksiin.

Ihon herkistymisen arvioinnissa on käytetty yleensä koe-eläimiä. Marsujen käyttöön perustuvilla klassisilla menetelmillä – Magnusson–Kligmanin GMPT-testillä (Guinea Pig Maximisation Test) ja Buehlerin testillä (TM B.6 (3)) – tutkitaan ihon herkistymisen induktio- ja haastevaihetta. Myös hiirillä tehty LLNA-koe (Local Lymph Node Assay, TM B.42 (4)) ja sen kaksi ei-radioaktiivista muunnosta (LLNA: DA (TM B.50 (5)) ja LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), joilla kaikilla arvioidaan vain induktiovastetta, ovat saaneet hyväksyntää, sillä marsukokeisiin verrattuna niillä on eläinten hyvinvointiin liittyviä hyötyjä ja niillä mitataan objektiivisesti ihon herkistymisen induktiovaihetta.

Viime aikoina mekanistispohjaiset *in chemico*- ja *in vitro* -testimenetelmät on katsottu tieteellisesti päteviksi menetelmiksi kemikaalien ihoherkistysvaaran arviointiin. Jotta käytössä olevat eläinkokeet voidaan korvata täysin, testausta ja arviointia koskeviin yhdennettyihin lähestymistapoihin (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) tarvitaan kuitenkin eläinkokeettomien menetelmien (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) yhdistelmiä, sillä kullakin nykyisin käytettävissä olevalla eläinkokeettomalla testimenetelmällä voidaan kattaa haittavaikutusreitti mekanistisesti vain rajallisesti (2) (7).

DPRA-menetelmällä on tarkoitus tutkia ihon herkistymisen haittavaikutusreitissä herkistymisen käynnistävää molekyylitason tapahtumaa eli proteiinin reaktiivisuutta kvantifioimalla testikemikaalien reaktiivisuutta suhteessa mallin synteettisiin peptideihin, jotka sisältävät joko lysiiniä tai kysteiiniä (8). Tämän jälkeen kysteiiniä ja lysiiniä sisältävien peptidien depleetioarvojen avulla aine luokitellaan yhteen neljästä reaktiivisuusluokasta, mikä auttaa erottelemaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista (9).

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

DPRA-menetelmää on arvioitu Euroopan unionin vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien vertailulaboratorion (EURL ECVAM) johtamassa validointitutkimuksessa, minkä jälkeen sen tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) teki riippumattoman vertaisarvioinnin. Menetelmän katsottiin olevan tieteellisesti pätevä (10) käytettäväksi osana testausta ja arviointia koskevaa yhdennettyä lähestymistapaa (IATA) ihoa herkistävien aineiden erottamiseen herkistystä aiheuttamattomista aineista vaaran luokittelua varten ja merkintätarkoituksiin. Kirjallisuudessa annetaan esimerkkejä siitä, miten DPRA-menetelmällä saatuja tietoja on käytetty muihin tietoihin yhdistettyinä (11) (12) (13) (14).

Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT, KÄYTETTÄVYYS JA RAJOITUKSET

Proteiinin reaktiivisuuden on vahvistettu korreloivan ihon herkistämispotentiaalin kanssa (15) (16) (17). Koska proteiinin sitoutuminen on kuitenkin haittavaikutusreitissä vain yksi keskeinen tapahtuma, joskin ihon herkistymisen käynnistävä molekyylitason tapahtuma, testaamiseen perustuvilla ja muilla menetelmillä hankittu tieto proteiinin reaktiivisuudesta ei välttämättä riitä itsessään osoittamaan, etteivät kemikaalit voi herkistää ihoa. Siksi tällä testimenetelmällä tuotettuja tietoja pitäisi tarkastella yhdennettyjen lähestymistapojen (esimerkiksi IATA) valossa yhdistämällä ne muihin, täydentäviin tietoihin, kuten tietoihin, jotka on saatu *in vitro* -kokeilla, joissa tutkitaan ihon herkistymisen haittavaikutusreitin muita keskeisiä tapahtumia, sekä testittömillä menetelmillä, joihin kuuluu muun muassa interpolointi (read-across) samankaltaisista kemikaaleista.

Tätä testimenetelmää voidaan käyttää yhdessä muiden täydentävien tietojen kanssa ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamiseen herkistystä aiheuttamattomista aineista IATA:n valossa. Tätä testimenetelmää ei voida käyttää yksinään ihoa herkistävien aineiden luokittelemiseen YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokkiin 1A ja 1B eikä niiden vaikutuksen ennustamiseen turvallisuuden arviointiin liittyvää päätöksentekoa varten. Sääntelykehyksestä riippuen DPRA-menetelmällä saatua positiivista tulosta voidaan kuitenkin sellaisenaan käyttää kemikaalin luokitteluun YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1.

DPRA-testimenetelmän on osoitettu olevan siirrettävissä laboratorioihin, joilla on kokemusta korkean suorituskyvyn nestekromatografisista (HPLC) analyyseista. Testimenetelmällä odotettavasti saatavien ennusteiden toistettavuus on 85 prosentin luokkaa laboratorioissa ja 80 prosentin luokkaa laboratorioiden välillä (10). Validointitutkimuksen (18) ja kaikkiaan julkaistujen tutkimusten (19) tulokset viittaavat siihen, että DPRA:n tarkkuus ihoa herkistävien aineiden erottelussa (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) herkistystä aiheuttamattomista aineista on 80 prosenttia (N = 157), herkkyys 80 prosenttia (88/109) ja spesifisyys 77 prosenttia (37/48) LLNA-kokeen tuloksiin verrattuna. DPRA:lla saadaan todennäköisemmin aliarvioiva ennuste siitä, että kemikaalien ihoherkistyspotentiaali on lievästä kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B) kuin että niiden ihoherkistyspotentiaali olisi suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (18) (19). Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat DPRA-menetelmän käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testimenetelmää pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATA:n valossa ja edellä olevan kohdan 9 mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-koe samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta kiinnostuksen kohteena olevan lajin eli ihmisen tapauksessa. Saatavana olevat kokonaistiedot osoittavat, että DPRA-menetelmällä voidaan testata kemikaaleja, jotka kuuluvat moniin orgaanisiin toiminnallisiin ryhmiin, joilla on monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden ihoherkistyspotentiaaleissa on suuria eroja (*in vivo* -tutkimusten mukaan) ja joilla on monenlaisia psykokemiallisia ominaisuuksia (8) (9) (10) (19). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että DPRA-menetelmää voidaan käyttää apuna ihon herkistymisvaaran tunnistamisessa.

▼M7

Tässä testimenetelmässä käytetyllä termillä ”testikemikaali” tarkoitetaan sitä, mitä testataan, eikä termi liity siihen, voidaanko DPRA-menetelmää käyttää aineiden ja/tai seosten testaamiseen. Tätä testimenetelmää ei voida käyttää metalliyhdisteiden testaamiseen, sillä niiden tiedetään reagoivan proteiinien kanssa muilla tavoin kuin muodostamalla kovalenttisidoksia. Testikemikaalin pitäisi liueta sopivaan liuottimeen, niin että lopullisen liuoksen pitoisuus on 100 mM (ks. 18 kohta). Ellei testikemikaali liukene niin, että tällainen pitoisuus olisi saavutettavissa, sitä voidaan kuitenkin testata alhaisemmalla pitoisuudella. Tällöin positiivisen tuloksen perusteella testikemikaali voidaan edelleen määrittää ihoa herkistäväksi aineeksi, mutta negatiivisen tuloksen perusteella ei voida tehdä varmoja päätelmiä reaktiivisuuden puuttumisesta. Siitä, voidaanko DPRA-menetelmää käyttää seoksiin, joiden koostumus on tiedossa, on tällä hetkellä saatavana vain rajallisesti tietoa (18) (19). DPRA-menetelmän katsotaan kuitenkin olevan teknisesti käytettävissä monesta aineosasta muodostuvien aineiden testaamiseen sekä sellaisten seosten testaamiseen, joiden koostumus on tiedossa (ks. 18 kohta). Ennen kuin tällä testimenetelmällä testataan seosta, jotta testillä voidaan tuottaa tuloksia haluttua, sääntelyyn perustuvaa tarkoitusta varten, olisi pohdittava sitä, saadaanko testillä riittävät tulokset kyseiseen tarkoitukseen, ja jos saadaan, niin miksi. Tällaisia pohdintoja ei tarvita, kun sääntely edellyttää kyseisen seoksen testaamista. Nykyistä ennustemallia ei voida käyttää monimutkaisiin seoksiin, joiden koostumus ei ole tiedossa, tai aineisiin, joiden koostumus ei ole tiedossa tai se vaihtelee, monimutkaisiin reaktiotuotteisiin tai biologisiin aineisiin (eli UVCB-aineisiin) testikemikaalin ja peptidin tarkan moolisuhteen vuoksi. Tähän tarkoitukseen on kehitettävä uusi ennustemalli, joka perustuu gravimetriseen menetelmään. Testimenetelmällä ei pidä testata tiettyjä muita kemikaaliluokkia, joiden testaamiseen se ei todistetusti sovellu.

Tämä testimenetelmä on *in chemico* -menetelmä, jota ei tehdä metabolisessa järjestelmässä. Testimenetelmä ei tunnista kemikaaleja, joiden kohdalla ihon herkistyminen edellyttää entsymaattista bioaktivointia (eli pro-hapteeneja). Testimenetelmän on todettu havaitsevan toisinaan oikein kemikaalit, joista tulee herkistäviä abioottisen transformaation jälkeen (pre-hapteenit) (18). Edellä esitetyn valossa testimenetelmällä saatuja negatiivisia tuloksia pitäisi tulkita ottaen huomioon esitetyt rajoitukset sekä yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATA:n valossa. Testikemikaalit, jotka eivät muodosta kovalenttisidosta peptidiin vaan edistävät sen hapettumista (kysteiinidimerisaatio), voivat aiheuttaa peptidideplеetion yliarvioinnin, mikä saattaa mahdollisesti johtaa virheelliseen positiiviseen ennusteeseen ja/tai siihen, että kemikaali luokitellaan ylempään reaktiivisuusluokkaan (ks. 29 ja 30 kohta).

Kuten edellä on kuvattu, DPRA auttaa erottamaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista. Siitä voi kuitenkin myös olla apua herkistyspotentiaalin (11) arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATA:ta. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten DPRA-menetelmän tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa.

TESTIN PERIAATE

DPRA on *in chemico* -menetelmä, jolla kvantifioidaan kysteiinia tai lysiinia sisältävän peptidin jäännöspitoisuus, kun sitä on inkuboitu 24 tuntia testikemikaalin kanssa 25 ± 2,5 °C:ssa. Synteettiset peptidit sisältävät fenyylialaniinia, joka auttaa havaitsemisessa. Suhteellinen peptidipitoisuus mitataan korkean suorituskyvyn nestekromatografialla (HPLC) käyttäen gradienttieluutiota ja UV-detektiota (220 nm). Tämän jälkeen lasketaan kysteiini- ja lysiinipeptidin prosentuaaliset depleetioarvot, joita käytetään ennustemallissa (ks. 29 kohta); sen avulla testikemikaali luokitellaan yhteen neljästä reaktiivisuusluokasta, joiden avulla ihoa herkistävät kemikaalit erotetaan muista kemikaaleista.

▼M7

Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään rutiininomaisesti tämän testimenetelmän mukaista menetelmää, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 2 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla.

MENETTELY

Testimenetelmä perustuu DPRA DB-ALM -testiprotokollaan nro 154 (20), joka on EURL:n ECVAMin koordinoimassa validointitutkimuksessa käytettävä protokolla. Suosituksena on käyttää tätä protokollaa, kun menetelmä otetaan käyttöön ja sitä käytetään laboratoriossa. Seuraavassa kuvataan DPRA:n päävaiheet ja menettelyt. Vaihtoehtoista HPLC-mittausta käytettäessä on osoitettava sen vastaavan DB-ALM-protokollassa kuvattua validoitua mittausta (esimerkiksi tekemällä testi lisäyksessä 2 luetelluilla pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla).

Kysteiinia tai lysiinia sisältävien peptidien valmistelu

Kysteiinia (Ac-RFAA**C**AA-COOH) ja lysiiniä (Ac-RFAA**K**AA-COOH) sisältäviä synteettisiä peptidejä sisältävät kantaliuokset pitäisi valmistaa juuri ennen niiden inkubointia testikemikaalin kanssa, ja niiden puhtausasteen on oltava yli 85 prosenttia ja mieluiten 90–95 prosenttia. Kysteiinipeptidin lopullisen pitoisuuden pitäisi olla 0,667 mM fosfaattipuskurissa, jonka pH-arvo on 7,5, kun taas lysiinipeptidin lopullisen pitoisuuden pitäisi olla 0,667 mM ammoniumasetaattipuskurissa, jonka pH-arvo on 10,2. HPLC-ajosekvenssi pitäisi suunnitella siten, että HPLC-analyysi kestää alle 30 tuntia. Validointitutkimuksessa käytettävässä ja tässä testimenetelmässä kuvatussa HPLC-mittauksessa yksi HPLC-ajo voi käsittää jopa 26 analyysinäytettä (jotka käsittävät testikemikaalin, positiivisen kontrollin ja sopivan määrän liuotinkontrolleja testissä käytettyjen yksittäisten liuottimien määrän mukaan, ja näistä kukin testataan kolmesti). Kaikissa samassa ajossa analysoiduissa rinnakkaisnäytteissä pitäisi käyttää täysin samaa kysteiini- ja lysiinipeptidikantaliuosta. Yksittäisten peptidierien liukoisuuden asianmukaisuus on suositeltavaa osoittaa ennen niiden käyttöä.

Testikemikaalin valmistelu

Testikemikaalin liukoisuutta sopivaan liuottimeen pitäisi arvioida ennen testin tekemistä DPRA DB-ALM -protokollassa kuvatun liukoisuusmenettelyn mukaisesti (20). Sopivaan liuottimeen testikemikaali liukenee täysin. Koska DPRA:ssa testikemikaalia, jota inkuboidaan joko kysteiini- tai lysiinipeptidien kanssa, on huomattavasti tarvittavaa suurempi määrä, silmämääräistä tarkastusta, jossa todetaan kirkkaan liuoksen muodostuminen, pidetään riittävänä keinona varmistaa testikemikaalin (ja kaikkien sen aineosien, jos testattava kemikaali on monesta aineosasta muodostuva aine tai seos) liukeneminen. Sopivia liuottimia ovat asetonitriili, vesi, asetonitriilin, isopropanolin tai asetonin ja veden seos, jonka sekoitussuhde on 1:1, taikka asetonin ja asetonitriilin seos, jonka sekoitussuhde on 1:1. Muita liuottimia voidaan käyttää, kunhan ne eivät vaikuta peptidin stabiilisuuteen, jota seurataan C-vertailukontrollien avulla (tällä tarkoitetaan näytteitä, joissa sopivaan liuottimeen on liuotettu pelkkää peptidiä; ks. lisäys 3). Ellei testikemikaali liukene mihinkään näistä liuottimista, viimeisenä vaihtoehtona on yritettävä liuottaa se 300 µL:aan dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja liuottaa näin syntyvä liuos 2 700 µL:aan asetonitriiliä, ja ellei testikemikaali liukene tähänkään seokseen, on yritettävä liuottaa sama määrä testikemikaalia 1 500 µL:aan dimetyylisulfoksidia ja liuottaa näin syntyvä liuos 1 500 µL:aan asetonitriiliä. Testikemikaali on punnittava ja annosteltava etukäteen lasipulloihin ja liuotettava välittömästi ennen testaamista sopivaan liuottimeen 100 mM:n liuokseksi. Kun kyseessä on seos tai monesta aineosasta koostuva aine, jonka koostumus on tiedossa, on määritettävä sen yleinen puhtausaste laskemalla yhteen aineosien suhteet (lukuun ottamatta vettä) sekä määritettävä yleinen näennäinen molekyylimassa ottamalla huomioon seoksen kunkin aineosan molekyylimassat (lukuun ottamatta vettä) ja niiden suhteet. Näin lasketun puhtausasteen ja näennäisen molekyylimassan perusteella pitäisi sitten laskea 100 mM:n liuoksen valmistamiseen tarvittavan testikemikaalin massa. Kun kyseessä on polymeeri, jonka vallitsevaa molekyylimassaa ei voida määrittää, 100 mM:n liuoksen valmistuksessa voidaan ottaa huomioon monomeerin molekyylimassa (tai polymeerin sisältämien

▼M7

eri monomeerien näennäinen molekyylimassa). Testattaessa seoksia, monesta aineosasta koostuvia aineita tai polymeereja, joiden koostumus on tiedossa, on kuitenkin harkittava myös laimentamattoman kemikaalin testaamista. Kun kyseessä on neste, laimentamatonta kemikaalia pitäisi testata sellaisenaan ilman etukäteisliuotusta inkuboimalla sitä kysteiini- ja lysiinipeptidien kanssa, niin että moolisuhde on 1:10 kysteiinipeptidien ja 1:50 lysiinipeptidien tapauksessa. Kun kyseessä on kiinteä aine, testikemikaalia on liuotettava suurin liukeneva määrä samaan liuottimeen, jota käytetään näennäisesti 100 mM:n liuoksen valmistamiseen. Tämän jälkeen sitä pitäisi testata sellaisenaan tekemättä muita liuotuksia inkuboimalla sitä kysteiini- ja lysiinipeptidien kanssa, niin että moolisuhde on 1:10 kysteiinipeptidien ja 1:50 lysiinipeptidien tapauksessa. Tuloksesta voidaan tehdä pysyvä päätelmä, jos näennäisesti 100 mM:n liuoksella ja liuottamattomalla kemikaalilla saadut tulokset ovat yhtäpitävät (reaktiivinen/ei-reaktiivinen).

Positiivisen kontrollin, vertailukontrollien ja koeluointikontrollien valmistelu

Positiivisena kontrollina (PC) pitäisi käyttää kanelialdehydia (CAS 104-55-2; ≥95 % puhtaudeltaan elintarvikelaatuista), joka on liuotettu asetonitriiliin, niin että pitoisuus on 100 mM. On myös mahdollista käyttää muita sopivia positiivisia kontrolleja, joilla mieluiten saadaan keskitasoa edustavat depleetioarvot, jos saatavilla on aiempia tietoja, joista saadaan vertailukelpoiset ajon hyväksyttävyysperusteet. Lisäksi HPCL-testijaksoon pitäisi kuulua myös vertailukontrolleja (eli näytteitä, jotka sisältävät vain sopivaan liuottimeen liuotettua peptidiä), joiden avulla varmistetaan HPLC-järjestelmän sopivuus ennen analyysia (A-vertailukontrollit) ja vertailukontrollien stabiilisuus ajan mittaan (B-vertailukontrollit) ja se, että testikemikaalin liuottamiseen käytetty liuotin ei vaikuta peptidin depleetioasteeseen (C-vertailukontrollit) (ks. lisäys 3). Kullekin kemikaalille sopivan vertailukontrollin avulla lasketaan peptidin depleetioaste kyseisen kemikaalin osalta (ks. 26 kohta). Lisäksi ajosekvenssiin pitäisi kuulua kunkin analysoitavan testikemikaalin osalta pelkästä testikemikaalista muodostuva koeluutiokontrolli, jotta voidaan havaita testikemikaalin mahdollinen koeluutio joko lysiini- tai kysteiinipeptidin kanssa.

Testikemikaalin inkubointi kysteiini- ja lysiinipeptidiliuosten kanssa

Kysteiini- ja lysiinipeptidiliuoksia on inkuboitava automaattisen näytteensyöttölaitteen lasipulloissa testikemikaalin kanssa niin, että kysteiiniliuoksen sekoitussuhde on 1:10 ja lysiiniliuoksen 1:50. Jos välittömästi sen jälkeen, kun testikemikaaliliuosta on lisätty peptidiliuokseen, havaitaan saostumista, joka johtuu testikemikaalin heikosta liukenevuudesta veteen, on epävarmaa, miten paljon testikemikaalia liuokseen jää reagoimaan peptidin kanssa. Siksi positiivinen tulos on tällöin edelleen käyttökelpoinen, mutta negatiivinen tulos on epävarma ja sitä on tulkittava asianmukaisella varovaisuudella (ks. myös kohdan 11 vaatimukset sellaisten kemikaalien testaamisesta, jotka eivät liukene 100 mM:n pitoisuutena). Reaktioliuosta pidetään pimeässä 25 ± 2,5 °C:ssa 24 ± 2 tuntia ennen HPLC-analyysin tekemistä. Kukin testikemikaali on analysoitava kolmesti kummankin peptidin osalta. Ennen HPLC-analyysia näytteet on tarkastettava silmämääräisesti. Jos näytteissä havaitaan sakkaa tai faasiutumista, ne voidaan sentrifugoida alhaisella nopeudella (100–400 xg), niin että sakka laskeutuu pullon pohjaan; tämä on varotoimenpide, sillä suuri sakkamäärä voi tukkia HPLC-laitteen putket tai kolonnit. Inkubointivaiheen aikana havaittu saostuminen tai faasiutuminen on merkki siitä, että peptididepleetio saatetaan aliarvioida, eikä negatiivisen tuloksen pohjalta voida tehdä riittävällä varmuudella päätelmää reaktiivisuuden puuttumisesta.

▼M7

HPCL-standardikalibrointikäyrän laatiminen

Kysteiini- ja lysiinipeptideille on laadittava standardikalibrointikäyrät. Niiden laadinnassa on käytettävä liuosta, jossa asetonitriili suhde puskuriin on 20 tai 25 prosenttia, niin että kysteiinipeptidin tapauksessa käytetään fosfaattipuskuria (pH 7,5) ja lysiinipeptidin tapauksessa käytetään ammoniumasetaattipuskuria (pH 10,2). Peptidikantaliuoksesta (0,667mM) valmistetaan laimentamalla kuuden kalibrointiliuoksen sarja, joka kattaa pitoisuusalueen 0,534–0,0167 mM. Standardikalibrointikäyrään pitäisi sisältyä myös nollanäyte, joka sisältää pelkkää laimennuspuskuria. Sopivassa kalibrointikäyrässä $r^2 > 0,99$.

HPLC-analyysin valmistelu ja suorittaminen

Ennen analyysin tekemistä on varmistettava HPCL-järjestelmän sopivuus. Peptidepleetiota seurataan HPLC-järjestelmällä, joka on liitetty UV-detektoriin (valodiodirividetektori tai kiinteän aallonpituuden absorptiodetektori; signaali 220 nm). HPLC-järjestelmään asennetaan sopiva kolonni. Validoidussa protokollassa kuvatussa HPLC-laitteistossa käytettävä kolonni on ensisijaisesti Zorbax SB-C-18 2,1 mm x 100 mm × 3.5 µ. Tätä HPLC-käänteisfaasikolonnia käytettäessä koko järjestelmä pitäisi tasapainottaa 30 °C:ssa, niin että 50 prosenttia on faasia A (0,1 tilavuusprosenttia trifluoroetikkahappoa vedessä) ja 50 prosenttia on faasia B (0,085 tilavuusprosenttia trifluoroetikkahappoa asetonitriilissä) vähintään kaksi tuntia ennen analyysin suorittamista. HPLC-analyysissa käytettävä virtausnopeus on 0,35 ml/min, ja lineaarisen gradientin avulla asetonitriili nostetaan 10 prosentista 25 prosenttiin 10 minuutissa, minkä jälkeen asetonitriili nostetaan nopeasti 90 prosenttiin muiden aineiden poistamiseksi. Standardia, näytettä ja kontrollia pitäisi ruiskuttaa yhtä suuret määrät. Ruiskutusten välillä kolonnia on tasapainotettava uudelleen alkuperäisissä olosuhteissa seitsemän minuutin ajan. Erilaista HPLC-käänteisfaasikolonnia käytettäessä edellä kuvattuja järjestelmän muuttujia saattaa olla tarpeen säätää kysteiini- ja lysiinipeptidien sopivan eluution ja integraation varmistamiseksi; tämä koskee myös ruiskutusmäärää, joka voi vaihdella käytettävän järjestelmän mukaan (yleensä 3–10 µl). Vaihtoehtoista HPLC-järjestelmää käytettäessä on tärkeää osoittaa, että se vastaa edellä kuvattua validoitua järjestelmää (esimerkiksi testaamalla lisäyksen 2 mukaiset pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet). Absorbanssia seurataan 220 nm:ssa. Valodiodirividetektoria käytettäessä pitäisi kirjata myös absorbanssi 258 nm:ssa. On huomattava, että jotkin asetonitriilin lähteet voivat vaikuttaa kielteisesti peptidin stabiilisuuteen, ja tätä on arvioitava uutta asetonitriilierää käytettäessä. 220 nm:ssa kirjatun piikin pinta-alan ja 258 nm:ssa kirjatun piikin pinta-alan suhdetta voidaan käyttää koeluution indikaattorina. Kunkin näytteen tapauksessa suhteen sijoittuminen alueelle 90 % < kontrollinäytteiden suhteen keskiarvoalue ([1]) <100 % olisi hyvä merkki siitä, että koeluutiota ei ole tapahtunut.

Jotkin testikemikaalit saattavat edistää kysteiinipeptidin hapettumista. Dimerisoituneen kysteiinipeptidin piikkiä voidaan seurata silmämääräisesti. Jos dimerisaatiota näyttää tapahtuneen, tämä on otettava huomioon, sillä peptidin depleetioaste saatetaan yliarvioida, mikä johtaa vääriin positiivisiin ennusteisiin ja/tai siihen, että kemikaali luokitellaan korkeampaan reaktiivisuusluokkaan (ks. 29 ja 30 kohta).

Kysteiini- ja lysiinipeptidien HPLC-analyysi voidaan tehdä samanaikaisesti (jos käytettävissä on kaksi HPLC-järjestelmää) tai eri päivinä. Jos analyysit tehdään eri päivinä, testejä varten on kumpanakin päivänä valmistettava tuoreet testikemikaaliliuokset. Analyysi pitäisi ajoittaa niin, että ensimmäisen näytteen ruiskutus alkaa 22–26 tuntia sen jälkeen, kun testikemikaali on sekoitettu peptidiliuokseen. HPLC-ajosekvenssi pitäisi suunnitella siten, että HPLC-analyysi kestää alle 30

([1]) Keskiarvolla tarkoitetaan koko asiakirjassa aritmeettista keskiarvoa.

▼M7

tuntia. Validointitutkimuksessa käytetty ja tässä testimenetelmässä kuvattu HPLC-järjestelmä mahdollistaa jopa 26 analyysinäytteen käsittelyn yhdessä HPLC-ajossa (ks. myös 17 kohta). HPLC-analyysisekvenssistä annetaan esimerkki lisäyksessä 3.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

Kysteiini- tai lysiinipeptidin pitoisuus kussakin näytteessä määritetään fotometrisesti 220 nm:ssa mittaamalla piikin pinta-ala (käyrän alapuolinen alue, AUC) asianmukaisista piikeistä ja laskemalla peptidipitoisuus käyttämällä standardeista saatua lineaarista kalibrointikäyrää.

Peptidin depleetioaste (%) määritetään kustakin näytteestä mittaamalla piikin pinta-ala ja jakamalla se relevanttien C-vertailukontrollien (ks. lisäys 3) keskimääräisellä piikin pinta-alalla jäljempänä kuvatun kaavan mukaisesti.

$$Peptidin\ depleetioaste = \left[1 - \left(\frac{Peptidin\ piikin\ ala\ toistoruiskutuksessa}{Peptidin\ piikin\ keskimääräinen\ ala\ C - vertailukontrolleissa}\right)\right] \times 100$$

Hyväksyntäperusteet

Jotta ajoa voidaan pitää luotettavana, seuraavien perusteiden on täytyttävä:

a) standardikalibrointikäyrän $r^2 > 0{,}99$

b) positiivisena kontrollina käytettävällä kanelialdehydillä tehdyn kolmen toiston osalta peptidin keskimääräisen prosentuaalisen depleetioasteen pitäisi olla 60,8–100 prosenttia kysteiinipeptidin tapauksessa ja 40,2–69,0 lysiinipeptidin tapauksessa, ja positiivisella kontrollilla tehtyjen toistojen suurimman keskihajonnan (SD) pitäisi olla < 14,9 prosenttia kysteiinin depleetioarvon ja < 11,6 prosenttia lysiinin depleetioarvon osalta; ja

c) A-vertailukontrollien keskimääräisen peptidipitoisuuden pitäisi olla 0,50 ± 0,05 mM, ja yhdeksän B- ja C-vertailukontrollin osalta (liuotettu asetonitriiliin) peptidien piikin pinta-alan variaatiokertoimen (CV) pitäisi olla <15,0 prosenttia.

Jos yksi tai useampi näistä ehdoista ei täyty, ajo on toistettava.

Jotta testikemikaalin tuloksia voidaan pitää luotettavina, seuraavien perusteiden on täytyttävä:

a) testikemikaalilla tehtyjen toistojen keskihajonta saa olla enintään < 14,9 prosenttia kysteiinin depleetioasteen ja < 11,6 prosenttia lysiinin depleetioasteen osalta

b) kolmen C-vertailukontrollin keskimääräisen peptidipitoisuuden (sopivassa liuottimessa) pitää olla 0,50 ± 0,05 mM. Elleivät nämä perusteet täyty, testikemikaali on hylättävä ja ajo on toistettava kyseisen testikemikaalin osalta.

Ennustemalli

Kunkin testikemikaalin osalta lasketaan kysteiinin ja lysiinin keskimääräinen prosentuaalinen depleetioaste. Keskiarvoa laskettaessa negatiivinen depleetio katsotaan nollaksi (0). Taulukon 1 mukaista kysteiini 1:10 / lysiini 1:50 -ennustemallia käyttämällä ihoa herkistävien aineiden ja herkistystä aiheuttamattomien aineiden erottelussa yhdennetyn lähestymistavan (IATA) mukaisesti pitäisi käyttää apuna peptidin keskimääräisen depleetioasteen 6,38 prosentin raja-arvoa. Ennustemallin käyttö testikemikaalin reaktiivisuusluokittelussa (esimerkiksi vähäinen, kohtalainen, suuri reaktiivisuus) saattaa osoittautua hyödylliseksi keinoksi hankkia tietoja potentiaalin arviointiin IATA:n puitteissa.

▼M7

Taulukko 1

Kysteiini 1:10 / lysiini 1:50 -ennustemalli (1)

Kysteiinin ja lysiinin keskimääräinen depleetioaste (%)	Reaktiivisuusluokka	DPRA-ennuste (2)
0 % ≤ keskimääräinen depleetioaste (%) ≤ 6,38 %	Ei reaktiivisuutta tai hyvin vähäinen reaktiivisuus	Negatiivinen
6,38 % < keskimäärinen depleetioaste (%) ≤ 22,62 %	Vähäinen reaktiivisuus	Positiivinen
22,62 % < keskimäärinen depleetioaste (%) ≤ 42,47 %	Kohtalainen reaktiivisuus	
42,47 % < keskimäärinen depleetioaste (%) ≤ 100 %	Suuri reaktiivisuus	

(1) Luvut viittaavat tilastollisiin raja-arvoihin eivätkä liity mittauksen tarkkuuteen.

(2) DPRA-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n sekä kohtien 9 ja 12 vaatimusten valossa.

Joissakin tapauksissa testikemikaali (aine, useammasta aineosasta koostuvan aineen yksi tai useampi aineosa tai seos) saattaa absorboida merkittävästi 220 nm:ssa ja sillä on sama peptidin retentioaika (koeluutio). Koeluutio saattaa ratketa siten, että HPLC-mittausta säädetään hieman niin, että testikemikaalin ja peptidin eluutioaika erotetaan toisistaan. Jos koeluutio yritetään ratkaista käyttämällä vaihtoehtoista HPLC-mittausta, on osoitettava, että se vastaa validoitua mittausta (esimerkiksi tekemällä testi liitteen 2 mukaisilla pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla). Koeluution tapahtuessa peptidin piikkiä ei voida integroida eikä peptidin prosentuaalista depleetioastetta voida laskea. Jos näiden testikemikaalien koeluutiota tapahtuu sekä kysteiini- että lysiinipeptidin kanssa, on todettava, ettei analyysin pohjalta voida tehdä varmoja päätelmiä. Jos koeluutiota tapahtuu vain lysiinipeptidin kanssa, voidaan käyttää taulukon 2 mukaista kysteiini 1:10 -ennustemallia.

Taulukko 2

Kysteiini 1:10 -ennustemalli (1)

Kysteiinin (Kys.) depleetioaste (%)	Reaktiivisuusluokka	DPRA-ennuste (2)
0 % ≤ Kys. depleetioaste (%) ≤ 13,89 %	Ei reaktiivisuutta tai hyvin vähäinen reaktiivisuus	Negatiivinen
13,89 % < Kys. depleetioaste (%) ≤ 23,09 %	Vähäinen reaktiivisuus	Positiivinen
23,09 % < Kys. depleetioaste (%) ≤ 98,24 %	Kohtalainen reaktiivisuus	
98,24 % < Kys. depleetioaste (%) ≤ 100 %	Suuri reaktiivisuus	

(1) Luvut viittaavat tilastollisiin raja-arvoihin eivätkä liity mittauksen tarkkuuteen.

(2) DPRA-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n sekä kohtien 9 ja 12 vaatimusten valossa.

Joissakin tapauksissa on mahdollista, että testikemikaalin ja jommankumman peptidin retentioajan päällekkäisyys jää vaillinaiseksi. Tällaisissa tapauksissa peptidin prosentuaaliset depleetioarvot voidaan arvioida ja niitä voidaan käyttää kysteiini 1:10 / lysiini 1:50 -ennustemallissa, mutta testikemikaalin tarkka reaktiivisuusluokittelu ei ole mahdollista.

▼M7

Yhden HPLC-analyysin pitäisi riittää niin kysteiini- kuin lysiinipeptidinkin osalta yhtä testikemikaalia kohden, kun tulos on yksiselitteinen. Lisätestit saattavat kuitenkin olla tarpeen silloin, kun tulokset sijoittuvat lähelle positiivisten ja negatiivisten tulosten erotteluun käytettävää raja-arvoa. Tilanteissa, joissa keskimääräinen depleetioaste on 3–10 prosenttia kysteiini 1:10 / lysiini 1:50 -ennustemallissa tai kysteiinin prosentuaalinen depleetioaste on 9–17 prosenttia kysteiini 1:10 -ennustemallissa, on harkittava toista ajoa; lisäksi on harkittava kolmatta ajoa siinä tapauksessa, että kahden ensimmäisen ajon tulokset ovat keskenään ristiriidassa.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali

— Yhdestä aineosasta koostuva aine

  — kemikaalin tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

  — fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylimassa ja muut keskeiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

  — puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

  — tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

  — testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

  — säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

— Useammasta aineosasta koostuva aine, koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine sekä seos

  — mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja aineosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

  — fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut keskeiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

  — molekyylimassa tai näennäinen molekyylimassa, kun kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

  — tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

  — testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

  — säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Kontrollit

— Positiivinen kontrolli

  — kemikaalin tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

  — fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylimassa ja muut keskeiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

  — puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

▼M7

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisiin kontrollituloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksyntäkriteereistä.

— Liuotin/kantaja-aine

— tarvittaessa käytetty liuotin/kantaja-aine ja sen aineosien suhde

— kemiallinen nimi (kemialliset nimet), kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet) sekä CAS-numero(t) ja/tai muut tunnistetiedot

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylimassa ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos käytettävät liuottimet/kantaja-aineet ovat muita kuin testimenetelmässä mainittuja, ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— perustelut liuottimen valinnalle kunkin testikemikaalin osalta

— asetonitriilin osalta peptidin stabiilisuuteen kohdistuvaa vaikutusta koskevan testin tulokset.

Peptidien, positiivisen kontrollin ja testikemikaalin valmistelu

— peptidiliuosten luonnehdinta (toimittaja, erä, peptidin tarkka paino, kantaliuosta varten lisättävä volyymi)

— positiivisen kontrolliliuoksen luonnehdinta (positiivisen kontrolliaineen tarkka paino, testiliuosta varten lisättävä volyymi)

— testikemikaaliliuosten luonnehdinta (testikemikaalin tarkka paino, testiliuosta varten lisättävä volyymi).

HPLC-laitekokoonpano ja -analyysi

— HPLC-laitteen tyyppi, HPLC- ja suojakolonnit, detektori, automaattinen näytteensyötölaite

— HPLC-analyysin kannalta olennaiset parametrit, kuten kolonnin lämpötila, ruiskutusten tilavuudet, virtausnopeus ja gradientti.

Järjestelmän soveltuvuus

— peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa standardin ja A-vertailukontrollin kunkin toiston osalta

— lineaarinen kalibrointikäyrä graafisesti esitettynä ja raportoitu r^2

— A-vertailukontrollin kunkin toiston peptidipitoisuus

— kolmen vertailukontrollin (A, SD ja CV) keskimääräinen peptidipitoisuus (mM)

— A- ja C-vertailukontrollien peptidipitoisuus.

▼M7

Analyysisekvenssi

— Vertailukontrollien osalta:

  — B-ja C-vertailukontrollien kunkin toiston peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa

  — yhdeksän vertailukontrollin (B ja C asetonitriilissa, SD ja CV) keskimääräinen peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa (jotta voidaan määrittää vertailukontrollien stabiilisuus analyysiajan mittaan)

  — kunkin käyn liuottimen osalta kolmen sopivan C-vertailukontrollin keskimääräinen peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa (peptidin prosentuaalisen depleetioasteen laskentaa varten)

  — kunkin käytetyn liuottimen osalta kolmen sopivan C-vertailukontrollin peptidipitoisuus (mM)

  — kunkin käytetyn liuottimen osalta kolmen sopivan C-, SD- ja CV-vertailukontrollin keskimääräinen peptidipitoisuus.

— Positiivisen kontrollin osalta:

  — kunkin toiston osalta peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa

  — kunkin toiston osalta peptidin prosentuaalinen depleetioaste

  — kolmen toiston, SD:n ja CV:n osalta keskimääräinen peptidin depleetioaste

— Kunkin testikemikaalin osalta:

  — tieto sakasta reaktioseoksessa inkubaatioajan lopussa, jos sellaista havaitaan; Tieto mahdollisesta sakan uudelleen liuottamisesta tai sentrifugoinnista

  — tieto koeluution tapahtumisesta

  — tarvittaessa muiden mahdollisten olennaisten havaintojen kuvaus

  — kunkin toiston osalta peptidin piikin pinta-ala 220 nm:ssa

  — kunkin toiston osalta peptidin prosentuaalinen depleetioaste

  — kolmen toiston, SD:n ja CV:n osalta keskimääräinen peptidin prosentuaalinen depleetioaste

  — kysteiinin ja lysiinin keskimääräiset prosentuaaliset depleetioasteet

  — käytetty ennustemalli ja DPRA-ennuste.

Pätevyyden testaaminen

— Tarvittaessa menettely, jolla osoitetaan, että laboratorio on pätevä suorittamaan testimenetelmän (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaaminen), tai jolla osoitetaan testimenetelmän toistettavuus ajan mittaan.

Tulosten tarkastelu

— DPRA-testimenetelmällä saatujen tulosten tarkastelu

— testimenetelmän tulosten tarkastelu IATA:n valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

▼M7

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet Kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

(3) Tässä liitteessä oleva B.6 luku: Ihoherkistys.

(4) Tässä liitteessö oleva B.42 luku: Paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä.

(5) Tässä liitteessä oleva B.50 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: DA.

(6) Tässä liitteessä oleva B.51 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä BrdU-ELISA:

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85: 367–485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81: 332–343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97: 417–427.

(10) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489–504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27: 609–618.

(14) Ball *et al.* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60: 389–400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64: 625–639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74s. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17s. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22s. Saatavilla osoitteessa www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf – 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aine: Alkuaineet ja niiden yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, mukaan lukien tuotteen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimet, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta (1).

Haittavaikutusreitti (Adverse Outcome Pathway, AOP): Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (2).

Herkkyys: Testimenetelmällä oikein luokiteltujen positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (21).

Järjestelmän soveltuvuus: Välineen suorituskyvyn (esimerkiksi herkkyyden) määrittäminen referenssinormaalin analysoinnilla ennen analyysierän ajamista (22).

Kalibrointikäyrä: Kokeellisen vastearvon ja tunnetun aineen analyyttisen pitoisuuden välinen suhde (josta käytetään myös nimitystä *vakiokäyrä*).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine (UVCB): Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Käynnistävä molekyylitason tapahtuma: Kemikaalin aiheuttama, molekyylitasolla tapahtuva biologisen järjestelmän häiriö, joka on määritetty haittavaikutusreitin käynnistäväksi tapahtumaksi.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus (21).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (21).

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Seos: Seos tai liuos, joka muodostuu kahdesta tai useammasta aineesta ja jossa nämä aineet eivät reagoi (1).

Spesifisyys: Testimenetelmällä oikein luokiteltujen negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon testimenetelmän merkityksellisyyttä arvioitaessa (21).

▼M7

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (21).

Testikemikaali: Termillä ”testikemikaali” viitataan siihen, mitä testataan.

Useasta aineosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääaineosaa ja jonka aineosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta aineosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta aineosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta aineosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

Uusittavuus: Samalla kemikaalilla ja saman testiprotokollan mukaisesti tehdyillä testeillä saatujen tulosten keskinäinen vastaavuus (ks. luotettavuus) (21).

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testimenetelmää ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (21).

Variaatiokerroin: Variaation mittayksikkö, joka lasketaan toistoista saatujen tietojen pohjalta jakamalla normaalijakauma keskiarvolla. Variaatiokerroin voidaan ilmaista prosenttilukuna kertomalla se 100:lla.

Vertailukontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Yhdennetty lähestymistapa testaamiseen ja arviointiin (Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Yhdestä aineosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääaineosaa.

YK:n kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Järjestelmä, jossa kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

▼M7

Lisäys 2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

***In chemico* -ihoherkistys: DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)**

Ennen kuin laboratoriot ottavat tämän testimenetelmän rutiininomaiseen käyttöön, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä saamalla oikea, odotettava DPRA-ennuste 10:lle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle, joita suositellaan taulukossa 1, ja saamalla kysteiinin ja lysiinin depeetioarvot, jotka osuvat niille määritettyihin viiteväleihin, kahdeksalla aineella kymmenestä kunkin peptidin osalta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu niin, että ne edustavat erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaraan.. Valintakriteereihin kuului myös se, että niitä on kaupallisesti saatavana, että saatavana on laadukkaita *in vivo* -vertailutietoja ja laadukkaita DPRA:lla tuotettuja *in vitro* -tietoja ja että niitä käytettiin EURL ECVAMin koordinoimassa validointitutkimuksessa sen osoittamiseen, että testimenetelmän käyttöönotto onnistui tutkimukseen osallistuneissa laboratorioissa.

Taulukko 1

Suositellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet DPRA-kokeeseen liittyvän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -ennuste [1]	DPRA-ennuste [2]	Kysteiinipeptidin depleetioarvon (%) vaihteluväli [3]	Lysiinipeptidin depleetioarvon (%) vaihteluväli [3]
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Herkistävä (erittäin voimakas)	Positiivinen	90-100	15-45
Oksatsolooni	15646-46-5	Kiinteä	Herkistävä (erittäin voimakas)	Positiivinen	60-80	10-55
Formaldehydi	50-00-0	Nestemäinen	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	30-60	0-24
Bentsylideeniasetoni	122-57-6	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	80-100	0-7
Farnesaali	19317-11-4	Nestemäinen	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	15-55	0-25
2,3-butaanidioni;	431-03-8	Nestemäinen	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	60-100	10-45
1-butanoli	71-36-3	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	0-7	0-5,5
6-metyylikumariini	92-48-8	Kiinteä	Ei herkistävä	Negatiivinen	0-7	0-5,5
Maitohappo	50-21-5	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	0-7	0-5,5
4-metoksiasetofenoni	100-06-1	Kiinteä	Ei herkistävä	Negatiivinen	0-7	0-5,5

([1]) *In vivo* -riski ja (vaikutuskykyä koskevat) ennusteet perustuvat LLNA-tietoihin (19). *In vivo* -vaikutuskyvyn määrityksessä on käytetty ECETOCin esittämiä kriteereitä (23).
([2]) DPRA-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n ja kohtien 9 ja 11 määräysten valossa.
([3]) Vaihteluvälit on määritetty vähintään 10 depleetioarvon pohjalta; arvot ovat kuuden riippumattoman laboratorion tuottamia.

▼M7

Lisäys 3

ESIMERKKEJÄ ANALYYSISEKVENSSISTÄ

Kalibrointistandardit ja vertailukontrollit	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Laimennuspuskuri Vertailukontrolli A, rinnakkaisnäyte 1 Vertailukontrolli A, rinnakkaisnäyte 2 Vertailukontrolli A, rinnakkaisnäyte 3
Koeluutiokontrollit	Koeluutiokontrolli 1, testikemikaali 1 Koeluutiokontrolli 2, testikemikaali 2
Vertailukontrollit	Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 1 Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 2 Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 3
Ensimmäinen rinnakkaisnäytesarja	Vertailukontrolli C, rinnakkaisnäyte 1 Kanelialdehydi, rinnakkaisnäyte 1 Näyte 1, rinnakkaisnäyte 1 Näyte 2, rinnakkaisnäyte 1
Toinen rinnakkaisnäytesarja	Vertailukontrolli C, näyte 2 Kanelialdehydi, näyte 2 Näyte 1, rinnakkaisnäyte 2 Näyte 2, rinnakkaisnäyte 2
Kolmas rinnakkaisnäytesarja	Vertailukontrolli C, rinnakkaisnäyte 3 Kanelialdehydi, näyte 3 Näyte 1, rinnakkaisnäyte 3 Näyte 2, rinnakkaisnäyte 3
Vertailukontrollit	Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 4 Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 5 Vertailukontrolli B, rinnakkaisnäyte 6

Analyysisekvenssin pitäisi sisältää kolme vertailukontrollisarjaa (eli näytteitä, jotka muodostuvat vain sopivaan liuottimeen liuotetusta peptidistä).
Vertailukontrollia A käytetään HPLC-järjestelmän soveltuvuuden varmistamiseen.
Vertailukontrollia B käytetään analyysisekvenssin alussa ja lopussa sen varmistamiseen, että vertailukontrollit säilyvät stabiileina analyysin ajan.
Vertailukontrollia C käytetään analyysisekvenssissä sen varmistamiseen, että testikemikaalin liuottamiseen käytetty liuotin ei vaikuta peptidin prosentuaaliseen depleetioarvoon.

▼M7

B.60. *IN VITRO* -IHOHERKISTYS: ARE-NRF2-LUSIFERAASI-TESTIMENETELMÄ

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 442D (2015). Ihoa herkistävällä aiheella tarkoitetaan Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) määritelmän mukaisesti ainetta, joka aiheuttaa ihokosketuksen seurauksena allergisen reaktion. ([1]) Tämä testimenetelmä on *in vitro* -menetelmä (ARE-Nrf2-lusiferaasikoe), joka auttaa erottamaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista YK:n GHS-järjestelmän (1) sekä CLP-asetuksen mukaisesti.

Ihon herkistymisen taustalla vaikuttavista keskeisistä biologisista tapahtumista vallitsee yleinen yhteisymmärrys. Olemassa olevat tiedot ihon herkistymiseen liittyvistä kemiallisista ja biologisista mekanismeista on esitetty tiivistetysti haittavaikutusreitin (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) muodossa herkistymisen käynnistävästä molekyylitason tapahtumasta välivaiheiden kautta aina haittavaikutukseen eli ihmisen allergiseen kosketusihottumaan tai jyrsijän kosketusallergiaan (2) (3). Herkistymisen käynnistävä molekyylitason tapahtuma on se, että elektrofiiliset aineet muodostavat kovalenttisidoksen ihon proteiinien nukleofiilisiin keskuksiin. Toinen keskeinen tapahtuma tässä ihon herkistymisen haittavaikutusreitissä tapahtuu keratinosyyteissä; se käsittää tulehdusvasteita ja geeniekspression, joka liittyy tiettyihin solujen viestinvälitysreitteihin, kuten antioksidatiivisista/elektrofiilisista vaste-elementeistä (ARE) riippuviin reitteihin. Kolmas keskeinen tapahtuma on dendriittisolujen aktivoituminen, jota arvioidaan yleensä tiettyjen solujen pintamarkkerien, kemokiinien ja sytokiininen, ilmenemisen perusteella. Neljäs keskeinen tapahtuma on T-solujen proliferaatio, jota arvioidaan välillisesti hiirille tehdyllä LLNA-kokeella (Local Lymph Node Assay) (4).

Ihon herkistymisen arvioinnissa on käytetty yleensä koe-eläimiä. Marsujen käyttöön perustuvilla klassisilla menetelmillä – Magnusson–Kligmanin GMPT-testillä (Guinea Pig Maximisation Test) ja Buehlerin testillä (TM B.6 (5)) – tutkitaan ihon herkistymisen induktio- ja haastevaihetta. Myös hiirillä tehty LLNA-koe (Local Lymph Node Assay) (TM B.42 (4)) ja sen kaksi ei-radioaktiivista muunnosta (LLNA: DA (TM B.50 (6)) ja LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), joilla kaikilla arvioidaan vain induktiovastetta, ovat saaneet hyväksyntää, sillä marsukokeisiin verrattuna niillä on eläinten hyvinvointiin liittyviä hyötyjä ja niillä mitataan objektiivisesti ihon herkistymisen induktiovaihetta.

Viime aikoina mekanistispohjaiset *in chemico*- ja *in vitro* -testausmenetelmät on katsottu tieteellisesti valideiksi menetelmiksi kemikaalien ihoherkistysvaaran arviointiin. Jotta käytössä olevat eläinkokeet voidaan korvata täysin, testausta ja arviointia koskeviin yhdennettyihin lähestymistapoihin (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) tarvitaan kuitenkin eläinkokeettomien menetelmien (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) yhdistelmiä, sillä kullakin nykyisin käytettävissä olevalla eläinkokeettomalla testimenetelmällä voidaan kattaa haittavaikutusreitti mekanistisesti vain rajallisesti (2) (3).

Tällä testimenetelmällä (ARE-Nrf2-lusiferaasikokeella) on tarkoitus tutkia toista keskeistä tapahtumaa, joka kuvataan kohdassa 2. Ihoa herkistävien aineiden on raportoitu indusoivan geenejä, joita antioksidatiiviset vaste-elementit (ARE) säätelevät (8) (9). Pienikokoiset elektrofiiliset aineet, kuten ihoa herkistävät aineet,

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

voivat vaikuttaa Keap1-sensoriproteiiniin (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), esimerkiksi kysteiinijäämän kovalenttimuutoksen kautta, minkä seurauksena se irtautuu transkriptiotekijästä Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*). Irtautunut Nrf2 voi sitten aktivoida ARE-riippuvaisia geenejä, kuten vaiheen II detoksifioivia entsyymejä koodaavia geenejä (8) (10) (11).

Tällä hetkellä ainoa tämän testimenetelmän kattama *in vitro* -ARE-Nrf2-lusiferaasikoe on KeratinoSens™-koe, josta on tehty validointitutkimukset (9) (12) (13), minkä jälkeen Euroopan unionin vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien vertailulaboratorio (EURL ECVAM) on tehnyt riippumattoman vertaisarvioinnin (14). KeratinoSens™-kokeen katsottiin olevan tieteellisesti kelvollinen käytettäväksi osana testausta ja arviointia koskevaa yhtenäistä lähestymistapaa ihoa herkistävien aineiden erottamiseen herkistystä aiheuttamattomista aineista vaaran luokittelua varten ja merkintätarkoituksiin (14). Laboratoriot, jotka haluavat ottaa testimenetelmän käyttöön, voivat saada KeratinoSens™-kokeessa käytetyn rekombinanttisolulinjan tekemällä lisenssisopimuksen testimenetelmän kehittäjän kanssa (15).

Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT, KÄYTETTÄVYYS JA RAJOITUKSET

Koska Keap1-Nrf2-ARE-reitin aktivoituminen liittyy ainoastaan ihon herkistymisen haittavaikutusreitin toiseen keskeiseen tapahtumaan, tällä testimenetelmällä saadut tiedot, jotka perustuvat tämän reitin aktivoitumiseen, eivät todennäköisesti itsessään riitä kemikaalien ihoherkistyspotentiaalia koskevien päätelmien tekemiseen. Siksi tällä testimenetelmällä tuotettuja tietoja pitäisi tarkastella osana kokonaisvaltaista lähestymistapaa (esimerkiksi IATA) yhdistämällä ne muihin, täydentäviin tietoihin, kuten tietoihin, jotka on saatu *in vitro* -kokeilla, joissa tutkitaan ihon herkistymisen haittavaikutusreitin muita keskeisiä tapahtumia, sekä testittömillä menetelmillä, joihin kuuluu muun muassa interpolointi (read-across) samankaltaisista kemikaaleista. Esimerkkejä siitä, miten ARE-Nrf2-lusiferaasi-testimenetelmää voidaan käyttää yhdessä muiden tietojen kanssa, annetaan alan kirjallisuudessa (13) (16) (17) (18) (19).

Tätä testimenetelmää voidaan käyttää apuna ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamiseen herkistystä aiheuttamattomista aineista osana IATA:ta. Tätä testimenetelmää ei voida käyttää yksinään ihoa herkistävien aineiden luokittelemiseen YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisiin alaluokkiin 1A ja 1B eikä niiden vaikutuksen ennustamiseen turvallisuuden arviointiin liittyvää päätöksentekoa varten. Sääntelykehyksestä riippuen positiivista tulosta voidaan kuitenkin sellaisenaan käyttää kemikaalin luokitteluun YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1.

Validointitutkimuksesta ja omista testeistä (in-house testing) saatujen, testimenetelmän riippumattomaan vertaisarviointiin käytettyjen tietojen perusteella KeratinoSens-kokeen on osoitettu olevan siirrettävissä laboratorioihin, joilla on kokemusta soluviljelystä. Testimenetelmällä odotettavien ennusteiden toistettavuus on 85 prosentin luokkaa laboratorioissa ja niiden välillä (14). KeratinoSens™-kokeen tarkkuus (77 prosenttia – 155/201), herkkyys (78 prosenttia – 71/91) ja spesifisyys (76 prosenttia – 84/110) ihoa herkistävien aineiden (eli YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista LLNA-tuloksiin verrattuna laskettiin ottamalla huomioon kaikki EURL ECVAMille tämän testimenetelmän arviointia ja vertaisarviointia varten toimitetut tiedot (14). Nämä luvut ovat samankaltaisia kuin hiljattain julkaistut luvut, jotka perustuvat noin 145 aineen in-house-testaukseen (tarkkuus 77 prosenttia, sensitiivisyys 79 prosenttia ja spesifisyys 72 prosenttia) (13). KeratinoSens™-koe todennäköisesti aliennustaa sitä, että kemikaaleilla on matalasta kohtalainen ihoherkistyspotentiaali (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B) kuin että kemikaaleilla olisi suuri ihoherkistyspotentiaali (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (13) (14). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että

▼M7

KeratinoSens™-koe auttaa hyödyllisellä tavalla tunnistamaan ihon herkistämisvaaran. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat KeratinoSens™-kokeen käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testimenetelmää pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATA:n valossa ja edellä olevan kohdan 9 mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-koe ja muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta kiinnostuksen kohteena olevan lajin eli ihmisen tapauksessa.

Tässä testimenetelmässä käytetään termiä ”testikemikaali”, jolla tarkoitetaan sitä, mitä testataan, eikä termi liity siihen, voidaanko ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmää käyttää aineiden ja/tai seosten testaamiseen. Nykyisten saatavilla olevien tietojen perusteella on osoitettu, että testikemikaalit, joihin KeratinoSens™-koetta voidaan käyttää, kattavat monenlaisia orgaanisia funktionaalisia ryhmiä ja reaktiomekanismeja ja vaihtelevat ihon herkistämispotentiaalin (siten kuin se määritetään *in vivo* -tutkimuksissa) ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksiensa osalta (9) (12) (13) (14). Testatut aineet olivat pääasiassa yhdestä aineosasta muodostuvia aineita, vaikka olemassa onkin myös rajallinen määrä tietoa seosten testaamisesta (20). Testimenetelmää voidaan kuitenkin käyttää teknisesti monesta aineosasta muodostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seokseen tulosten tuottamiseksi haluttua sääntelyyn perustuvaa tarkoitusta varten, olisi kuitenkin pohdittava sitä, antaako se riittävät tulokset kyseiseen tarkoitukseen, ja jos antaa, niin miksi. Tällaisia pohdintoja ei tarvita, kun sääntely edellyttää kyseisen seoksen testaamista. Lisäksi monesta aineosasta muodostuvia aineita tai seoksia testattaessa pitäisi ottaa huomioon sytotoksisten aineosien mahdollinen häiritsevä vaikutus havaittuihin vasteisiin. Testimenetelmää voidaan soveltaa testikemikaaleihin, jotka liukenevat tai muodostavat stabiilin dispersion (eli kolloidin tai suspension, jossa testikemikaali ei sakkaudu tai erotu faaseiksi liuottimesta) joko vedessä tai dimetyylisulfoksidissa (mukaan lukien testikemikaalin kaikki aineosat testattaessa monesta aineosasta muodostuvaa ainetta tai seosta). Jos testikemikaalit eivät täytä näitä ehtoja suurimpana vaadittuna lopullisena pitoisuutena, joka on 2 000 μM (ks. 22 kohta), niitä voidaan silti testata alhaisempina pitoisuuksina. Tällöin kohdassa 39 positiiviselle tulokselle asetetut perusteet täyttävien tulosten perusteella testikemikaali voidaan edelleen määrittää ihoa herkistäväksi aineeksi, kun taas alle 1 000 μM:n pitoisuudella saadusta negatiivisesta tuloksesta ei voida tehdä varmoja päätelmiä (ks. ennustemalli kohdasta 39). Yleisesti aineita, joiden LogP on enintään 5, on testattu onnistuneesti, kun taas testimenetelmää ei tiettävästi voida käyttää sellaisten äärimmäisten hydrofobisten aineiden kanssa, joiden LogP on yli 7 (14). Aineista, joiden LogP on 5–7, on saatavana tietoa vain rajallisesti.

Negatiivisia tuloksia pitäisi tulkita varoen, sillä testimenetelmä voi antaa negatiivisen tuloksen aineista, jotka reagoivat ainoastaan lysiinijäämiin. Lisäksi käytetyn solulinjan rajallisen metabolointikyvyn (21) ja koeolosuhteiden vuoksi myös prohapteenit (eli kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia esimerkiksi P450-entsyymien kautta) ja prehapteenit (eli kemikaalit, jotka itsehapetus aktivoi) voivat antaa negatiivisia tuloksia varsinkin hapettumisvauhdin ollessa hidas. Toisaalta testikemikaalit, jotka eivät aiheuta herkistystä mutta ovat kuitenkin kemikaalisia stressitekijöitä, voivat aiheuttaa virheellisiä positiivisia tuloksia (14). Lisäksi erittäin sytotoksisia testikemikaaleja ei voida aina arvioida luotettavasti. Myös lusiferaasientsyymiin häiritsevästi vaikuttavat testikemikaalit voivat sekoittaa lusiferaasin toimintaa solupohjaisissa kokeissa ja aiheuttaa joko ilmeistä inhibitiota tai lisätä luminesenssia (22). Esimerkiksi fytoestrogeenipitoisuuksien,

▼M7

jotka ovat suurempia kuin 1 μM, on raportoitu vaikuttavan häiritsevästi luminesenssisignaaleihin muissa lusiferaasipohjaisissa reportterigeenikokeissa, mikä johtuu lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta (23). Tämän seurauksena lusiferaasiekspressiota, joka on saatu suurilla pitoisuuksilla fytoestrogeeneja tai vastaavia kemikaaleja, joiden epäillään aiheuttavan fytoestrogeenin tavoin lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumista, on tutkittava huolella (23). Jos voidaan osoittaa, ettei testimenetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin.

Sen lisäksi, että KeratinoSens™-koe auttaa erottamaan ihoa herkistävät aineet herkistystä aiheuttamattomista aineista, se antaa myös pitoisuus-vastetietoja, jotka voivat mahdollisesti auttaa arvioimaan herkistyspotentiaalia, kun menetelmää käytetään osana kokonaisvaltaisia lähestymistapoja, kuten IATA:ta (19). Sen määrittäminen, miten KeratinoSens™-kokeen tulokset voivat auttaa arvioimaan herkistyspotentiaalia (24) ja luokittelemaan herkistäviä aineita YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti, edellyttää kuitenkin lisää työtä, jonka pitäisi mieluiten perustua luotettaviin ihmisistä saatuihin tietoihin.

TESTIN PERIAATE

ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmässä käytetään immortalisoitua adherenttia solulinjaa, joka on saatu ihmisen HaCaT-keratinosyyteistä, jotka on stabiilisti transfektoitu selektoitavalla plasmidilla. Solulinja sisältää lusiferaasigeenin, joka on kosketuksen kautta herkistävien aineiden säätelemäksi tiedetystä geenistä peräisin olevaan ARE-elementtiin yhdistetyn konstitutiivisen promoottorin transkriptionaalisessa kontrollissa (25) (26). Lusiferaasisignaali heijastaa endogeenisten Nrf2-riippuvaisten geenien aktivoitumista herkistävien aineiden vaikutuksesta, ja lusiferaasisignaalin on osoitettu riippuvan Nrf2:sta rekombinatissa solulinjassa (27). Tämä tarjoaa mahdollisuuden mitata lusiferaasigeenin induktiota kvantitatiivisesti (havaitsemalla luminesenssi) käyttämällä vakiintuneita valoa tuottavia lusiferaasisubstraatteja merkkinä Nrf2-transkriptiotekijän aktiivisuudesta soluissa sen jälkeen, kun ne on altistettu elektrofiilisille aineille.

KeratinoSens™-kokeessa testikemikaalit katsotaan positiivisiksi, jos ne indusoivat tilastollisesti merkitsevän, tietyn rajan ylittävän lusiferaasiaktiivisuuden (yli 1,5-kertainen eli 50 prosentin kasvu) tietyn rajan alittavalla pitoisuutella, joka ei merkitsevästi vaikuta solujen elinkykyyn (alle 1 000 μM ja pitoisuus, jolla solujen elinkyky on yli 70 prosenttia (9) (12)). Tätä varten lusiferaasiaktiivisuuden induktiolle määritetään enimmäiskerroin suhteessa (negatiiviseen) liuotinkontrolliin (I_{max}). Lisäksi koska solut altistetaan joukolle testikemikaaleja eri pitoisuuksina, vaste-annoskäyrästä pitäisi interpoloida pitoisuus, joka tarvitaan tilastollisesti merkitsevään rajan ylittävään lusiferaasiaktiivisuuden induktioon ($EC_{1,5}$-arvo) (ks. ohjeet laskelmiin kohdasta 32). Lopuksi pitäisi tehdä rinnakkaisia sytotoksisuusmittauksia, jotta voidaan arvioida, ilmeneekö lusiferaasiaktiivisuuden indusoivia tasoja sytotoksisuutta pienemmillä pitoisuuksilla.

Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tähän testimenetelmään liittyvää ARE-Nrf2-lusiferaasikoetta rutiininomaisesti, niiden pitäisi osoittaa tekninen pätevyytensä lisäyksessä 2 lueteltujen kymmenen aineen avulla.

Saatavana on suoritusarvostandardeja (PS) (28), jotka helpottavat KeratinoSens™-kokeen kaltaisten uusien tai muunnettujen *in vitro* -ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmien validointia ja mahdollistavat tämän menetelmän oikea-aikaisen muokkaamisen niin, että ne voidaan sisällyttää siihen. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (*Mutual Acceptance of Data*, MAD) taataan ainoastaan PS:n mukaisesti validoitujen testimenetelmien osalta, jos OECD on tarkistanut ja sisällyttänyt ne vastaavaan testausohjeeseen.

▼M7

MENETTELY

Tällä hetkellä ainoa menetelmä, jonka tämä testimenetelmä kattaa, on tieteellisesti validoitu KeratinoSens™-koe (9) (12) (13) (14). KeratinoSens™-kokeen vakiomenettely (*Standard Operating Procedures*, SOP) on saatavana, ja sitä pitäisi käyttää, kun laboratorio ottaa testimenetelmän käyttöön ja käyttää sitä (15). Laboratoriot, jotka haluavat ottaa testimenetelmän käyttöön, voivat saada KeratinoSens™-kokeessa käytetyn rekombinanttisolulinjan tekemällä lisenssisopimuksen testimenetelmän kehittäjän kanssa. Seuraavissa kappaleissa kuvaillaan ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmän tärkeimmät osat ja menettelyt.

Keratinosyyttiviljelmien valmistelu

Viljelmien valmistelussa pitäisi käyttää transgeenistä solulinjaa, johon on insertoitu vakaasti ARE-elementin säätelemä lusiferaasireportterigeeni (esimerkiksi KeratinoSens™-solulinjaa). Vastaanoton jälkeen soluja propagoidaan (esimerkiksi 2–4 jatkoviljelyä) ja säilytetään pakastettuina homogeenisena kantana. Tästä alkuperäisestä kannasta peräisin olevia soluja voidaan propagoida jatkoviljelyjen enimmäismäärään saakka (joka on KeratinoSensin™ tapauksessa 25), ja niitä käytetään rutiininomaiseen testaamiseen käyttämällä asianmukaista elatusainetta (KeratinoSensin™ tapauksessa kyseeseen tulevat DMEM:ää sisältävä seerumi ja Geneticin).

Testissä käytettävien solujen pitäisi olla 80–90-prosenttisen konfluentteja, ja on varmistettava, ettei solujen anneta koskaan kasvaa täysin konfluenteiksi. Päivä ennen testaamista solut kerätään ja jaetaan 96 kuopan levyihin (KeratinoSensin™ tapauksessa 10 000 solua/kuoppa). Jotta solut jakautuisivat kuoppalevylle määrältään tasaisesti, on pyrittävä välttämään solujen sedimentaatiota siirrostuksen aikana. Ellei näin tehdä, erot kuoppien välillä voivat olla suuret. Kussakin toistossa käytetään kolmea rinnakkaisnäytettä lusiferaasiaktiviteetin mittaamiseen ja yhtä rinnakkaista rinnakkaisnäytettä solujen elinkyvyn testaamiseen.

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

Testikemikaali ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. KeratinoSens™-kokeessa käytettävät testikemikaalit liuotetaan dimetyylisulfoksidiin (DMSO) halutun lopullisen pitoisuuden saavuttamiseksi (esimerkiksi 200 mM). Dimetyylisulfoksidiliuoksia voidaan pitää itsesteriloivina, joten steriilisuodatusta ei tarvita. Testikemikaali, joka ei liukene dimetyylisulfoksidiin, liuotetaan steriliin veteen tai viljelyalustaan ja liuokset steriloidaan esimerkiksi suodattamalla. Ellei testikemikaalille ole määritetty molekyylimassaa (MW), KeratinoSens™-kokeessa valmistetaan oletuspitoisuuden mukainen kantaliuos (40 mg/mL eli 4 painoprosenttia tilavuudesta). Muiden liuottimien kuin dimetyylisulfoksidin, veden tai viljelyalustan käytölle on esitettävä riittävät tieteelliset perustelut.

Dimetyylisulfoksidiin liuotetusta testikemikaalista valmistettujen kantaliuosten pohjalta valmistetaan sarja laimennoksia käyttämällä dimetyylisulfoksidia, niin että testattavasta kemikaalista saadaan 12 master-pitoisuutta (jotka ovat KeratinoSens™-kokeessa 0,098–200 mM). Ellei testikemikaali liukene dimetyylisulfoksidiin, master-pitoisuuksien saamiseksi tehtäviin laimennoksiin käytetään steriiliä vettä tai steriiliä viljelyalustaa. Käytetystä liuottimesta riippumatta master-pitoisuudet laimennetaan sitten edelleen 25-kertaisesti seerumia sisältävällä viljelyalustalla, ja lopuksi niitä laimennetaan edelleen 4-kertaisesti, jolloin testatun kemikaalin lopulliset pitoisuudet ovat 0,98–2000 μ–M KeratinoSens™-kokeessa. Muita pitoisuuksia voidaan käyttää, jos se on perusteltua (esimerkiksi sytotoksisuuden tai heikon liukenevuuden vuoksi).

KeratinoSens™-kokeessa käytettävä negatiivinen kontrolli (liuotinkontrolli) on dimetyylisulfoksidi (CAS-nro 67-68-5, puhtaus ≥ 99 prosenttia), jota käytetään kuudessa kuopassa kullakin kuoppalevyllä. Sille tehdään kohdassa 22 kuvattu sama laimennus kuin master-pitoisuuksille, minkä seurauksena negatiivisen kontrollin (liuotinkontrollin) lopullinen pitoisuus on 1 prosentti; tämä pitoisuus ei

▼M7

vaikuta solujen elinkykyyn, ja se vastaa testatun kemikaalin ja positiivisen kontrollin dimetyylisulfoksidipitoisuutta. Ellei testikemikaali liukene dimetyylisulfoksidiin, vaan laimennuksessa on käytettävä vettä, lopullisen testiliuoksen dimetyylisulfoksidipitoisuutta on kaikissa kuopissa säädettävä 1 prosenttiin, niin kuin myös muiden testikemikaalien ja kontrolliaineiden kanssa tehdään.

KeratinoSens™-kokeessa käytettävä positiivinen kontrolli on kanelialdehydi (CAS-nro 14371-10-9, puhtaus ≥ 98 prosenttia), josta valmistetaan dimetyylisulfoksidiin (6,4 mM:n kantaliuos) viiden master-pitoisuuden sarja, joiden pitoisuudet ovat 0,4–6,4 mM ja jotka kohdassa 22 kuvataan master-pitoisuuksien osalta kuvatulla tavalla, niin että positiivisen kontrollin lopullinen pitoisuus on 4–64 μM. Myös muita sopivia positiivisia kontrolleja, joiden tuottamat $EC_{1,5}$-arvot ovat mieluiten keskitasoa, voidaan käyttää, jos saatavana on historiallisia tietoja, joista voidaan johtaa vastaavat ajon hyväksyntäperusteet.

Testikemikaalin ja kontrolliaineiden annostelu

Kutakin testikemikaalia ja positiivista kontrolliainetta kohden tarvitaan (positiivisen tai negatiivisen) ennusteen saamiseksi yksi koe; se muodostuu vähintään kahdesta riippumattomasta toistosta, joista kukin käsittää kolme rinnakkaisnäytettä (eli n = 6). Jos kahden riippumattoman toiston tulokset ovat keskenään ristiriidassa, on tehtävä kolmas toisto, joka käsittää kolme rinnakkaisnäytettä (eli n = 9). Kukin riippumaton toisto tehdään eri päivinä käyttämällä testikemikaalien tuoretta kantaliuosta ja erikseen kerättyjä soluja. Solut voivat kuitenkin olla peräisin samasta jatkoviljelystä.

Kohdassa 20 kuvatun siirrostuksen jälkeen soluja viljellään 24 tuntia 96-kuoppaisissa kuoppalevyissä. Tämän jälkeen viljelyaine poistetaan ja korvataan tuoreella viljelyaineella (KeratinoSensin™ tapauksessa 150 μl:n viljelyaine, joka sisältää seerumia, mutta ei Geneticinia), johon lisätään 50 μl 25-kertaisesti laimennettua testikemikaalia ja kontrolliaineita. Jokaisesta levystä pitäisi jättää tyhjäksi ainakin yksi kuoppa (ei soluja eikä käsittelyä) tausta-arvojen arviointia varten.

Käsiteltyjä levyjä inkuboidaan sitten noin 48 tuntia 37 ± 1 °C:ssa, niin että CO_2 -pitoisuus on 5 prosenttia, KeratinoSens™-kokeessa. Haihtuvien testikemikaalien höyrystymistä ja testikemikaalien aiheuttamaa kuoppien välistä ristikontaminaatiota on vältettävä esimerkiksi peittämällä levyt kelmulla ennen inkubointia testikemikaalien kanssa.

Lusiferaasiaktiivisuuden mittaukset

Asianmukaisten luminesenssilukemien saamiseen vaikuttavat keskeisesti kolme asiaa:

— herkän luminometrin valinta

— valoristikontaminaation välttämiseksi riittävän korkean levymallin valinta

— riittävästi valoa tuottavan lusiferaasisubstraatin käyttö riittävän herkkyyden ja vähäisen vaihtelevuuden varmistamiseksi.

Ennen testaamista on varmistettava näiden kolmen kohdan täyttyminen tekemällä lisäyksessä 3 kuvatut kontrollikoejärjestelyt.

Kun soluja on altistettu KeratinoSens™-kokeessa 48 tuntia testikemikaalille ja kontrolliaineille, ne pestään fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, ja kuhunkin kuoppaan lisätään luminesenssilukemia varten asianmukaista lyysispuskuria 20 minuutiksi huoneenlämpötilassa.

▼M7

Tämän jälkeen levyt, joissa on solulysaattia, asetetaan luminometriin KeratinoSens™-koetta varten ohjelmoitujen lukemien ottamista varten: (i) kuhunkin kuoppaan lisätään lusiferaasisubstraattia (eli 50 µl), (ii) odotetaan yksi sekunti ja (iii) mitataan lusiferaasiaktiivisuutta kahden sekunnin ajan. Jos esimerkiksi käytetyn luminometrin mallin vuoksi käytetään muita asetuksia, ne on perusteltava. Lisäksi voidaan käyttää hohtosubstraattia, jos lisäyksen 3 mukainen laadunvalvontakoe on tehty onnistuneesti.

Sytotoksisuuden arviointi

Solujen elinkykyisyyttä testaavaa KeratinoSens™ -koetta varten viljelyaine korvataan 48 tunnin altistusajan jälkeen tuoreella viljelyaineella, joka sisältää MTT:tä (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi; tiatsolyylisininen tetrasoliumbromidi; CAS-nro 298-93-1) ja soluja inkuboidaan 4 tuntia 37 °C:ssa, niin että ympäristön CO_2-pitoisuus on 5 prosenttia. Sitten MTT:tä sisältävä viljelyaine poistetaan ja solujen annetaan lysoitua yön yli (esimerkiksi lisäämällä 10-prosenttista SDS-liuosta kuhunkin kuoppaan). Ravistuksen jälkeen mitataan absorptio 600 nm:ssa fotometrilla.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

KeratinoSens™-kokeessa lasketaan seuraavat parametrit:

— testatun kemikaalin ja positiivisen kontrollin millä tahansa pitoisuudella havaitun lusiferaasiaktiivisuuden suurin keskimääräinen induktiokerroin (I_{max});

— $EC_{1,5}$-arvo, joka edustaa pitoisuutta, jolla saatiin aikaan se, että lusiferaasiaktiivisuuden induktio ylittää kynnyksen vähintään 1,5-kertaisesti (eli lusiferaasiaktiivisuuden 50-prosenttinen kasvu); ja

— solujen elinkyvyn 50 prosentin ja 30 prosentin heikkenemisen IC_{50}- ja IC_{30}-pitoisuusarvot.

— lusiferaasiaktiivisuuden induktiokerroin lasketaan yhtälöllä 1, ja yleinen suurin induktiokerroin (I_{max}) on yksittäisten toistojen keskiarvo.

Yhtälö 1:

$$Induktiokerroin = \frac{(L_{näyte} - L_{nolla})}{(L_{liuotin} - L_{nolla})}$$

jossa

$L_{näyte}$ on testikemikaalikuopan luminesenssilukema

L_{nolla} on luminesenssilukema tyhjässä kuopassa, jossa ei ole soluja ja jota ei käsitellä

$L_{liuotin}$ on keskimääräinen luminesenssilukema kuopissa, joissa on soluja ja liuotinkontrollia (negatiivinen kontrolli)

$EC_{1,5}$ lasketaan yhtälöllä 2 käyttämällä lineaarista interpolointia, ja yleinen $EC_{1,5}$ on yksittäisten toistojen geometrinen keskiarvo.

Yhtälö 2:

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

jossa

C_a on alhaisin pitoisuus (μM), jolla induktio on vähintään 1,5-kertainen

C_b on korkein pitoisuus (μM), jolla induktio on alle 1,5-kertainen

I_a on induktiokerroin mitattuna alhaisimmasta pitoisuudesta, jolla induktio on vähintään 1,5-kertainen (kolmesta kuopasta otettujen rinnakkaisnäytteiden keskiarvo)

I_b on induktiokerroin mitattuna korkeimmasta pitoisuudesta, jolla induktio on enintään 1,5-kertainen (kolmesta kuopasta otettujen rinnakkaisnäytteiden keskiarvo)

Elinkyky lasketaan yhtälöllä 3:

Yhtälö 3:

$$Elinkyky = \frac{(V_{näyte} - V_{nolla})}{V_{liuotin} - V_{nolla}} \times 100$$

jossa

$V_{näyte}$ on testikemikaalikuopan MTT-absorptiolukema

V_{nolla} on MTT-absorptiolukema nollakuopasta, joka ei sisällä soluja eikä käsittelyä

$V_{liuotin}$ on keskimääräinen MTT-absorptiolukema kuopista, joissa on soluja ja liuotinkontrollia (negatiivinen kontrolli)

IC_{50} ja IC_{30} lasketaan yhtälöllä 4 käyttämällä lineaarista interpolointia, ja yleiset IC_{50} ja IC_{30} ovat yksittäisten toistojen geometrisiä keskiarvoja.

Yhtälö 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha}\right) + C_\alpha$$

jossa

X on laskettava pitoisuuden prosentuaalinen alenema (50 ja 30 IC_{50}:n ja IC_{30}:n osalta)

C_a on pienin pitoisuus (μM), jolla elinkyvyn alenema on vähintään x prosenttia

C_b on suurin pitoisuus (μM), jolla elinkyvyn alenema on enintään x prosenttia

V_a on prosentuaalinen elinkykyisyys pienimmällä pitoisuudella, jolla elinkyvyn alenema on vähintään x prosenttia

V_b on prosentuaalinen elinkykyisyys suurimmalla pitoisuudella, jolla elinkyvyn alenema on enintään x prosenttia

Jokaisen pitoisuuden osalta, jolla lusiferaasiaktiivisuuden induktio on yli 1,5-kertainen, lasketaan tilastollinen merkitsevyys (esimerkiksi kaksisuuntaisella Studentin t-testillä), vertaamalla kolmen rinnakkaisnäytteen luminesenssiarvoja liuotinkontrollia (negatiivinen kontrolli) sisältävien kuoppien luminesenssiarvoihin, jotta voidaan määrittää, onko luminesenssiaktiivisuuden induktio tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,05$). Pienin pitoisuus, jolla lusiferaasiaktiivisuuden induktiokerroin on vähintään 1,5, ratkaisee $EC_{1,5}$-arvon. Kussakin tapauksessa tarkastetaan, onko tämä arvo pienempi kuin IC_{30}-arvo, mikä viittaa siihen, että solujen elinkyky on vähentynyt alle 30 prosenttia $EC_{1,5}$-arvon määrittävällä pitoisuudella.

▼M7

Suosituksena on, että tiedot tarkastetaan visuaalisesti graafien avulla. Jos selvää annos-vastekäyrää ei havaita tai jos saatu annos-vastekäyrä on bifaasinen (eli 1,5:n raja ylittyy kahdesti), koe pitäisi toistaa, jotta voidaan varmistaa, johtuuko tämä testikemikaalista vai kokeeseen liittyvästä artefaktista. Jos bifaasinen vaste kyetään toistamaan riippumattomassa kokeessa, on ilmoitettava alhaisempi $EC_{1,5}$-arvo (pitoisuus, jolla 1,5:n raja ylittyy ensimmäistä kertaa).

Niissä harvinaisissa tapauksissa, joissa havaitaan tilastollisesti ei-merkitsevä yli 1,5-kertainen induktio, minkä jälkeen suurempi pitoisuus aiheuttaa tilastollisesti merkitsevän induktion, tämän toiston tuloksia pidetään yhtä valideina ja positiivisina kuin jos 1,5:n rajan ylittävä tilastollisesti merkitsevä induktio olisi saatu ei-sytotoksisella pitoisuudella.

Kun testikemikaalilla saadaan aikaan 1,5-kertainen tai suurempi induktio jo alhaisimmalla testipitoisuudella (0,98 μM), $EC_{1,5}$-arvoksi määritetään alle 0,98 annos-vastekäyrän visuaalisen tarkastuksen perusteella.

Hyväksyntäperusteet

Seuraavien hyväksyntäperusteiden pitäisi täyttyä KeratinoSens™-koetta käytettäessä. Ensinnäkin positiivisella kontrollilla, kanelialdehydillä, saadun lusiferaasiaktiivisuuden induktion pitäisi olla tilastollisesti merkitsevä 1,5:n rajan yläpuolella (esimerkiksi T-testiä käytettäessä) ainakin yhdellä testatulla pitoisuudella (4–64 μM).

Toiseksi $EC_{1,5}$-arvon pitäisi olla testauslaitoksen säännöllisesti päivitettävän historiallisen keskiarvon kahden keskihajonnan välissä (esimerkiksi 7–30 μM validointitietojen perusteella). Lisäksi kanelialdehydin osalta kolmen rinnakkaisnäytteen keskimääräisen induktion pitäisi olla 64 μM:ssä 2–8. Ellei jälkimmäinen peruste täyty, kanelialdehydin annos-vastesuhde pitäisi tarkistaa huolella ja testit voidaan hyväksyä vain, jos on annos-vastesuhde on selvä, niin että lusiferaasiaktiivisuuden induktio kasvaa positiivisen kontrollin pitoisuuksien kasvaessa.

Lisäksi negatiivisen kontrollin (liuotinkontrollin) eli dimetyylisulfoksidin luminesenssilukeman keskimääräisen variaatiokertoimen pitäisi olla alle 20 prosenttia jokaisessa toistossa, joka käsittää kuusi kuoppaa, joista kukin testataan kolmesti. Jos vaihtelevuus on suurempi, tulokset on hylättävä.

Tulosten tulkinta ja ennustettavuusmalli

KeratinoSens™-ennuste katsotaan positiiviseksi, jos kaikki neljä seuraavaa ehtoa täyttyvät kahdessa toistossa kahdesta tai samoissa kahdessa toistossa kolmesta; muutoin KeratinoSens™-ennuste katsotaan negatiiviseksi (kuva 1):

1. I_{max} on yli (>) 1,5-kertainen ja poikkeaa tilastollisesti merkitsevästi liuotinkontrollista (negatiivinen kontrolli) (siten kuin määritetty kaksisuuntaisessa parittomassa Studentin t-testissä)

2. solujen elinkykyisyys on yli (>) 70 prosenttia pienimmällä pitoisuudella, jolla lusiferaasiaktiivisuuden induktio on yli 1,5-kertainen (eli $EC_{1,5}$-arvon ratkaisevalla pitoisuudella)

3. $EC_{1,5}$-arvo on alle (<) 1 000 μM (tai < 200 μg/ml, kun testikemikaalin molekyylimassaa ei ole määritetty)

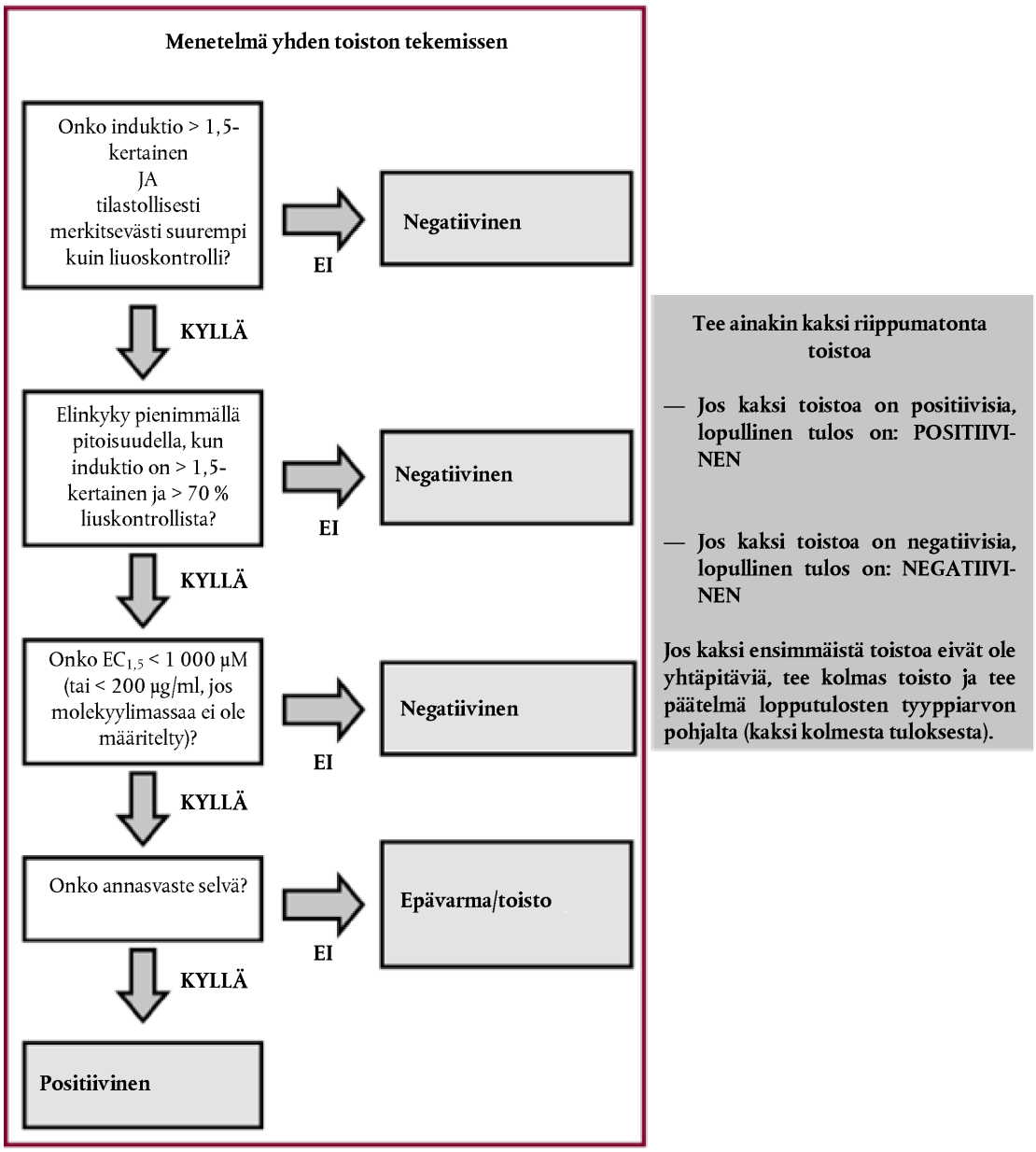
4. lusiferaasi-induktiolla on ilmeinen yleinen annos-vastesuhde (tai kohdassa 33 mainittu bifaasinen vaste).

▼M7

Jos tietyssä toistossa kaikki kolme ensimmäistä edellytystä täyttyvät, mutta lusiferaasi-induktion selvää annos-vastesuhdetta ei havaita, kyseisen toiston tulos pitäisi katsoa epävarmaksi ja testejä on mahdollisesti tehtävä lisää (kuva 1). Lisäksi negatiivinen tulos, joka on saatu pitoisuuksilla, jotka ovat alle 1 000 µM (tai alle 200 µg/ml, kun testikemikaalin molekyylimassaa ei ole määritetty), pitäisi myös katsoa epävarmaksi (ks. 11 kohta).

Kuva 1

KeratinoSens™-kokeessa käytetty ennustemalli. KeratinoSens™-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n valossa ja kohtien 9 ja 11 mukaisesti.



Harvoissa tapauksissa testikemikaalit, joiden indusoima lusiferaasiaktiivisuus on hyvin lähellä sytotoksisia tasoja, voivat olla positiivisia joissakin toistoissa ei-sytotoksisila tasoilla (eli $EC_{1,5}$-arvon ratkaiseva pitoisuus on pienempi kuin (<) IC_{30}), ja toisissa toistoissa vain sytotoksisilla tasoilla (eli $EC_{1,5}$-arvon ratkaiseva pitoisuus on suurempi kuin (>) IC_{30}). Tällaiset kemikaalit on testattava uudelleen

▼M7

käyttämällä kapeampaa annos-vasteanalyysia ja pienempää laimennuskerrointa (eli 1,33- tai Ö2 (= 1,41) -kertainen laimennus kuoppien välillä), jotta voidaan määrittää, onko induktio tapahtunut sytotoksisilla tasoilla vai ei (9).

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali

— Yhdestä aineosasta muodostuva aine

  — kemikaalin tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

  — fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylimassa ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

  — puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

  — tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

  — testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

  — säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

— Monesta aineosasta muodostuva aine, koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine sekä seos:

  — mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja aineosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

  — fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

  — molekyylimassa tai näennäinen molekyylimassa, kun kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

  — tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

  — testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

  — säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Kontrollit

— Positiivinen kontrolli

  — kemikaalin tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

  — fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylimassa ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

  — puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

  — tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

  — testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

  — säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

▼M7

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisiin kontrollituloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksyntäkriteereistä.

— Negatiivinen (kantaja)kontrolli

— kemiallinen tunniste, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t) ja/tai muut tunnisteet

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylimassa ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kun kyse on muista kuin tässä testimenetelmässä mainituista negatiivisista kontrolleista/kantaja-aineista ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testiolosuhteet

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testimenetelmästä

— käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)

— jatkoviljelyjen määrä ja testaamiseen käytettyjen solujen konfluenssiaste

— testaamista edeltävään siirrostukseen käytetty solujen laskentamenetelmä ja toimenpiteet, joilla on varmistettu solujen määrän tasainen jakautuminen (ks. 20 kohta)

— käytetty luminometri (esimerkiksi malli), mukaan lukien instrumenttiasetukset, käytetty lusiferaasisubstraatti sekä lisäyksessä 3 kuvattuun kontrollitestiin perustuvien asianmukaisten luminesenssimittausten esittely

— menettely, jolla on osoitettu laboratorion pätevyys suorittaa testimenetelmä (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaaminen) tai osoitettu testimenetelmän toistettavuus ajan mittaan.

Testimenettely

— toistojen ja rinnakkaisnäytteiden määrä

— testikemikaalien pitoisuudet, aplikointimenettely ja käytetty altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus tutkimukselle asetetuista hyväksyttävyyskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— taulukkomuodossa kunkin toiston osalta testikemikaalille ja positiiviselle kontrollille saadut I_{max}-, $EC_{1,5}$- ja elinkykyarvot (IC_{50}, IC_{30}) sekä keskiarvot (I_{max}: keskiarvo; $EC_{1,5}$ ja elinkykyarvot: geometrinen keskiarvo) sekä keskihajonta, joka lasketaan kaikkien yksittäisten toistojen tiedoista, sekä tieto testikemikaalin luokituksesta ennustemallin mukaisesti

▼M7

— kunkin kokeen osalta negatiivisen kontrollin luminesenssilukemilla saatu variaatiokerroin

— kaavio, jossa kuvataan lusiferaasiaktiivisuuden induktion ja elinkyvyn annos-vastekäyrät

— tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

— KeratinoSens™-kokeella saatujen tulosten tarkastelu

— testimenetelmällä saatujen tulosten tarkastelu IATA:n valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDENKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet Kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367–485.

(4) Tässä liitteessä oleva B.42 luku: Ihon herkistyminen: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä.

(5) Tässä liitteessä oleva B.6 luku: Ihon herkistyminen.

(6) Tässä liitteessä oleva B.50 luku: Ihon herkistyminen: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: DA.

(7) Tässä liitteessä oleva B.51 luku: Ihon herkistyminen: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: BrdU-ELISA -menetelmä.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284–292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281–90.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779–1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45–49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In vitro* 25, 733–744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337–1352.

(14) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 s. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17 s. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106–121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389–400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489–504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353–1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In vitro* 27, 1220–1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683–1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646–657.

(23) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813–1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301–316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225–2232.

(28) OECD (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

(30) NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 s. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aine: Alkuaineet ja niiden yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, mukaan lukien tuotteen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimet, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta (1).

ARE: Antioksidatiivinen vaste-elementti (josta käytetään myös nimitystä elektrofiilinen vaste-elementti, EpRE) on vaste-elementti, joka löytyy monien sytoprotektiivisten ja vaiheen II geenien ylävirrassa sijaitsevalta promoottorialueelta. Kun Nfr2 aktivoi sen, se välittää näiden geenien transkriptionaalisen induktion.

$EC_{1,5}$: 1,5-kertaiselle lusiferaasi-induktiolle interpoloitu pitoisuus.

Haittavaikutusreitti (Adverse Outcome Pathway, AOP): Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (2).

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Herkkyydellä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta, ja se on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (29).

IC_{30}: Pitoisuus, joka vähentää solujen elinkykyä 30 prosenttia.

IC_{50}: Pitoisuus, joka vähentää solujen elinkykyä 50 prosenttia.

I_{max}: Suurin lusiferaasiaktiivisuuden induktiokerroin verrattuna liuoskontrolliin (negatiiviseen kontrolliin) mitattuna millä tahansa testikemikaalipitoisuudella.

Keap1: Lyhenne sanoista *Kelch-like ECH-associated protein 1*. Sensoriproteiini, joka voi säädellä Nrf2-aktiivisuutta. Indusoimattomissa olosuhteissa Keap 1-sensoriproteiini vaikuttaa Nrf2-transkriptiofaktoriin ja saa aikaan ubikitinaation ja protelyyttisen degradaation proteasomissa. Keap 1:n reaktiivisten kysteiinijäämien kovalenttimuunnos pienten molekyylien vaikutuksesta voi johtaa Nrf2:n irtoamiseen Keap1:stä (8) (10) (11).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine (UVCB): Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Liuotin-/kantajakontrolli: Rinnakkaisnäyte, joka sisältää kaikki testijärjestelmän komponentit lukuun ottamatta testikemikaalia ja mukaan lukien käytetyn liuottimen. Sen avulla määritetään perusvaste sellaisten näytteiden osalta, joita käsitellään samaan liuottimeen liuotetulla testikemikaalilla.

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus (29).

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (29).

▼M7

Nrf2: Lyhenne sanoista *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*. Transkriptiofaktori, joka on osa antioksidatiivista vastereittiä. Kun Nrf2 ei ubikinoidu, se kertyy sytoplasmaan ja siirtyy tumaan, missä se yhdistyy ARE:hen monien sytoprotektiivisten geenien ylävirrassa sijaitsevalla promoottorialueella ja käynnistää niiden transkription (8) (10) (11).

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Seos: Seos tai liuos, joka muodostuu kahdesta tai useammasta aineesta ja jossa nämä aineet eivät reagoi (1).

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (29).

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (29).

Testikemikaali: Termillä ”testikemikaali” viitataan siihen, mitä testataan.

Useasta aineosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääaineosaa ja jonka aineosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta aineosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta aineosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta aineosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

Uusittavuus: Samalla kemikaalilla ja saman testiprotokollan mukaisesti tehdyillä testeillä saatujen tulosten keskinäinen vastaavuus (ks. luotettavuus) (29).

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testimenetelmää ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (29).

Variaatiokerroin: Variaation mittayksikkö, joka lasketaan toistoista saatujen tietojen pohjalta jakamalla normaalijakauma keskiarvolla. Variaatiokerroin voidaan ilmaista prosenttilukuna kertomalla se 100:lla.

▼M7

Yhdennetty lähestymistapa testaamiseen ja arviointiin (Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Yhdestä aineosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääaineosaa.

YK:n GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, Yhdistyneiden kansakuntien kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Järjestelmä, jossa kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

▼M7

Lisäys 2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

***In vitro* -ihoherkistys: ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmä**

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla KeratinoSens™-kokeella oikea, odotettu ennuste kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla $EC_{1,5}$- ja IC_{50}-arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu edustamaan erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaraan. Muita valintakriteerejä olivat kaupallinen saatavuus, laadukkaan *in vivo* -referenssin saatavuus sekä laadukkaiden *in vitro* -tietojen saatavuus KeratinoSens™-kokeesta.

Taulukko 1

Suositellut aineet KeratinoSens™-kokeen teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -ennuste (1)	KeratinoSens™ Ennuste (2)	$EC_{1,5}$ (µM) -viitealue (3)	IC_{50} (µM) -viitealue (3)
Isopropanoli	67-63-0	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	> 1 000	> 1 000
Salisyylihappo	69-72-7	Kiinteä	Ei herkistävä	Negatiivinen	> 1 000	> 1 000
Maitohappo	50-21-5	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	> 1 000	> 1 000
Glyseroli	56-81-5	Nestemäinen	Ei herkistävä	Negatiivinen	> 1 000	> 1 000
Kinnamyylialkoholi	104-54-1	Kiinteä	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	25–175	> 1 000
Etyleeniglykolidimetakrylaatti	97-90-5	Nestemäinen	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	5–125	> 500
2-merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	25–250	> 500
Metyylidibromoglutaronitriili	35691-65-7	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	< 20	20–100
4-metyyliaminofenolisulfaatti	55-55-0	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	< 12,5	20–200
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Herkistävä (äärimmäisen)	Positiivinen	< 12,5	5–20

(1) Vaaraa (ja potenssia) koskevat ennusteet *in vivo* perustuvat LLNA-tietoihin (13). *In vivo* -potenssi on saatu käyttämällä ECETOC:n esittämiä kriteerejä (24).
(2) KeratinoSens™-ennustetta pitäisi tarkastella IATA:n ja tämän testimenetelmän kohtien 9 ja 11 määräysten valossa.
(3) Perustuu aiemmin havaittuihin arvoihin (12).

▼M7

Lisäys 3

LUMINESENSSIMITTAUSTEN LAADUNVALVONTA

Peruskoe, jolla varmistetaan optimaaliset luminesenssimittaukset KeratinoSens™-kokeessa

Seuraavat kolme parametria ovat ratkaisevan tärkeitä varmistettaessa luminometrin tulosten luotettavuus:

— riittävä herkkyys, jolloin kontrollikuoppien antama tausta on tasainen

— ei gradienttia levyllä pitkän luenta-ajan vuoksi; ja

— se, etteivät erittäin aktiiviset kuopat aiheuta valokontaminaatiota viereisissä kuopissa.

Ennen testiä on suositeltavaa varmistaa luminesenssimittausten asianmukaisuus tekemällä testi seuraavassa kuvatulla kontrollilevykokoonpanolla (kolminkertainen analyysi).

Ensimmäisen harjoituskokeen levykokoonpano

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Tyhjä**

EGDMA = Etyleeniglykolidimetakrylaatti (CAS-nro 97-90-5), voimakkaasti indusoiva kemikaali

CA = Kanelialdehydi, positiivinen vertailuaine (CAS-nro 104-55-2)

Laadunvalvonta-analyysin pitäisi osoittaa seuraavaa:

— selvä annos-vastesuhde rivillä D, niin että I_{max} on yli 20 kertaa suurempi kuin tausta (useimmissa tapauksissa saavutetut I_{max}-arvot ovat 100–300)

— ei annos-vastesuhdetta riveillä C ja E (induktioarvo ei ole yli 1,5 (ihanteellisesti ei yli 1,3), mikä johtuu mahdollisesta valokontaminaatiosta, jota aiheuttavat erityisesti hyvin aktiiviset kuopat EGDMA-rivillä

— ei tilastollisesti merkitsevää eroa rivien A, B, C, E, F ja G välillä (eli ei gradienttia levyllä) ja

— riveillä A, B, C, E, F ja G ja H-rivin DMSO-kuopissa vaihtelun pitäisi olla alle 20 prosenttia (vakaa tausta).

▼M7

B.61. FLUORESEIINIVUOTOTESTIMENETELMÄ SILMÄÄ SYÖVYTTÄVIEN JA SILMÄÄ VAKAVASTI ÄRSYTTÄVIEN AINEIDEN TUNNISTAMISEKSI

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 460 (2012). Fluoreseiinivuototestimenetelmä (FL) on *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan käyttää tietyissä olosuhteissa ja tietyin rajoituksin kemikaalien (aineiden ja seosten) luokitteluun silmää syövyttäviksi ja silmää vakavasti ärsyttäviksi aineiksi Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) (luokka 1), aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) (luokka 1) ja Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston (Environmental Protection Agency, EPA) (luokka I) (1) (2) määritelmien mukaisesti. Tässä testimenetelmässä silmää vakavasti ärsyttävillä aineilla tarkoitetaan testikemikaaleja, joiden annostelu silmään aiheuttaa kudosvaurioita, jotka eivät palaudu 21 päivässä, tai jotka aiheuttavat vakavaa fyysistä näön rappeutumista, ja silmää syövyttävillä aineilla tarkoitetaan kemikaaleja, jotka aiheuttavat silmään palautumatonta kudosvauriota. Nämä kemikaalit kuuluvat YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 1 ja EPA:n luokkaan I.

Vaikka fluoreseiinivuototestimenetelmää ei pidetäkään sopivana menetelmänä korvaamaan kokonaan kanin silmällä tehdyn *in vivo* -testin, sitä suositellaan käytettäväksi osana vaiheittaista testausstrategiaa sääntömääräistä luokittelua ja merkitsemistä varten. Siten fluoreseiinivuototestimenetelmää suositellaan ensimmäisen vaiheen menetelmäksi ylhäältä alaspäin etenevässä lähestymistavassa silmää syövyttävien tai vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi, erityisesti tietynlaisten, tarkkaan rajattujen kemikaalien osalta (vesiliuokset aineet ja seokset). (3) (4).

Nykyään tunnustetaan yleisesti se, ettei yksikään *in vitro* -silmä-ärsytystesti voi korvata lähitulevaisuudessa *in vivo* -silmätestiä (TM B.5 5 (5)) keinona saada ennusteita koko ärsytysskaalasta eri kemikaaliluokkien osalta. *In vivo* -silmätesti saattaa kuitenkin olla mahdollista korvata useiden eri testimenetelmien strategisilla yhdistelmillä (vaiheittaisessa) testausstrategiassa (4). Ylhäältä alaspäin etenevä lähestymistapa (4) on suunniteltu käytettäväksi silloin, kun olemassa olevien tietojen perusteella kemikaalin ärsytyspotentiaalin oletetaan olevan suuri.

Kohdassa 35 esitetyn tarkan ennustemallin mukaisesti fluoreseiinitestimenetelmällä voidaan määrittää kemikaaleja rajalliselta sovellettavuusalueelta silmää syövyttäviksi aineiksi / silmää vakavasti ärsyttäviksi aineiksi (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1; EU:n CLP-asetuksen luokka 1; EPA:n luokka I) ilman jatkotestausta. Saman oletetaan koskevan seoksia, joskaan seoksia ei käytetty validoinnissa. Siksi fluoreseiinitestimenetelmää voidaan käyttää määrittämään kemikaalien ärsyttävyys/syövyttävyys silmässä testimenetelmän B.5 (5) vaiheittaisen testausstrategian mukaisesti. Kemikaali, jonka ei ole ennustettu syövyttävän tai ärsyttävän vakavasti silmää fluoreseiinitestimenetelmällä, on kuitenkin testattava yhdellä tai useammalla lisätestimenetelmällä (*in vitro*- ja/tai *in vivo* -menetelmällä), jolla voidaan tunnistaa täsmällisesti i) kemikaalit, jotka ovat *in vitro* vääriä negatiivisia silmää syövyttäviä / vakavasti ärsyttäviä aineita FL-menetelmässä (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1; EU:n CLP-asetuksen luokka 1; EPA:n luokka

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

I); ii) kemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmää syövyttäviksi/ärsyttäviksi (ei luokitusta YK:n GHS-järjestelmässä; ei luokitusta EU:n CLP-asetuksessa; EPA:n luokka IV); ja/tai iii) kemikaalit, joilla on kohtalainen/lievä silmää ärsyttävä vaikutus (YK:n GHS-järjestelmän luokat 2A ja 2B; EU:n CLP-asetuksen luokka 2; EPA:n luokat II ja III).

Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testikemikaalin mahdollinen kyky syövyttää tai ärsyttää vakavasti silmää mittaamalla sen kykyä aiheuttaa vahinkoa läpäisemättömässä konfluentissa yksikerroksisessa epiteelisolukudoksessa. Epiteelikerroksen, kuten sidekalvon ja sarveiskalvon epiteelikerroksen, tärkeänä tehtävänä on valvoa epiteelin läpäisevyyttä. Epiteelin läpäisevyyttä hallitsevat monet tiiviit liitokset. Sarveiskalvon epiteelin läpäisevyyden kasvun *in vivo* on osoitettu korreloivan havaitun tulehduksen ja pintavaurion voimakkuuden kanssa silmän ärsytyksen kehittyessä.

Fluoreseiinitestimenetelmässä mitataan toksisia vaikutuksia lyhytaikaisen testikemikaalialtistuksen jälkeen sen pohjalta, miten natriumfluoreseiinin kyky päästä läpäisevien inserttien päällä viljellyistä Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) -soluista muodostuvan yhden solun vahvuisen epiteelikerroksen läpi kasvaa. Fluoreseiinivuodon määrä riippuu vauriosta, jonka kemikaali on aiheuttanut tiiviille liitoksille, desmosomiliitoksille ja solukalvoille, ja sen avulla voidaan arvioida testikemikaalin potentiaalista toksisuutta silmälle. Lisäyksessä 1 on kaavio fluoreseiinivuototestimenetelmää varten inserttikalvolla viljellyistä MDCK-soluista.

Määritelmät esitetään lisäyksessä 2.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

Tämä testimenetelmä perustuu INVITTOX-testimenetelmäprotokollaan nro 71 (6), jota Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus (ECVAM) on arvioinut yhteistyössä Yhdysvaltojen vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojen välisen koordinointikomitean (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) ja Japanin vastaavan keskuksen (JaCVAM) kanssa.

Fluoreseiinivuototestimenetelmää ei suositella sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, jotka pitäisi luokitella lievää tai kohtalaista ärsytystä aiheuttaviksi tai joita ei pitäisi luokitella silmä-ärsytyksen osalta (aineet ja seokset) (eli YK:n GHS-järjestelmän luokka 2A/2B, ei luokitusta; EU:n CLP-asetuksen luokka 2, ei luokitusta; EPA:n luokka II/III/IV), kuten validointitutkimuksessa on osoitettu (3) (7).

Testimenetelmä soveltuu vain vesiliukoisille kemikaaleille (aineille ja seoksille). Fluoreseiinivuototestimenetelmä ennustaa yleensä oikein kemikaalien vakavan silmä-ärsytyspotentiaalin, jos kemikaalit ovat vesiliukoisia ja/tai laimennuksella ei ole vaikutusta niiden toksiseen vaikutukseen (7). Jotta kemikaali voidaan luokitella vesiliukoiseksi, sen pitäisi koeolosuhteissa liueta steriiliin kalsiumpitoiseen (pitoisuus 1,0–1,8 mM), fenolipunaa sisältämättömään Hanksin suolaliuokseen (HBSS), niin että sen pitoisuus on vähintään 250 mg/ml (yksi annos yli rajan 100 mg/ml). Jos testikemikaali kuitenkin liukenee alle 100 mg:n/ml pitoisuutena mutta saa jo kyseisellä pitoisuudella aikaan 20 prosentin fluoreseiinivuodon (eli FL_{20} < 100 mg/ml), se voidaan silti luokitella YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1 tai EPA:n luokkaan I.

Tämän testimenetelmän rajoituksena on se, ettei sitä voida käyttää vahvoihin happoihin ja emäksiin, solufiksatiiveihin ja erittäin haihtuviin kemikaaleihin. Näihin kemikaaleihin liittyy mekanismeja, joita fluoreseiinivuototestimenetelmä ei mittaa, esimerkiksi mittava koagulaatio, saippuoituminen tai erityisiä kemiallisia reaktioita. Muut menetelmän tunnetut rajoitteet perustuvat tuloksiin, jotka liittyvät menetelmän kykyyn antaa ennusteita värillisten ja viskoosisten testikemikaalien osalta (7). On esitetty, että kummankin tyyppisiä kemikaaleja on vaikeaa saada pois yhden solun vahvuisesta kerroksesta lyhyen altistusajan jälkeen

▼M7

ja että useamman pesuvaiheen käyttö parantaisi testimenetelmän ennustuskykyä. Nesteeseen liuotetuilla kiinteillä kemikaaleilla on taipumusta saostua, ja solujen altistuksessa käytettyä lopullista pitoisuutta on vaikeaa määrittää. Kun tietokannasta poistetaan näihin kemiallisiin ja fysikaalisiin luokkiin kuuluvat kemikaalit, fluoreseiinivuototestimenetelmän tarkkuus EU:n, EPA:n ja GHS:n luokitusjärjestelmissä paranee huomattavasti (7).

Tämän testimenetelmän tarkoituksen valossa (eli vain silmää syövyttävien / vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi) väärät negatiiviset tulokset (ks. 13 kohta) eivät ole ratkaisevia, sillä tällaiset kemikaalit testattaisiin tämän jälkeen muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testeillä tai kaneilla sen mukaan, mitä sääntömääräiset vaatimukset edellyttävät, käyttäen vaiheittaista testistrategiaa todistusnäyttölähestymistavan mukaisesti (5) (ks. myös 3 ja 4 kohta).

Muut fluoreseiinivuototestimenetelmän tunnetut rajoitukset liittyvät vääriin negatiivisiin ja vääriin positiivisiin tuloksiin. Kun menetelmää käytetään ensimmäisenä vaiheena ylhäältä alaspäin etenevässä lähestymistavassa vesiliukoisten silmää syövyttävien / vakavasti ärsyttävien aineiden ja seosten tunnistamiseksi (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1; EU:n CLP-asetuksen luokka 1; EPA:n luokka I), FL-testimenetelmän väärien positiivisten tulosten osuus vaihteli 7 prosentista (7/103; YK:n GHS ja EU:n CLP) 9 prosenttiin (9/99; Yhdysvaltojen EPA) ja väärien negatiivisten tulosten osuus vaihteli 54 prosentista (15/28; Yhdysvaltojen EPA) 56 prosenttiin (27/48; YK:n GHS ja EU:n CLP) verrattuna *in vivo* -tuloksiin. Kemikaaliryhmiä, jotka tuottivat vääriä positiivisia ja/tai vääriä negatiivisia tuloksia FL-testimenetelmässä, ei määritetä tässä.

MDCK-soluviljelmään liittyy tiettyjä teknisiä rajoitteita. Tiiviit liitokset, jotka estävät natriumfluoreseiiniväriaineen kulkeutumisen yhden solun vahvuisen kerroksen läpi, heikentyvät lukuisten jatkoviljelyjen myötä. Puutteet tiiviiden liitosten muodostumisessa johtavat siihen, että fluoreseiinivuoto lisääntyy käsittelemättömässä kontrollissa. Siksi on tärkeää määrittää suurin sallittu vuoto käsittelemättömissä kontrolleissa (ks. 38 kohta: vuoto 0 prosenttia). Koska solut voivat alkaa muuttua ajan mittaan, aivan kuten kaikkien *in vitro* -kokeidenkin tapauksessa, on tärkeää ilmoittaa, kuinka monetta jatkoviljelyä kokeissa käytetään.

Käyttöaluetta voidaan laajentaa nykyisestä joissakin tapauksissa, mutta vasta kun kattavampia tietoja tutkituista testikemikaaleista on analysoitu, ja nämä tiedot on mieluiten hankittava testaamalla (3). Tätä testimenetelmää päivitetään sen mukaisesti uusien tietojen tarkastelun myötä.

Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen olisi käytettävä lisäyksessä 3 mainittuja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja. Laboratoriot voivat käyttää näitä kemikaaleja osoittaakseen teknisen pätevyytensä FL-testin suorituksessa ennen kuin ne toimittavat FL-määritystuloksia sääntömääräistä vaaraluokitusta varten.

TESTIN PERIAATE

Fluoreseiinivuototestimenetelmä on sytotoksisuuteen ja solujen toimintaan perustuva *in vitro* -koe, jossa käytetään yhden solun vahvuista MDCK CB997 -lieriöepiteelisolujen konfluenttia viljelmää, joka on kasvatettu puoliläpäisevälle insertille ja joka mallintaa sarveiskalvon epiteelin proliferoitumatonta tilaa *in vivo*. MDCK-solulinja on vakiintunut käyttöön, ja solut muodostavat samanlaisia tiiviitä liitoksia ja desmosomiliitoksia kuin sidekalvon ja sarveiskalvon epiteelin apikaalisella puolella. Tiiviit liitokset ja desmosomiliitokset estävät *in vivo* liuenneita aineita ja vierasaineksia tunkeutumasta sarveiskalvon epiteelin läpi. Epiteelikudoksen muodostaman esteen menetys tiiviiden liitosten ja desmosomiliitosten vaurioitumisen vuoksi on yksi kemikaalin aiheuttamaan silmä-ärsytykseen johtavista varhaisista tapahtumista.

▼M7

Testikemikaalia annostellaan insertin apikaalipuolelle kasvatetulle konfluentille solukerrokselle. Testissä käytetään rutiininomaisesti lyhyttä, yhden minuutin pituista altistusta, joka vastaa normaalia puhdistusvauhtia tilanteissa, joissa ihminen altistuu kemikaalille. Lyhyen altistusajan etuna on se, että vesipohjaisia aineita ja seoksia voidaan testata laimentamattomina, jos ne voidaan poistaa helposti altistuksen jälkeen. Tämän seurauksena tulokset ovat suoremmin verrattavissa kemikaalin vaikutuksiin ihmisissä. Tämän jälkeen testikemikaali poistetaan ja yhden solun vahvuiselle kerrokselle annostellaan myrkytöntä, erittäin fluoresenttia natriumfluoreseiinivärjäinetta 30 minuutiksi. Vahinko, jonka testikemikaali aiheuttaa tiiviille liitoksille, määritetään sen perusteella, minkä verran fluoreseiinia vuotaa solukerroksen läpi tietyn ajan kuluessa.

Natriumfluoreseiinivärjäineen määrä, joka vuotaa yhden solun vahvuisen kerroksen ja inserttikalvon läpi kuopassa olevaan tiettyyn liuosmäärään (johon natriumfluoreseiinivärjäine päätyy), määritetään mittaamalla kuopan fluoreseiinipitoisuus spektrofluorometrialla. Fluoreseiinivuodon (FL) määrä lasketaan vertaamalla fluoresenssin intensiteetistä (FI) kertovia lukemia, jotka on saatu kahdesta kontrollista: nollakontrollista ja maksimaalista vuotoa kuvaavasta kontrollista. Vuotoprosentti ja siten tiiviiden liitosten vaurioitumisen aste ilmaistaan suhteessa näihin kontrolleihin kunkin määritetyn testikemikaalipitoisuuden osalta. Sitten lasketaan FL_{20} (eli pitoisuus, joka aiheuttaa 20 prosentin fluoreseiinivuodon suhteessa käsittelemättömän, konfluentin, yhden solun vahvuisen kerroksen ja soluttomien inserttien osalta kirjattuun arvoon). FL_{20}-arvoa (mg/ml) käytetään ennustemallissa silmää syövyttävien ja vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseen (ks. 35 kohta).

Palautuminen on tärkeä osa testikemikaalin toksisuusprofiilia, ja myös sitä arvioidaan *in vivo* -silmä-ärsytystestillä. Alustavien analyysien mukaan palautumistiedot (aina 72 tunnin jälkeen kemikaalialtistuksesta) voivat mahdollisesti lisätä INVITTOX-protokollan nro 71 ennusteentekoedellytyksiä, mutta lisäarvioita tarvitaan ja niissä olisi hyötyä lisätiedoista, jotka on mieluiten hankittu lisätesteillä (6). Tätä testimenetelmää päivitetään sen mukaisesti uusien tietojen tarkastelun myötä.

MENETTELY

Yhden solun vahvuisen kerroksen valmistelu

Yhden solun vahvuinen MDCK CB997 -solukerros valmistellaan käyttämällä ei-konfluentteja soluja, jotka kasvavat soluviljelypulloissa DMEM:ssä / Nutrient Mix F12 -seoksessa (1 x L-glutamiinipitoista konsentraattia, 15 mM HEPES-puskuria, kalsiumia (pitoisuus 1,0–1,8 mM) ja 10 prosenttia lämmöllä inaktivoitua FCS:ää/FBS:ää). On tärkeää, että kaikki aineet/liuokset, joita käytetään koko FL-kokeen ajan, sisältävät kalsiumia (jonka pitoisuus on 1,8 mM:n (200 mg/l) ja 1,0 mM:n (111 mg/l) välillä), mikä takaa kestävien tiiviiden liitosten muodostumisen. Tasaisten ja toistettavien tiiviiden liitosten muodostumisen varmistamiseksi on valvottava sitä, kuinka monennesta jatkoviljelystä peräisin olevia soluja käytetään (jatkoviljelyluku). Solujen jatkoviljelyluvun pitäisi mieluiten olla 3–30 sulatuksesta, sillä näistä jatkoviljelyeristä saadut solut toimivat samankaltaisesti, mikä myötävaikuttaa koetulosten toistettavuuteen.

Ennen fluoreseiinivuototestiä solut irrotetaan pullosta trypsinisaatiolla ja sentrifugoidaan ja sopiva määrä soluja siirrostetaan insertteihin, jotka on pantu 24-kuoppaisiin levyihin (ks. lisäys 1). Solujen siirrostamiseen pitäisi käyttää inserttejä, joiden halkaisija on 12 mm ja joissa on selluloosaesteriseoksesta muodostuva kalvo, jonka paksuus on 80–150 μm ja huokoskoko 0,45 mm. Validointitutkimuksessa käytettiin 12 mm:n Millicell-HA-inserttejä. Insertin ja kalvotyypin ominaisuudet ovat tärkeitä, sillä ne voivat vaikuttaa solujen kasvuun ja kemikaalin sitoutumiseen. Tietyntyyppiset kemikaalit voivat sitoutua Millicell-HA-inserttikalvoon, mikä voi vaikuttaa tulosten tulkintaan. Muita kalvoja käytettäessä niiden vastaavuus on osoitettava käyttämällä pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja (ks. lisäys 3).

▼M7

Kemikaalien sitoutuminen inserttikalvoon on tavallisempaa, kun kyseessä on kationinen kemikaali, kuten bentsalkoniumkloridi, joka jota varautunut kalvo vetää puoleensa (7). Kemikaalin sitoutuminen inserttikalvoon saattaa pidentää altistumisaikaa kemikaalille, mikä johtaa kemikaalin toksisen potentiaalin yliarviointiin, mutta voi myös fyysisesti vähentää fluoreseiinin vuotoa insertin läpi sitomalla väriainetta inserttikalvoon sitoutuneeseen kationiseen kemikaaliin, mikä johtaa kemikaalin toksisen potentiaalin aliarviointiin. Tätä on helppo seurata altistamalla pelkkä kalvo testattavan kemikaalin huippupitoisuudelle ja lisäämällä sitten natriumfluoreseiiniväriainetta normaali pitoisuus vakioajaksi (ei solukontrollia). Jos natriumfluoreseiiniväriainetta sitoutuu inserttikalvoon, se näyttää keltaiselta, kun testiaine on pesty pois. Siksi on olennaista tuntea testikemikaalin sitoutumisominaisuudet, jotta kemikaalin vaikutusta soluihin voidaan tulkita.

Insertteihin siirrostettujen solujen pitäisi muodostaa konfluentti yhden solun vahvuinen kerros, kun solut altistetaan kemikaalille. Kuhunkin inserttiin pitäisi lisätä $1{,}6 \times 10^5$ solua (400 µl solususpensiota, jossa on 4×10^5 solua millilitrassa). Näissä olosuhteissa konfluentti yhden solun vahvuinen kerros syntyy yleensä 96 tunnin viljelyn jälkeen. Insertit pitäisi tutkia silmämääräisesti ennen siirrostusta, jotta varmistetaan, että kohdan 30 mukaisessa silmämääräisessä tarkastuksessa mahdollisesti kirjatut vauriot johtuvat käsittelystä.

MDCK-soluviljelmiä pitäisi pitää inkubaattoreissa kosteutetussa ympäristössä, jossa on 5 ± 1 prosentti CO_2:ta, ja 37 ± 1 °C:n lämpötilassa. Soluissa ei saa olla kontaminaatiota (bakteerit, virukset, mykoplasmat tai sieni-itiöt).

Testi- ja kontrollikemikaalien annostelu

Kutakin koeajoa varten on valmistettava tuore testikemikaalin kantaliuos, ja se on käytettävä 30 minuutin kuluessa valmistuksesta. Seerumin proteiinien sitoutumisen välttämiseksi testikemikaalien valmistelussa on käytettävä kalsiumpitoista (pitoisuus 1,0–1,8 mM) fenolipunatonta HBSS:ää. Ennen testaamista on arvioitava, miten 250 mg kemikaalia liukenee millilitraan HBSS:ää. Jos kemikaali pysyy tällä pitoisuudella vakaana suspensiona tai emulsiona (eli jos se säilyy tasaisena eikä saostu tai jakaudu useampaan faasiin) 30 minuutin jälkeen, HBSS:ää voidaan käyttää edelleen liuottimena. Jos kuitenkin havaitaan, ettei kemikaali liukene tällaisena pitoisuutena HBSS:ään, on harkittava muiden testimenetelmien käyttämistä fluoreseiinivuotomenetelmän sijaan. Tilanteissa, joissa kemikaali ei liukene HBSS:ään, kevyen mineraaliöljyn käyttöä liuottimena pitäisi harkita varoen, sillä saatavana ei ole riittävästi tietoja, joiden pohjalta voitaisiin tehdä päätelmiä fluoreseiinivuotokokeen suorituskyvystä tällaisissa olosuhteissa.

Kaikkien testattavien kemikaalien valmistelussa käytetään steriiliä kalsiumpitoista (pitoisuus 1,0–1,8 mM) fenolipunatonta HBSS:ää, ja kantaliuoksesta valmistetaan viisi pitoisuutta liuottamalla tietty massa tiettyyn tilavuuteen – 1, 25, 100 ja 250 milligrammaa yhteen millilitraan sekä yksi raaka tai tyydyttynyt liuos. Kiinteää kemikaalia testattaessa mukana pitäisi olla yksi liuos, jossa pitoisuus on erittäin suuri, 750 mg/ml. Tämän kemikaalipitoisuuden annostelussa soluille on mahdollisesti käytettävä positive displacement -pipettiä. Jos toksisen pitoisuuden havaitaan olevan 25–100 mg/ml, on testattava kahdesti seuraavat ylimääräiset pitoisuudet: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. FL_{20}-arvo pitäisi johtaa näistä pitoisuuksista sillä edellytyksellä, että hyväksyttävyysperusteet täyttyvät.

Testikemikaaleja annostellaan konfluentille yhden solun vahvuiselle kerrokselle soluviljelynesteen poistamisen jälkeen ja pestään steriilillä, lämpimällä (37 °C), kalsiumpitoisella (pitoisuus 1,0–1,8 mM) fenolipunattomalla HBSS:llä. Tätä ennen tarkastetaan silmämääräisesti, ettei suodattimissa ole ennalta vaurioita, jotka

▼M7

voisivat virheellisesti aiheuttaa mahdollisia yhteensopimattomuuksia testikemikaalien kanssa. Kussakin ajossa kutakin testikemikaalipitoisuutta ja kontrollia kohden pitäisi käyttää ainakin kolmea rinnakkaisnäytettä. Kun altistus huoneenlämmössä on kestänyt yhden minuutin, testikemikaali imetään huolellisesti pois, yhden solun vahvuinen kerros pestään steriilillä, lämpimällä (37 °C), kalsiumpitoisella (pitoisuus 1,0–1,8 mM) fenolipunattomalla HBSS:llä ja fluoreseiinivuoto mitataan välittömästi.

Kussakin ajossa olisi käytettävä rinnakkaisia negatiivisia kontrolleja (NC) ja positiivisia kontrolleja (PC) osoittamaan, että yhden solun vahvuisen kerroksen eheys (negatiivinen kontrolli) ja solujen herkkyys (positiivinen kontrolli) ovat määritellyn aikaisemman hyväksyttävyysvälin sisällä. Positiivisen kontrollin kemikaaliksi ehdotetaan Brij 35:tä (CAS-nro 9002-92-0), niin että pitoisuus on 100 mg/ml. Tämän pitoisuuden pitäisi saada aikaan noin 30 prosentin fluoreseiinivuoto (hyväksyttävyysväli on 20–40 prosentin fluoreseiinivuoto eli vaurio solukerroksessa). Negatiivisen kontrollin kemikaaliksi ehdotetaan kalsiumpitoista (pitoisuus 1,0–1,8 mM), fenolipunatonta HBSS:ää (käsittelemätön nollakontrolli). Kunkin ajon pitäisi sisältää myös enimmäisvuotokontrolli, jotta FL_{20}-arvot voidaan laskea. Enimmäisvuoto määritetään käyttämällä kontrolli-inserttiä ilman soluja.

Fluoreseiinin läpäisevyyden määrittäminen

Heti kun testi- ja kontrollikemikaalit on poistettu, insertteihin lisätään 400 µl natriumfluoreseiiniliuosta, jonka pitoisuus on 0,1 mg/ml (0,01 painoprosenttia tilavuudesta kalsiumpitoisessa [pitoisuus 1,0–1,8 mM] fenolipunattomassa HBSS:ssä) (esimerkiksi Millicell-HA). Viljelmiä pidetään 30 minuuttia huoneenlämmössä. Kun inkubaatio fluoreseiinin kanssa päättyy, insertit poistetaan huolellisesti kustakin kuopasta. Kukin suodatin tarkistetaan silmämääräisesti, ja käsittelyn aikana mahdollisesti syntyneet vauriot kirjataan.

Yhden solun vahvuisen kerroksen ja insertin läpi vuotaneen fluoreseiinin määrä kvantifioidaan liuoksesta, joka jää kuoppiin inserttien poistamisen jälkeen. Mittaukset tehdään spektrofluorometerillä, niin että eksitaatioaallonpituus on 485 nm ja emissioaallonpituus 530 nm. Spektrofluorometrin herkkyys pitäisi asettaa sellaiseksi, että suurimman fluoreseiinivuodon (insertti ilman soluja) ja pienimmän fluoreseiinivuodon (insertti, jossa on negatiivisella kontrollilla käsitelty konfluentti yhden solun vahvuinen kerros) välinen numeerinen ero on mahdollisimman suuri. Käytettyjen spektrofluorometrien erojen vuoksi ehdotetaan käytettäväksi herkkyyttä, jolla fluoresenssin intensiteetti on yli 4 000 suurimman fluoreseiinivuotokontrollin osalta. Suurin fluoreseiinivuotoarvo ei saa olla yli 9 999. Fluoreseiinivuodon suurimman intensiteetin pitäisi olla käytetyn spektrofluorometrin lineaarisella vaihtelualueella.

Tulosten tulkinta ja ennustettavuusmalli

Fluoreseiinivuodon määrä riippuu siitä, minkä verran kemikaali on vahingoittanut tiiviitä liitoksia. Kunkin testatun kemikaalipitoisuuden aiheuttaman fluoreseiinivuodon prosentuaalinen aste lasketaan kyseisen testikemikaalin fluoreseiinivuotoarvoista vertaamalla niitä negatiivisen kontrollin fluoreseiinivuotoarvoihin (negatiivisella kontrollilla käsitellystä konfluentista yhden solun vahvuisesta kerroksesta saatu lukema) ja enimmäisvuorokontrollin fluoreseiinivuotoarvoihin (soluttoman insertin läpi vuotaneen fluoreseiinin määrästä kertova lukema).

Enimmäisvuodon fluoresenssin keskimääräinen intensiteetti = x

0 prosentin vuodon fluoresenssin keskimääräinen intensiteetti (NC) = y

100 prosentin vuodon keskiarvo saadaan vähentämällä keskimääräinen 0 prosentin vuoto keskimääräisestä enimmäisvuodosta

eli kaavalla x – y = z.

Kunkin tietyn annoksen vuotoprosentti lasketaan vähentämällä 0 prosentin vuoto kolmen rinnakkaisnäytteen fluoresenssin keskimääräisestä intensiteetistä (m) ja jakamalla tämä arvo 100 prosentin vuodolla, toisin sanoen kaavalla % FL = [(m–y) / z] × 100 %, jossa

▼M7

m = tietyn pitoisuuden kolmen rinnakkaisnäytteen fluoresenssin keskimääräinen intensiteetti

% FL = solukerroksen läpi vuotaneen fluoreseiinin prosentuaalinen määrä.

Kemikaalipitoisuus, joka aiheuttaa 20 prosentin fluoreseiinivuodon, on laskettava seuraavalla kaavalla:

$$FL_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

jossa

D = inhibitioaste (%)

A = vaurioaste (%) (20 prosentin fluoreseiinivuoto)

B = fluoreseiinin vuotoaste (%) < A

C = fluoreseiinin vuotoaste (%) > A

M_C = C:n pitoisuus (mg/ml)

M_B = B:n pitoisuus (mg/ml)

FL_{20}:n raja-arvo sen ennustamiselle, ovatko kemikaalit silmää syövyttäviä / vakavasti ärsyttäviä, esitetään seuraavassa:

FL_{20} (mg/ml)	YK:n GHS (luokitus ja merkitseminen)	EU:n CLP (luokitus ja merkitseminen)	Yhdysvaltojen EPA (luokitus ja merkitseminen)
≤ 100	Luokka 1	Luokka 1	Luokka I

Luokitus ja merkitseminen (C & L)

Fluoreseiinitestimenetelmää suositellaan vain vesiliukoisten silmää syövyttävien ja vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseen (YK:n GHS-järjestelmän luokka 1, EU:n CLP-asetuksen luokka 1, Yhdysvaltojen EPA:n luokka I) (ks. 1 ja 10 kohta).

Jotta vesiliukoisten kemikaalien (aineiden ja seosten) (3) (6) (7) voidaan katsoa aiheuttavan ”vakavaa vahinkoa silmälle” (YK:n GHS-järjestelmän / EU:n CLP-asetuksen luokka 1) tai olevan ”silmää syövyttävä tai vakavasti ärsyttävä” (Yhdysvaltojen EPA:n luokka I), testikemikaalin pitäisi tuottaa FL_{20}-arvo enintään 100 mg:n/ml pitoisuudella.

Tulosten hyväksyminen

Suurimman keskimääräisen fluoreseiinivuotoarvon (x) pitäisi olla yli 4 000 (ks. 31 kohta), 0 prosentin vuodon keskiarvon (y) pitäisi olla enintään 300, ja 100 prosentin vuodon keskiarvon (z) pitäisi olla 3 700–6 000.

Testiä pidetään hyväksyttävänä, jos positiivinen kontrolli on aiheuttanut 20–40 prosentin vaurion solukerrokselle (mitattuna prosentuaalisena fluoreseiinivuotona).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

Yksittäisten rinnakkaisnäytekuoppien tiedot pitäisi esittää kunkin ajon osalta taulukkomuodossa (esimerkiksi fluoresensin intensiteetin arvot ja lasketun prosentuaalisen fluoreseiinivuodon tiedot kunkin testikemikaalin osalta, luokitus mukaan luettuna). Lisäksi on raportoitava kunkin ajon yksittäisten rinnakkaisnäytemittausten keskiarvot ± keskihajonta.

▼M7

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testi- ja kontrollikemikaalit

— kemiallinen nimi (kemialliset nimet), kuten CAS:n (Chemical Abstracts Service) käyttämä rakennetta kuvaava nimi, jonka jälkeen annetaan muut nimet, jos ne tunnetaan

— kemikaalin CAS-numero, jos tieto on saatavilla

— aineen tai seoksen puhtausaste tai koostumus (painoprosentteina), jos tieto on saatavilla

— tutkimuksen suorittamisen kannalta merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (kuten fysikaalinen olomuoto, haihtuvuus, pH-arvo, stabiilius, vesiliukoisuus, kemiallinen luokka)

— tarvittaessa testi- tai kontrollikemikaalien käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— varastointiolosuhteet.

Käytetyn testimenetelmän ja protokollan perustelu

— Pitäisi sisältää näkökohtia, jotka koskevat testimenetelmän soveltamisalaa ja rajoituksia.

Testiolosuhteet

— käytetyn solujärjestelmän kuvaus, mukaan lukien todistus autenttisuudesta ja solulinjan mykoplasmastatuksesta

— käytetty testimenettely yksityiskohtaisesti

— Käytetyt testikemikaalikonsenraatiot

— altistumisaika testikemikaalille

— fluoreseiinin kanssa tehdyn inkubaation kesto

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista

— kuvaus käytetyistä arviointikriteereistä

— viittaukset mallin historiatietoihin (tarvittaessa esimerkiksi negatiiviset ja positiiviset kontrollit, vertailukemikaalit)

— tieto laboratorion osoittamasta teknisestä pätevyydestä.

Tulokset

— kunkin ajon ja kunkin rinnakkaismittauksen osalta taulukkomuotoiset tulokset yksittäisistä testikemikaaleista ja kontrolleista (mukaan lukien yksittäiset tulokset, keskiarvot ja keskihajonnat)

— tulosten perusteella tehty luokitus (tehdyt luokitukset) ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekokriteereistä

— kuvaus muista havaituista vaikutuksista.

▼**M7**

Tulosten tarkastelu

— Tulosten tarkastelussa pitäisi käsitellä myös näkökohtia, jotka liittyvät siihen, ettei vakuuttavaa tulosta ole saatu (kohta 35: FL_{20} > 100 mg/ml), sekä lisätestaukseen.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) EC-ECVAM (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In vitro* 24, 1-9

(5) Tässä liitteessä oleva B.5 luku, Akuutti silmän ärsyttävyys/syövyttävyys

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Saatavilla osoitteessaSaatavilla osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

(7) EC-ECVAM (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

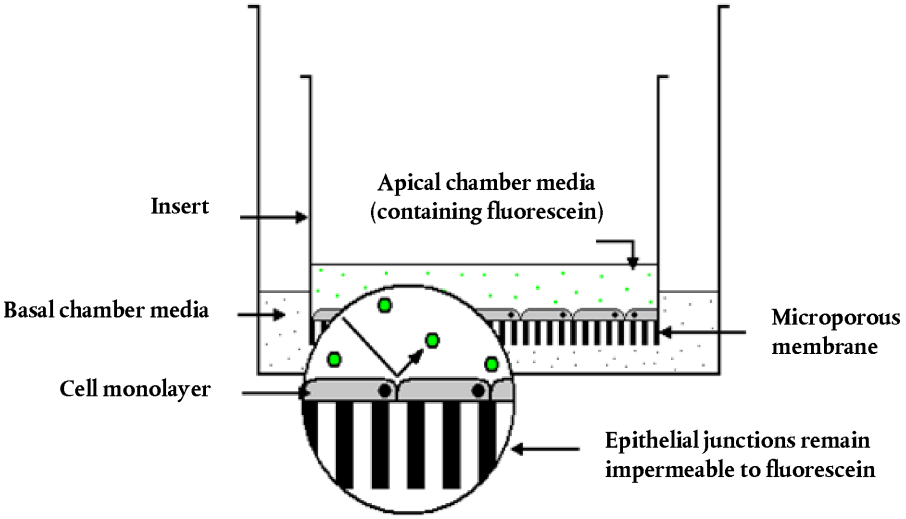
(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

Lisäys 1

KAAVIO INSERTTIKALVOLLA FLUORESEIINIVUOTOTESTIMENETELMÄÄ VARTEN KASVATETUISTA MDCK-SOLUISTA

Insertin puoliläpäisevälle kalvolle kasvatetaan konfluentti MDCK-solukerros. Insertit asetetaan 24-kuoppaisten levyjen kuoppiin.



Kuvan lähde: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

Lisäys 2

MÄÄRITELMÄT

Aine: Tarkoittaa YK:n GHS-järjestelmässä alkuaineita ja niiden yhdisteitä sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin valmistettuina, jotka sisältävät kaikki pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja tuotantotoiminnassa muodostuvat epäpuhtaudet lukuun ottamatta liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

EPA:n luokka 1: Syövyttävä (palautumaton silmäkudoksen tuhoutuminen) tai yli 21 vuorokautta kestävä sarveiskalvoon kohdistuva vaikutus tai ärsytys (2).

EU:n CLP-asetu: (asetus (EY) N:o 1272/2008 aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta): Asetus, jolla kemikaalien (aineiden ja seosten) luokittelua ja merkintöjä koskeva YK:n GHS-järjestelmä saatetaan osaksi Euroopan unionin (EU) lainsäädäntöä.

FL_{20}: Arvioitavissa määrittämällä pitoisuus, jolla testattu kemikaali aiheuttaa 20-prosenttisen fluoreseiinivuodon solukerroksen läpi.

Fluoreseiinivuoto: Spektrofluorometrilla mitattu solukerroksen läpi kulkeneen fluoreseiinin määrä.

GHS (Yhdistyneiden kansakuntien (YK) kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Järjestelmä, jossa ehdotetaan kemikaalien (aineet ja seokset) luokitusta fysikaalisten, terveyteen ja ympäristöön liittyvien vaarojen standardityyppien ja -tasojen mukaisesti ja osoitetaan niille vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien kielteisistä vaikutuksista ihmisten (mukaan luettuina työnantajat, työntekijät, kuljettajat, kuluttajat ja pelastushenkilöstö) ja ympäristön suojelemiseksi.

GHS:n luokka 1: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (8).

Kemikaali: Aine tai aineiden seos.

Korvaava testi: Testi, jolla voidaan korvata testi, joka on säännöllisesti käytössä ja joka on hyväksytty vaarallisuuden määrittämiseen ja/tai riskien arviointiin, ja jonka on osoitettu antavan ihmisten tai eläinten terveyden tai tarvittaessa ympäristön kannalta vastaavan tai korkeamman suojelutason hyväksyttyyn testiin verrattuna kaikissa mahdollisissa testaustilanteissa ja kaikkien kemikaalien yhteydessä.

Liuotin-/kantajakontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, mukaan luettuina liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti negatiivisen kontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Luokittelematon: Kemikaali, jota ei ole luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1, 2A tai 2B, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 1 tai 2 tai Yhdysvaltojen EPA:n luokkaan I, II, tai III kuuluvaksi silmää ärsyttäväksi aineeksi.

▼M7

Luotettavuus: Laajuus, jolla testimenetelmä on toistettavissa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa pidemmällä aikavälillä käytettäessä samaa menettelyä. Arvo määritetään laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus ja laboratorionsisäinen toistettavuus.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (8).

Negatiivinen kontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Negatiivinen kontrolli prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty kemikaalilla, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Positiivinen vaste ei saisi olla äärimmäinen, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelua ajan funktiona voidaan arvioida.

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut kemikaalit: Vertailukemikaalien listalla oleva alaryhmä, jonka avulla kokematon laboratorio voi osoittaa pätevyytensä validoidun vertailutestimenetelmän käyttöön.

Seos: YK:n GHS-järjestelmän yhteydessä tarkoitettu seos tai liuos, joka muodostuu kahdesta tai useammasta keskenään reagoimattomasta aineesta.

Silmää syövyttävä aine: (a) Aine, joka aiheuttaa silmään palautumatonta kudosvauriota. (b) Kemikaali, joka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 1 tai Yhdysvaltojen EPA:n luokkaan I kuuluvaksi silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Silmää vakavasti ärsyttävä aine: (a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmän etupinnalle annosteltuna kudosvauriota, joka ei korjaudu 21 päivän kuluessa annostelusta tai joka aiheuttaa näkökyvyn vakavaa fyysistä rappiota. (b) Kemikaali, joka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 1, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 1 tai Yhdysvaltojen EPA:n luokkaan I kuuluvaksi silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Silmää ärsyttävä aine: (a) Kemikaali, joka aiheuttaa silmään palautuvan muutoksen, kun sitä on annosteltu silmän etupinnalle; (b) Kemikaali, joka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 2A tai 2B, EU:n CLP-asetuksen luokkaan 2 tai Yhdysvaltojen EPA:n luokkaan II tai III kuuluvaksi silmää ärsyttäväksi aineeksi.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta, ja se on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä.

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Se on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osa-alueista. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta.

Testikemikaali: Tällä testimenetelmällä testattu aine tai seos.

Todistusnäyttö: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus päättää kemikaalin vaarallisuutta koskevasta päätelmästä tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

Vaara: Vaikuttavan tekijän (”agentin”) tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Vaiheittainen testausstrategia: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen todistusnäyttöprosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko

▼M7

käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin ärsytyskyky voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, ei lisätestausta tarvita. Jos testikemikaali ärsytyskykyä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määritellä aukottomasti.

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvaurio tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka on seurausta testikemikaalin annostelusta silmän etupinnalle eikä korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta.

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, jolle on tehty validointitutkimukset sen merkityksellisyyden (myös tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyä tarkoitusta varten. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (8).

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Niiden positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Niiden negatiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on eräs testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

▼M7

Lisäys 3

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT KEMIKAALIT FLUORESEIINIVUOTOTESTIMENETELMÄSSÄ

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tähän testimenetelmään perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, sen pitäisi osoittaa tekninen pätevyytensä määrittämällä oikein taulukossa 1 suositeltujen kahdeksan aineen silmäsyövyttävyysluokitus. Nämä kemikaalit on valittu siten, että ne edustavat kattavasti erilaisia vasteita silmän paikalliselle ärsytykselle/syövytykselle, ja nämä puolestaan perustuvat kanin silmällä tehtyyn *in vivo* -testiin (TG 405, TM B.5(5)) (eli luokat 1, 2A, 2B tai ei luokitusta YK:n GSH-järjestelmässä). Fluoreseiinivuotokokeen validoidun käyttökelpoisuuden kannalta (eli vain silmää syövyttävien / vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistaminen) pätevyyden osoittamiseksi tarkoitettuun luokitukseen sopivia testituloksia on vain kaksi (syövyttävä / vakavasti ärsyttävä tai ei-syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä). Muita valintakriteerejä olivat se, että kemikaaleja on kaupallisesti saatavana, se, että saatavana on laadukkaita *in vivo* -vertailutietoja, ja se, että fluoreseiinitestimenetelmästä on laadukasta tietoa. Tästä syystä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut kemikaalit valittiin asiakirjasta ”Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing” (8), jota käytettiin fluoreseiinivuototestimenetelmän takautuvaan validointiin.

Taulukko 1

Suositellut kemikaalit FL-menetelmän teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Kemikaali	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto:	*In vivo* -luokitus ([2])	*In vitro* -luokitus ([3])
Bentsalkoniumkloridi (5 %)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Nestemäinen	Luokka 1	Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä
Prometatsiinihydrokloridi	58-33-3	Amiini/amidiini, heterosyklinen, orgaaninen rikkiyhdiste	Kiinteä	Luokka 1	Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä
Natriumhydroksidi (10 %)	1310-73-2	Emäs	Nestemäinen	Luokka 1	Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä
Natriumlauryylisulfaatti (15 %)	151-21-3	Karboksyylihappo (suola)	Nestemäinen	Luokka 1	Syövyttävä / vakavasti ärsyttävä
4-karboksibentsaldehydi	619-66-9	Karboksyylihappo, aldehydi	Kiinteä	Luokka 2(A)	Ei syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä
Ammoniumnitraatti	6484-52-2	Epäorgaaninen suola	Kiinteä	Luokka 2(A)	Ei syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä
Etyyli-2-metyyliasetoasetaatti	609-14-3	Ketoni, esteri	Nestemäinen	Luokka 2(B)	Ei syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä
Glyseroli	56-81-5	Alkoholi	Nestemäinen	Ei luokitusta	Ei syövyttävä / ei vakavasti ärsyttävä

Lyhenteet: CAS-numero = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

([1]) Kunkin testikemikaalin kemiallinen luokka määritettiin National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) -luokitusjärjestelmään (saatavilla osoitteessa http//www.nlm.nih.gov/mesh) perustuvan tavanomaisen luokitusjärjestelmän perusteella.

([2]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu kanin silmällä tehdyllä *in vivo* -testillä (OECD TG 405, TM B.5) käyttäen YK:n GHS-järjestelmää ja EU:n CLP-asetusta.

([3]) Perustuu fluoreseiinivuotomenetelmällä saatuihin tuloksiin (INVITTOX-protokolla nro 71(6)).

▼M7

B.62. NISÄKKÄIDEN EMÄKSINEN *IN VIVO* -KOMEETTAKOE

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 489 (2016). Emäksistä *in vivo* -komeettakoetta (”Comet-koe”, jäljempänä ”komeettakoe”, eli yhden solun geelielektroforeesi) käytetään DNA-säikeen katkeamien havaitsemiseen soluissa tai tumissa, jotka on eristetty potentiaalisesti genotoksiselle materiaalille / genotoksisille materiaaleille altistettujen eläinten, useimmiten jyrsijöiden, erilaisista kudoksista. Monet asiantuntijaryhmät ovat arvioineet komeettakoetta ja julkaisseet suosituksia (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Tämä testimenetelmä kuuluu geneettisen toksikologian testimenetelmiin. On laadittu OECD:n asiakirja, jossa ytimekkäitä tietoja geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsaus näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin (1).

Komeettakokeen tarkoituksena on tunnistaa DNA-vaurioita aiheuttavia kemikaaleja. Komeettakokeella voidaan havaita emäksisissä olosuhteissa (pH > 13) yhden ja kahden säikeen katkeamia, jotka johtuvat esimerkiksi suorasta vuorovaikutuksesta DNA:n kanssa, emäksen labiileista kohdista tai DNA:n korjauksesta johtuvista väliaikaisista DNA-säikeen katkeamista. Nämä säikeiden katkeamat voivat korjaantua ilman pysyviä vaikutuksia, ne voivat johtaa solun kuolemaan tai ne voivat korjaantua mutaatiossa, joka johtaa pysyvään elinkykyiseen muutokseen. Ne voivat myös johtaa kromosomimuutokseen, joka yhteydessä myös moniin ihmisen sairauksiin, kuten syöpään.

Jyrsijöiden *in vivo* -komeettakokeen muodollinen validointikoe tehtiin 2006–2012, ja sitä koordinoi JaCVAM (Japanin vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus) yhdessä ECVAM:n (vaihtoehtoisten menetelmien eurooppalaisen validointikeskuksen), ICCVAM:n (vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälisen koordinointikomitean) ja NICEATM:n (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) kanssa (12). Testimenetelmän kuvaus sisältää komeettakokeen käyttöä koskevat suositukset ja rajoitukset ja perustuu validointikokeessa käytettyyn lopulliseen protokollaan (12) sekä muihin olennaisiin julkaistuihin ja julkaisemattomiin (laboratorioiden tekijänoikeuksien alaisiin) tietoihin.

Keskeisten termien määritelmät esitetään lisäyksessä 1. Todettakoon, että tässä kokeessa voidaan käyttää monenlaisia alustoja (mikroskoopin näytelaseja, geelipisaroita, 96-kuoppaisia levyjä jne.) Käytännöllisyyden vuoksi koko tekstissä käytetään jäljempänä ilmaisua ”näytelasi”, mutta sillä tarkoitetaan myös kaikkia muita alustoja.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

Komeettakoe on menetelmä, jolla mitataan DNA-säikeen katkeamia eukaryoottisoluissa. Agaroosiin upotetuille yksittäisille soluille/tumille tehdään lyysis, jossa käytetään puhdistusainetta ja jossa suolapitoisuus on korkea. Lyysisvaiheessa solun ja tuman kalvot sulavat, mikä mahdollistaa kierteisten DNA-ketjujen vapautumisen; näitä kutsutaan yleisesti nukleoideiksi ja DNA-fragmenteiksi. Kun elektroforeesi tehdään korkeassa pH:ssa, syntyy komeettaa muistuttavia rakenteita, jotka voidaan havaita voidaan havaita fluoresenssimikroskoopilla, käyttämällä sopivia fluoresoivia väriaineita; DNA-fragmentit siirtyvät niiden koosta riippuen komeetan ”ytimestä” sen ”pyrstöön”, ja se, kuinka suuri komeetan pyrstö on suhteessa koko komeetan kokoon (ydin ja pyrstö), kertoo DNA:n hajoamisen asteesta (13) (14) (15).

Emäksinen *in vivo* -komeettakoe soveltuu erityisen hyvin genotoksisen vaaran arviointiin, sillä kokeessa vasteet riippuvat ADME-prosessista *in vivo* (*absorption*, *distribution*, *metabolism* and *excretion* eli absorptio, leviäminen, metabolismi ja eritys) ja myös DNA:n korjaantumisprosesseista. Nämä voivat vaihdella lajien, kudosten ja DNA-vaurion tyypin mukaan.

▼M7

Eläinten hyvinvointia ja erityisesti eläinten käytön vähentämistä koskevien vaatimusten täyttämiseksi (noudattaen 3R-periaatetta – *replacement, reduction, refinement* eli korvaaminen, vähentäminen ja parantaminen) tämä koe voidaan yhdistää myös muihin toksikologisiin tutkimuksiin, esimerkiksi toistuvan annoksen toksisuutta koskeviin tutkimuksiin (10) (16) (17), tai päätetapahtuma voidaan yhdistää muihin genotoksisuuden päätetapahtumiin, esimerkkinä nisäkkäiden erytrosyyttimikrotumatesti *in vivo* (18) (19) (20). Komeettakokeessa käytetään useimmiten jyrsijöitä, joskin siihen on käytetty myös muita eläinlajeja, nisäkkäitä ja muita kuin nisäkkäitä. Muiden lajien kuin jyrsijöiden käyttö on perusteltava tieteellisesti ja eettisesti tapauskohtaisesti, ja vahvana suosituksena on, että komeettakokeessa käytetään muita lajeja kuin jyrsijöitä vain, jos koetta ei tehdä ainoana kokeena vaan se tehdään osana toista toksisuuskoetta.

Altistamisreittiä ja tutkittavaa altistettavaa kudosta / tutkittavia altistettavia kudoksia valittaessa päätöksenteon tulisi perustua kaikkeen saatavana/olemassa olevaan tietoon testikemikaaleista; tällaisia tietoja ovat esimerkiksi ihmisen suunniteltu/odotettava altistumisreitti, metabolismi ja leviäminen, potentiaaliset vaikutukset kosketuspaikassa, hälyttävät rakenteelliset seikat, muut genotoksisuus- tai toksisuustiedot sekä tutkimuksen tarkoitus. Siispä testikemikaalien genotoksisuuspotentiaalia voidaan arvioida soveltuvin osin kohdekudoksessa/-kudoksissa ilmenevien karsinogeenisten ja/tai muiden toksisten vaikutusten perusteella. Koetta pidetään hyödyllisenä myös *in vitro* -koejärjestelmässä havaitun mutageenisen vaikutuksen jatkotutkimuksena. Tutkimuksen kohteena olevalle kudokselle on sopivaa tehdä *in vivo* -komeettakoe, kun voidaan kohtuudella odottaa, että tutkimuksen kohteena oleva kudos on asianmukaisen altistuksen kohteena.

Kattavin validointi kokeelle on tehty käyttämällä urosrottien somaattisia kudoksia yhteistyötutkimuksissa, esimerkiksi JaCVAM (12) ja Rothfuss *et al.*, 2010 (10). JaCVAMin kansainvälisessä validointitutkimuksessa käytetiin maksaa ja mahalaukkua. Maksaa käytettiin siksi, että se on aktiivisin elin kemikaalien metabolismissa ja usein myös karsinogeenisten vaikutusten kohteena. Mahalaukkua käytettiin siksi, että se on yleensä ensimmäinen elin, jonka kanssa kemikaalit päätyvät kosketuksiin suun kautta tapahtuvan altistuksen jälkeen, joskin ruoansulatuskanavan muut alueet, kuten pohjukaissuoli (duodenum) ja tyhjäsuoli (jejunum), pitäisi myös lukea kemikaalin kanssa kosketuksiin joutuviksi kudoksiksi ja niillä voi olla ihmisten kohdalla olennaisempi merkitys kuin jyrsijän rauhasmahalla. On pidettävä huolta siitä, etteivät nämä kudokset altistu liian suurille testikemikaalipitoisuuksille (21). Menetelmää voidaan periaatteessa soveltaa mihin tahansa kudokseen, josta saadaan analysoitavia yhden solun/tuman suspensioita. Monien laboratorioiden tekijänoikeuksien alaiset tiedot osoittavat, että menetelmää voidaan soveltaa onnistuneesti moniin eri kudoksiin, ja monet julkaisut osoittavat, että menetelmää voidaan soveltaa muihin elimiin tai kudoksiin kuin maksaan ja mahalaukkuun, kuten tyhjäsuoleen (22), munuaiseen (23) (24), ihoon (25) (26) tai virtsarakkoon (27) (28), keuhkoihin ja bronkoalveolaarisiin lavaatiosoluihin (olennaista tutkimuksissa, joissa tutkitaan sisäänhengitettyjä kemikaaleja) (29) (30), ja lisäksi on tehty testejä, joissa on käytetty monia elimiä (31) (32).

Vaikka sukusoluihin kohdistuvat genotoksiset vaikutukset saattavatkin olla kiinnostavia, on huomattava, ettei tässä testimenetelmässä kuvattua vakiomuotoista emäksistä komeettakoetta pidetä sopivana keinona mitata DNA-säikeiden katkeamista kypsissä sukusoluissa. Koska kirjallisuuskatsauksessa komeettakokeen käytöstä sukusoluihin kohdistuvan genotoksisuuden tutkimiseen todettiin DNA-vaurioiden olevan lähtötilanteessa korkeita ja vaihtelevia (33), on välttämätöntä tehdä muutoksia protokollaan ja parantaa standardointia ja validointitutkimuksia, ennen kuin testimenetelmään voidaan sisällyttää kypsille sukusoluille (kuten siittiöille) tehtävä komeettakoe. Myöskään tämän testimenetelmän mukainen suositeltu altistusohjelma ei ole optimaalinen, ja mielekkään analyysin tekeminen DNA-säikeiden katkeamista kypsissä siittiöissä edellyttäisi pidempiä altistuksia ja näytteenottoaikoja. Komeettakokeella mitattuja genotoksisia vaikutuksia kiveksen soluissa erilaistumisen eri vaiheissa on kuvattu kirjallisuudessa (34) (35). On kuitenkin huomattava, että gonadeissa on seos somaattisia soluja ja sukusoluja. Tästä syystä positiiviset tulokset koko gonadissa (kiveksessä) eivät välttämättä kerro sukusoluille aiheutuneista vaurioista, mutta ne kertovat kuitenkin sen, että testikemikaali(t) ja/tai sen/niiden metaboliitit ovat päätyneet gonadiin asti.

▼M7

Komeettakokeen vakiokoeolosuhteissa ei voida havaita luotettavasti ristisidoksia. Tietyissä muutetuissa koeolosuhteissa voidaan mahdollisesti havaita DNA–DNA- ja DNA–proteiini-ristisidoksia sekä muita emäsmuutoksia, kuten emäksen hapettumista (23) (36) (37) (38) (39). Tarvittavien protokollamuutosten asianmukainen luonnehtiminen edellyttäisi kuitenkin lisätyötä. Siksi ristisidoksia muodostavien aineiden havaitseminen ei ole tässä kuvatun kokeen päätarkoitus. Koe ei sovellu edes muutettuna aneugeenien havaitsemiseen.

Tämänhetkisen tietotason vuoksi *in vivo* -komeettakokeeseen liittyy useita lisärajoituksia (ks. lisäys 3). Odotuksena on, että testimenetelmää arvioidaan tulevaisuudessa ja tarkistetaan tarvittaessa saatujen kokemusten valossa.

Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

MENETELMÄN PERIAATE

Eläimet altistetaan testikemikaalille sopivaa antotapaa käyttäen. Annostelu ja näytteenotto kuvataan yksityiskohtaisesti kohdissa 36–40. Valitulla näytteenottohetkellä / valituilla näytteenottohetkillä tutkimuksen kohteena olevat kudokset leikataan, yhden solun/tuman suspensiot valmistetaan ja ne upotetaan näytelasille pehmeään agariin. Solun ja/tai tuman kalvo poistetaan käsittelemällä soluja/tumia lyysispuskurilla ja ne altistetaan vahvalle emäkselle (esimerkiksi pH $\geq$ 13), jotta DNA purkautuu ja irronneet DNA-ketjut ja -fragmentit vapautuvat. Tämän jälkeen agarissa olevalle tuman DNA:lle tehdään elektroforeesi. Normaalit fragmentoitumattomat DNA-molekyylit jäävät paikoilleen sinne, missä tuman DNA on agarissa, kun taas fragmentoitunut DNA ja irtonaiset DNA-ketjut liikkuvat kohti anodia. Elektroforeesin jälkeen DNA:ta tarkastellaan käyttämällä sopivaa fluoresoivaa väriainetta. Valmisteet analysoidaan käyttämällä mikroskooppia sekä täysin automatisoitua tai puoliautomaattista kuvananalysointijärjestelmää. Se, kuinka paljon ja kuinka kauas DNA:ta on liikkunut elektroforeesin aikana, kertoo DNA-fragmenttien määrästä ja koosta. Komeettakokeessa on useita päätetapahtumia. Suosituksena on, että DNA-vaurioita arvioidaan pyrstön DNA-pitoisuuden perusteella (pyrstön DNA- % eli %:a pyrstön koosta) (12) (40) (41) (42). Kun tumia on analysoitu riittävä määrä, tiedot analysoidaan sopivilla menetelmillä koetulosten arviointia varten.

On huomattava, että menetelmän eri näkökohtien muuttamista – kuten näytteen valmistelun, elektroforeesin olosuhteiden ja silmämääräisen analyysin muuttujien /(esimerkiksi väriaineen voimakkuuden, mikroskoopin valon voimakkuuden, mikroskoopin suotimien käytön ja kameran dynamiikan) muuttamista – on tutkittu ja niiden on todettu voivan vaikuttaa DNA:n kulkeutumiseen (43) (44) (45) (46).

LABORATORIOIDEN PÄTEVYYDEN VARMISTAMINEN

Kunkin laboratorion pitäisi osoittaa koemenetelmän käyttöä koskeva pätevyytensä osoittamalla kykynsä tuottaa riittävän laadukkaita yhden solun tai tuman suspensioita kunkin tutkitun lajin tutkimuksen kohteena olevasta kudoksesta / olevista kudoksista. Valmisteiden laatua arvioidaan ennen kaikkea sen perusteella, onko kantaja-aineella käsitellyistä eläimistä saadun pyrstön DNA-pitoisuus (%) toistettavissa olevalla alhaisella vaihteluvälillä. Nykyisten tietojen perusteella rotan maksasta saatu keskimääräinen ryhmän pyrstön DNA-pitoisuus (%) (joka perustuu mediaanien keskiarvoon – ks. asiaa koskevat tarkemmat tiedot kohdasta 57) ei saa mielellään olla yli 6 prosenttia, mikä olisi linjassa JaCVAMin validointitutkimuksen (12) arvojen sekä muiden julkaistujen tietojen ja tekijänoikeuksien alaisten tietojen kanssa. Tällä hetkellä tietoja ei ole tarpeeksi, jotta muiden kudosten osalta voitaisiin antaa suosituksia optimaalisista tai hyväksyttävistä

▼M7

vaihteluväleistä. Tämä ei silti estä käyttämästä muita kudoksia, jos se on perusteltua. Testiraportissa pitäisi esittää asianmukainen arvio komeettakokeen suorituskyvystä näiden kudosten osalta suhteessa julkaistuun kirjallisuuteen tai tekijänoikeuksien alaisiin tietoihin. Ensinnäkin on suotavaa, että kontrolleissa pyrstön DNA-pitoisuuden (%) vaihteluväli on alhainen, jotta vaihteluväli on riittävän dynaaminen positiivisen vaikutuksen havaitsemiseksi. Toiseksi kunkin laboratorion pitäisi kyetä toistamaan odotetut vasteet suorien mutageenien ja pro-mutageenien osalta eri toimintatavoilla taulukon 1 mukaisesti (kohta 29).

Positiivisia aineita voidaan valita tarvittaessa esimerkiksi JaCVAMin validointikokeesta (12) tai muista julkaistuista tiedoista (ks. 9 kohta) esittäen perustelut ja osoittamalla selvät positiiviset vasteet kiinnostuksen kohteena olevissa kudoksissa. Lisäksi pitäisi osoittaa kyky havaita tunnettujen mutageenien, kuten EMS:n, heikkoja vaikutuksia pienillä annoksilla, esimerkiksi vahvistamalla annos-vastesuhde sopivalla määrällä annoksia ja sopivilla annosväleillä. Ensitoimissa pitäisi keskittyä pätevyyden osoittamiseen yleisimmin käytettyjen kudosten, kuten jyrsijän maksan osalta, sillä vertaaminen olemassa oleviin tietoihin ja odotettavissa oleviin tuloksiin on mahdollista (12). Muista kudoksista, kuten vatsalaukusta, pohjukaissuolesta, tyhjäsuolesta, verestä jne., voidaan kerätä tiedot samaan aikaan. Laboratorion on osoitettava pätevyytensä kunkin tutkittavan lajin kunkin yksittäisen tutkittavan kudoksen osalta sekä se, että kyseisissä kudoksissa voidaan saada aikaan tunnetulla mutageenilla (kuten EMS:llä) hyväksyttävä positiivinen vaste.

Kantaja-aineen / negatiivisen kontrollin tiedot pitäisi kerätä, jotta voidaan osoittaa negatiivisten datavasteiden toistettavuus, varmistaa kokeen teknisten näkökohtien asianmukainen valvonta ja tuoda esiin tarve määrittää aikaisemmat kontrollien vaihteluvälit uudelleen (ks. 22 kohta).

On huomattava, että vaikka ruumiinavauksessa voidaan kerätä useita kudoksia ja prosessoida niitä komeettakoetta varten, laboratorion on oltava pätevä keräämään useita kudoksia samalta eläimeltä, jotta voidaan varmistaa, ettei mahdollista DNA-vaurioita menetetä eikä komeettakoe vaarannu. Ajalla, joka kuluu lopettamisesta prosessoitavien kudosten poistamiseen, saattaa olla ratkaiseva merkitys (ks. 44 kohta).

Hankittaessa pätevyyttä tämän testin käyttöön on otettava huomioon eläinten hyvinvointi, ja siksi muissa testeissä käytettyjä eläinperäisiä kudoksia voidaan käyttää tämän testin eri näkökohtiin liittyvän osaamisen kartuttamiseen. Lisäksi laboratorion ottaessa käyttöön uutta testimenetelmää prosessin eri vaiheissa ei välttämättä ole tarpeen tehdä kattavaa tutkimusta, ja tarvittavia taitoja hankittaessa voidaan käyttää pienempää määrää eläimiä tai testipitoisuuksia.

Aiemmat kontrollitiedot

Pätevyystutkimusten aikana laboratorion pitäisi luoda aiempia tietoja sisältävä tietokanta määrittääkseen positiivisten ja negatiivisten kontrollien vaihteluvälit ja jakaumat tiettyjen kudosten ja lajien osalta. Suosituksia tällaisen tietokannan luomisesta ja käytöstä (eli perusteet, joiden perusteella tietoja valitaan mukaan aiempiin tietoihin tai ei valita, sekä hyväksyttävyysperusteet tietyn kokeen osalta) annetaan kirjallisuudessa (47). Erilaiset kudokset ja eri lajit sekä eri kantajat ja annostelureitit voivat johtaa erilaisiin negatiivisiin vertailuarvoihin pyrstön DNA-pitoisuuden (%) osalta. Siksi negatiivisen kontrollin vaihteluvälit on tärkeää määrittää kunkin kudoksen ja lajin osalta. Laboratorioiden pitäisi määrittää käyttämällä laadunvalvontamenetelmiä, kuten kontrollikaavioita (esimerkiksi C-kaavioita tai X-pylväskaavioita (48)), minkä verran niiden tiedoissa on vaihtelua,

▼M7

sekä osoittaa valvovansa menetelmää. Lisäksi heikkojen vaikutusten havaitsemiseksi (ks. 17 kohta) saattaa olla tarpeen optimoida sopivien positiivisten kontrolliaineiden, annosten vaihteluvälien ja koeolosuhteiden (esimerkiksi elektroforeesiolosuhteet) valintaa.

Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon järjestelyn yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aikaisempia kontrolleja koskevan tietokannan kanssa.. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aikaisempien kontrollien tietokanta.

MENETELMÄN KUVAUS

Valmistelut

Eläinlajin valinta

Kokeessa käytetään normaalisti yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia terveitä nuoria täysikasvuisia jyrsijöitä (jotka ovat käsittelyn alussa 6–10 viikon ikäisiä, joskin hieman vanhemmatkin eläimet voidaan hyväksyä). Jyrsijälajia valittaessa päätöksen pitäisi perustua (i) lajeihin, joita on käytetty muissa toksisuustutkimuksissa (tietojen korreloinnin ja integroitujen tutkimusten mahdollistamiseksi), (ii) lajeihin, joille on kehittynyt kasvaimia jossakin karsinogeenisyystutkimuksessa (tutkittaessa karsinogeneesin mekanismia), tai (iii) lajeihin, joiden metabolismi on ihmisten kannalta merkityksellisin, jos se tunnetaan. Testissä käytetään yleensä rottia. Muiden lajien käyttö on kuitenkin myös mahdollista, jos se on eettisesti ja tieteellisesti perusteltua.

Koe-eläintilat ja eläinten ruokinta

Koe-eläintilan ihanteellinen lämpötila on jyrsijöille 22 °C (± 3 °C). Suhteellisen kosteuden pitäisi olla ihanteellisesti 50–60 prosenttia, vähintään kuitenkin 30 prosenttia ja mieluiten enintään 70 prosenttia muulloin kuin tilan siivouksen yhteydessä. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Samaa sukupuolta olevat jyrsijät olisi pidettävä häkeissä pienissä ryhmissä (yleensä enintään viisi), jos minkäänlaista aggressiivista käytöstä ei ole odotettavissa. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin vain, jos tämä on tieteellisesti perusteltua. Lattian pitäisi olla tasainen, jos se vain on mahdollista, sillä verkkolattia voi aiheuttaa vakavia vammoja (49). Eläimille on järjestettävä sopivia virikkeitä.

Eläinten valmistelu

Eläimet jaetaan verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen käsittelyn aloittamista. Eläinten yksilöllisessä merkinnässä on käytettävä vähiten kajoavaa menetelmää. Sopivia menetelmiä ovat muun muassa rengastaminen, merkin kiinnittäminen, mikrosirun asettaminen ja biometrinen tunnistaminen. Varpaiden tai korvien leikkaaminen ei ole tieteellisesti perusteltua näissä testeissä. Häkit tulee järjestää siten, että niiden sijoittamisesta mahdollisesti aiheutuvat vaikutukset minimoituvat. Tutkimuksen alussa eläinten painon vaihtelun pitäisi olla mahdollisimman vähäistä, alle ± 20 prosenttia.

Annosten valmistelu

Kiinteät testattavat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin kantajiin tai lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testattavat kemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitystien kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista riippuen (50) (51).

Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä ja asianmukaiset säilytysolosuhteet on määritetty.

▼M7

Testiolosuhteet

Kantaja

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla toksisia vaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista testikemikaalin kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava tutkimustuloksilla, jotka osoittavat niiden yhteensopivuuden testieläinten, annostelutavan ja päätetapahtuman kanssa. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. On huomattava, että jotkin kantajat (erityisesti viskoosiset kantaja-aineet) voivat aiheuttaa tulehdusta ja lisätä DNA-säikeiden katkoksien taustatasoa kosketuskohdassa, erityisesti jos annostelukertoja on useita.

Kontrollit

Positiiviset kontrollit

Tässä yhteydessä kussakin testissä pitäisi normaalisti olla mukana positiivisella kontrolliaineella käsitelty ryhmä, joka muodostuu vähintään kolmesta analysoitavasta eläimestä, jotka edustavat samaa sukupuolta tai kumpaakin sukupuolta, jos kumpaakin sukupuolta käytetään (ks. 32 kohta). Tulevaisuudessa positiivisten kontrollien tarvetta voidaan mahdollisesti vähentää osoittamalla riittävä pätevyys. Jos näytteenottoajankohtia on useita (esimerkiksi testiprotokollassa, jossa annostelukertoja on yksi), positiiviset kontrollit otetaan mukaan vain yhteen näytteenottoajankohtaan, mutta tasapaino kokeen suunnittelussa on turvattava (ks. 48 kohta). Samanaikaisia positiivisia kontrolliaineita ei tarvitse antaa samaa reittiä kuin testikemikaalia, vaikka onkin tärkeää, että samaa reittiä käytetään mitattaessa vaikutuksia kosketuskohdassa. Positiivisten kontrolliaineiden pitäisi osoittaa katkovan DNA-säikeitä kaikissa testikemikaalin kannalta kiinnostavissa kudoksissa, ja EMS sopii todennäköisesti positiiviseksi kontrolliksi, sillä se on katkonut DNA-säikeitä kaikissa tutkituissa kudoksissa. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava niin, että niillä saadaan aikaan kohtalaiset vaikutukset, joiden perusteella voidaan arvioida kriittisesti kokeen suorituskykyä ja herkkyyttä, ja ne voivat perustua annos-vastekäyriin, jotka laboratorio on määrittänyt pätevyyden osoittamisen aikana. Samanaikaisesti positiivisella kontrollilla käsitellyistä eläimistä saadun pyrstön DNA-pitoisuuden (%) pitäisi vastata vaihteluväliä, jonka laboratorio on vahvistanut ennalta kyseisen lajin kunkin yksittäisen kudoksen ja näytteenottoajankohdan osalta (ks. 16 kohta). Taulukko 1 sisältää esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista ja muutamista niiden kohdekudoksista (jyrsijöillä). Muita kuin taulukossa 1 mainittuja aineita voidaan valita, jos se on tieteellisesti perusteltua.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisista kontrollikemikaaleista ja muutamista niiden kohdekudoksista

Aineet ja CAS RN -nro
Etyylimetaanisulfonaatti (CAS RN 62-50-0), mikä tahansa kudos
Ethyylinitrosourea (CAS RN 759-73-9), maksa ja mahalaukku, pohjukaissuoli tai tyhjäsuoli
Metyylimetaanisulfonaatti (CAS RN 66-27-3), maksa, mahalaukku, pohjukaissuoli tai tyhjäsuoli, keuhko ja bronkoalveolaariset lavaatiosolut (BAL), munuainen, virtsarakko, keuhko, kives ja luuydin/veri
N-metyyli-N′-nitro-N-nitrosoguanidiini (CAS RN 70-25-7), mahalaukku, pohjukaissuoli tai tyhjäsuoli
1,2-dimetyylihydratsiini 2HCl (CAS RN 306-37-6), maksa ja suolisto
N-metyyli-*N*-nitrosourea (CAS RN 684-93-5), maksa, luuydin, veri, munuainen, mahalaukku, tyhjäsuoli ja aivot

▼M7

Negatiiviset kontrollit

Kussakin testissä pitäisi olla kunakin näytteenottoajankohtana ja kunkin kudoksen osalta mukana negatiivisten kontrollieläinten ryhmä, joka käsitellään pelkällä kantaja-aineella mutta jota muutoin käsitellään samalla tavalla kuin muita tutkittavia ryhmiä. Negatiivisista kontrollieläimistä saadun pyrstön DNA-pitoisuuden (%) pitäisi vastata taustapitoisuuden vaihteluväliä, jonka laboratorio on vahvistanut ennalta kyseisen lajin kunkin yksittäisen kudoksen ja näytteenottoajankohdan osalta (ks. 16 kohta). Ellei olemassa ole aiempia tai julkaistuja kontrollitietoja, jotka osoittaisivat, että valittu kantaja-aine, annosten määrä tai annostelureitti ei aiheuta deleetetioita tai genotoksisia vaikutuksia, ennen koko tutkimuksen tekemistä pitäisi tehdä alustavia tutkimuksia, joilla määritetään kantajakontrollin hyväksyttävyys.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

Vaikka saatavana onkin varsin vähän naaraisiin liittyviä tietoja, joiden perusteella voitaisiin tehdä komeettakokeeseen liittyviä sukupuolten välisiä vertailuja, muut *in vivo* -genotoksisuusvasteet ovat yleensä naarailla ja uroksilla samankaltaisia, minkä vuoksi useimmat tutkimukset voitaisiin tehdä kummalle sukupuolelle tahansa. Tiedot, jotka osoittavat naaraiden ja urosten välillä olevan olennaisia eroja (esimerkiksi eroja, jotka liittyvät systeemiseen toksisuuteen, metabolismiin, biologiseen hyötyosuuteen jne., mukaan lukien esimerkiksi raja-annostutkimus) kannustavat molempien sukupuolten käyttöön. Tässä tapauksessa saattaa olla sopivaa tehdä tutkimus molemmilla sukupuolilla esimerkiksi osana toistuvan annostelun toksisuustutkimusta. Molempia sukupuolia käytettäessä saattaa olla sopivaa tehdä yhdistelykoe. Tarkempia tietoja siitä, miten tietoja yhdistelykokeessa analysoidaan, annetaan lisäyksessä 2.

Tutkimuksen alussa (ja pätevyyden osoittamisen aikana) ryhmien koot pitäisi valita niin, että yhdessä ryhmässä on vähintään viisi yhtä sukupuolta edustavaa eläintä – tai molempia sukupuolia käytettäessä vähintään viisi kumpaakin sukupuolta edustavaa eläintä (ja samanaikaisessa positiivisessa kontrolliryhmässä vähemmän; ks. 29 kohta). Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemikaalille voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta käyttäen. Eläinten tyypillistä enimmäismäärää koskeviin vaatimuksiin liittyvänä ohjeena todettakoon, että kohdan 33 mukaisesti tehtävä tutkimus, jossa käytetään kolmea annosryhmää ja samanaikaisesti negatiivista ja positiivista kontrollia (kussakin ryhmässä viisi samaa sukupuolta edustavaa eläintä), vaatisi 25–35 eläintä.

ALTISTUSOHJELMA

Eläimiä pitäisi käsitellä päivittäin vähintään kahden päivän ajan (eli vähintään kahdesti noin 24 tunnin välein), ja näytteet pitäisi kerätä kerran 2–6 tunnin kuluttua (eli hetkellä T_{max}) viimeisestä käsittelystä (12). Pitempien altistusohjelmien aikana (esimerkiksi 28 päivän altistus) kerätyt näytteet ovat hyväksyttäviä. Komeettakokeen ja erytrosyyttimikrotumatestin yhdistämisen on osoitettu onnistuneen (10) (19). Komeettakokeen kudosnäytteiden ottamiseen liittyvää logistiikkaa sekä muunlaisten toksikologisten arvioiden näytteenottovaatimuksia on kuitenkin punnittava huolellisesti. Yleiselle toksisuustutkimukselle tyypillinen keruu 24 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta ei sovellu useimpiin tapauksiin (ks. 40 kohta näytteenottoajasta). Muiden käsittely- ja näytteenottoaikataulujen käyttö on perusteltava (ks. lisäys 3). Esimerkiksi kerta-annostelun ja usean näytteenoton käyttö on mahdollista, mutta kerta-annostutkimukseen tarvitaan enemmän eläimiä, koska näytteenottoajankohtia on oltava useita; toisinaan tämä voi kuitenkin olla suotava vaihtoehto, esimerkiksi silloin, kun testikemikaalin toistuva annostelu aiheuttaa liiallista toksisuutta.

▼M7

Testi on hyväksyttävä testitavasta riippumatta, kunhan testikemikaali antaa positiivisen vasteen tai – jos kyse on negatiivisesta tutkimuksesta – kunhan saadaan suoraa tai välillistä näyttöä, joka tukee kiinnostuksen kohteena olevan kudoksen (olevien kudosten) altistumista taikka toksisuutta kudokselle (kudoksille) tai jos raja-annos saavutetaan (ks. 36 kohta).

Testikemikaalit voidaan antaa myös jaettuina annoksina, jolloin käsittelyjä on kaksi samana päivänä enintään 2–3 tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista. Tällöin näytteenotto pitäisi ajoittaa viimeisen annoksen antamisajankohdan perusteella (ks. 40 kohta).

Annostasot

Jos tehdään alustava annoksenmääritystutkimus, koska muista olennaisista tutkimuksista ei ole saatavilla soveltuvia tietoja, jotka auttaisivat annoksen valinnassa, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa ja samaa sukupuolta olevia eläimiä sekä samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää, annoksenmääritystutkimusta koskevien nykyisten lähestymistapojen mukaisesti. Tutkimuksessa pitäisi pyrkiä määrittämään suurin siedetty annos (MTD-arvo) eli annos, joka aiheuttaa lievästi toksisen vaikutuksen suhteessa tutkimusjakson kestoon (esimerkiksi selviä kliinisiä merkkejä, kuten epänormaalia käytöstä tai reagointia, vähäistä painonlaskua tai kohdekudoksen sytotoksisuutta), mutta ei kuolemaa tai merkkejä kivusta, kärsimyksestä tai stressistä, joka edellyttäisi eläimen lopettamista. Kun kyseessä on myrkytön testikemikaali, jonka annosteluaika on vähintään 14 päivää, enimmäisannos (raja-annos) on 1 000 mg/painokilo/päivä. Kun annosteluaika on alle 14 päivää, enimmäisannos (raja-annos) on 2 000 mg/painokilo/päivä. Nämä rajat voivat vaihdella tietyn tyyppisten testikemikaalien kohdalla (esimerkiksi ihmisten lääkkeet), joihin sovelletaan erityisiä sääntöjä.

Annoksenmääritysperusteista voidaan poiketa sellaisten kemikaalien kohdalla, jotka ilmentävät toksikokineettisten ominaisuuksien tyydyttymistä tai aiheuttavat detoksifikaatioprosesseja, jotka voivat puolestaan johtaa altistuksen vähenemiseen pitkäaikaisen annostelun jälkeen. Näitä perusteita pitäisikin arvioida tapauskohtaisesti.

Komeettakokeen akuuteissa ja subakuuteissa versioissa enimmäisannoksen (suurin siedetty annos, suurin käyttökelpoinen annos, enimmäisaltistus tai raja-annos) lisäksi kullekin näytteenottoajalle on valittava ainakin kahdesta ylimääräisestä, sopivin välein annettavasta annoksesta muodostuva alenevan annostason sarja (annosten väli on mieluiten alle 10) annoksesta riippuvan vasteen osoittamiseksi. On suotavaa, että nämä annostasot kattavat vaihteluvälin enimmäisannoksesta annokseen, jolla on vähäinen myrkkyvaikutus tai ei myrkkyvaikutusta lainkaan. Kun kohdekudoksen toksisuus havaitaan kaikilla testatuilla annostasoilla, on suositeltavaa tehdä lisätutkimuksia ei-toksisilla annoksilla (ks. 54–55 kohta). Tutkimukset, joiden tarkoituksena on tutkia kattavammin annos-vastekäyrän muotoa, saattavat edellyttää ylimääräisiä annosryhmiä.

Antotapa

Testin suunnittelussa on otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Siksi altistumisreitti – kuten ruoan, juomaveden tai ihoaltistuksen kautta, ihonalaisesti, suonensisäisesti, suun kautta (letkulla), hengittämällä, intratrakeaalisesti tai implantaation kautta tapahtuva altistuminen – voidaan valita sen mukaan, mikä on perusteltua. Joka tapauksessa reitti pitää valita tavalla, jolla varmistetaan tutkimuksen kohteena olevan kudoksen (olevien kudosten) asianmukainen altistuminen. Intraperitoneaalista injektiota ei yleensä suositella, sillä se ei ole ihmiselle tyypillinen ja merkittävä altistumisreitti, ja sitä pitäisikin käyttää vain, jos sille on erityisiä perusteita (esimerkiksi jotkin positiiviset kontrolliaineet tutkimustarkoituksiin tai jotkin lääkkeet, joita annetaan intraperitoneaalisesti). Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen

▼M7

koon mukaan. Määrä ei saa olla yli 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Tätä suurempien määrien käyttö (jos eläinsuojelulainsäädäntö sen sallii) on perusteltava. Aina kun mahdollista, eri annostasot pitäisi saavuttaa säätämällä valmisteannoksen pitoisuutta niin, että määrä pysyy tasaisena suhteessa kehonpainoon kaikilla annostasoilla.

Näytteenottoaika

Näytteenottoaika on kriittinen muuttuja, sillä se riippuu siitä, missä ajassa kohdekudoksessa saavutetaan testikemikaalin enimmäispitoisuus ja DNA-säikeet katkeavat, mutta nämä katkeamat eivät poistu, korjaannu tai johda solun kuolemaan. Tietyt vauriot, jotka aiheuttavat komeettakokeella havaittavia DNA-säikeiden katkeamia, saattavat olla hyvin lyhytkestoisia ainakin joidenkin *in vitro* -testattujen kemikaalien osalta (52) (53). Siksi tällaisia väliaikaisia DNA-vaurioita epäiltäessä on ryhdyttävä toimenpiteisiin, joilla estetään niiden menettäminen, varmistamalla, että kudosnäytteet kerätään riittävän aikaisin, mahdollisesti jo ennen jäljempänä esitettyjä oletusajankohtia. Optimaalinen näytteenottoaika saattaa (optimaaliset näytteenottoajat saattavat) riippua kemikaalista ja antoreitistä ja johtaa esimerkiksi kudoksen nopeaan altistumiseen, jos annostelu tapahtuu suonensisäisesti tai altistus tapahtuu hengittämällä. Siksi näytteenottoajat pitäisi määrittää kineettisten tietojen pohjalta (esimerkiksi aika (T_{max}), jossa saavutetaan plasman tai kudoksen huippupitoisuus (C_{max}) tai monen annoksen tapauksessa vakaa tila), jos sellaisia on saatavana. Ellei kineettisiä tietoja ole saatavana, sopiva kompromissiratkaisu genotoksisuuden mittaamisen kannalta on kerätä näytteet, kun viimeisestä käsittelystä on kulunut 2–6 tuntia (kahden tai useamman käsittelyn tapauksessa) tai kun kerta-annoksen antamisesta on kulunut 2–6 tuntia ja 16–26 tuntia, joskin on huolehdittava, että kaikkien eläinten ruumiinavaus tehdään samana ajankohtana viimeisen (tai ainoan) annoksen jälkeen. Sopivien näytteenottoaikojen valinnassa on käytettävä myös tietoja toksisten vaikutusten ilmenemisestä kohde-elimessä (jos niitä on saatavana).

Havainnot

Yleisiä kliinisiä havaintoja eläinten terveydentilasta tulee tehdä ja kirjata ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan (samoihin aikoihin) joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan (54). Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa. Kestoltaan pidemmissä tutkimuksissa kaikki eläimet on punnittava vähintään kerran viikossa ja testijakson päättyessä. Ruoan kulutusta on mitattava, kun ruoka vaihdetaan, ja ainakin kerran viikossa. Jos testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutusta on mitattava, kun vesi vaihdetaan, tai ainakin kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta myrkytysvaikutuksesta, on lopetettava ennen tutkimusjakson päättymistä, eikä niitä yleensä käytetä komeetta-analyysiin.

Kudosnäytteiden kerääminen

Koska DNA-säikeiden katkeamia (komeettoja) voidaan mahdollista tutkia melkeinpä mistä tahansa kudoksista, kudoksen/kudosten valintaperusteet pitäisi määrittää selvästi ja niiden pitäisi perustua syyhyn, jonka vuoksi tutkimus tehdään, sekä olemassa oleviin, tutkittavia testikemikaaleja koskeviin ADME-, genotoksisuus- tai karsinogeenisyystietoihin tai muuta toksisuutta koskeviin tietoihin. Tärkeitä huomioon otettavia seikkoja ovat muun muassa annostelureitti (joka riippuu ihmisen todennäköisestä altistumisreitistä / todennäköisistä altistumisreiteistä), ennakoitu leviäminen ja absorptio kudoksessa, metabolismin rooli sekä testikemikaalien mahdollinen toimintamekanismi. Useimmin tutkittu kudos on maksa, ja siitä on myös saatavana eniten tietoa. Siksi tilanteessa, jossa taustatietoja ei ole eikä erityistä mielenkiinnon kohteena olevaa kudosta ole määritetty, on perusteltua ottaa näyte maksasta, sillä se on ksenobioottisen metabolismin ensisijainen

▼M7

paikka ja se altistuu usein voimakkaasti sekä emoaineelle/-aineille että metaboliitille/metaboliiteille. Joissakin tapauksissa saattaa olla mielekkäintä tutkia suoralle kontaktille altistuvaa kohtaa (esimerkiksi suun kautta annosteltujen kemikaalien tapauksessa rauhasmahaa tai pohjukaissuolta/tyhjäsuolta tai hengitettyjen kemikaalien tapauksessa keuhkoja). Jos ylimääräisiä tai vaihtoehtoisia kudoksia valitaan, valinnan pitäisi perustua syihin, joiden vuoksi testi tehdään, mutta samojen eläinten useiden kudosten tarkastelusta saattaa olla hyötyä, jos laboratorio on osoittanut pätevyytensä kyseisten kudosten osalta ja pystyvänsä käsittelemään useita kudoksia samaan aikaan.

Näytteiden valmistelu

Seuraavissa kohdissa (44–49) kuvatuissa prosesseissa on tärkeää, että kaikki liuokset tai vakaat suspensiot käytetään ennen niiden käyttöajan päättymistä tai tarvittaessa heti niiden valmistuksen jälkeen. Lisäksi seuraavissa kappaleissa (i) kunkin kudoksen poistamiseen ruumiinavauksen jälkeen, (ii) kunkin kudoksen prosessointiin ja solu-/tumasuspensioiden valmistamiseen sekä (iii) suspension prosessointiin ja näytelasien valmisteluun kuluvat ajat ovat kaikki kriittisiä muuttujia (ks. määritelmät lisäyksestä 1), ja kussakin vaiheessa hyväksyttävät ajat on pitänyt määrittää menetelmän käyttöönoton ja pätevyyden osoittamisen yhteydessä.

Eläimet lopetetaan voimassa olevan eläinsuojelulainsäädännön ja 3R-periaatteiden mukaisesti sopivana ajankohtana / sopivina ajankohtina viimeisen testikemikaalilla tehdyn käsittelyn jälkeen. Valittu kudos / valitut kudokset poistetaan ja leikataan ja osa otetaan talteen komeettakoetta varten, ja samalla kudoksen samasta osasta otetaan leike, joka pannaan formaldehydiliuokseen tai sopivaan fiksatiiviin mahdollista histopatologista analyysia varten (ks. 55 kohta) vakiomenetelmien mukaisesti (12). Komeettakoetta varten otettu kudos pannaan hienonnuspuskuriin, verijäämät poistetaan huuhtelemalla sitä riittävästi kylmällä hienonnuspuskurilla ja kudosta säilytetään jääkylmässä hienonnuspuskurissa, kunnes se prosessoidaan. Esimerkiksi maksalle tai munuaiselle voidaan tehdä myös perfuusio *in situ*.

Solun/tuman eristämiseen on olemassa monia julkaistuja menetelmiä. Niihin kuuluvat muun muassa kudosten, kuten maksan ja munuaisen, hienontaminen, limakalvopintojen raaputus ruoansulatuskanavan tapauksessa, homogenointi ja sulatus entsyymillä. JaCVAM-validointikokeessa tutkittiin vain eristettyjä soluja, ja siksi eristetyt solut ovat parempia siltä osin kuin kyse on menetelmän käyttöönotosta ja edellytyksistä viitata JaCVAM testitietoihin pätevyyden osoittamiseksi. On kuitenkin osoitettu, ettei tuloksissa ollut olennaista eroa sen perusteella, käytettiinkö kokeessa eristettyjä soluja vai tumia (8). Myös solujen/tumien eristämiseen käytetyt eri menetelmät (esimerkiksi homogenointi, hienontaminen, sulatus entsyymillä ja verkkosuodatus) antoivat vertailukelpoisia tuloksia (55). Siten kokeessa voidaan käyttää joko eristettyjä soluja tai eristettyjä tumia. Laboratorion pitäisi arvioida perusteellisesti ja validoida kudoskohtaiset menetelmät yksittäisen solun/tuman eristämiseen. Kuten kohdassa 40 on todettu, jotkin vauriot, jotka aiheuttavat komeettakokeella havaittavia DNA-säikeiden katkeamia, saattavat olla hyvin lyhytkestoisia (52) (53). Siksi riippumatta siitä, mitä menetelmää yhden solun/tuman suspensioiden valmistamiseen käytetään, on tärkeää, että kudokset prosessoidaan mahdollisimman pian eläinten lopettamisen jälkeen ja saatetaan olosuhteisiin, jotka ehkäisevät vaurioiden häviämistä (esimerkiksi kudoksen säilyttäminen alhaisessa lämpötilassa). Solususpensiot on pidettävä jääkylminä, kunnes ne ollaan valmiita käyttämään, jotta näytteiden välinen variaatio on mahdollisimman vähäistä ja jotta voidaan osoittaa sopivat positiiviset ja negatiiviset kontrollivasteet.

▼M7

NÄYTELASIEN VALMISTELU

Näytelasit pitäisi valmistella mahdollisimman pian (ihanteellisesti tunnin sisällä) yhden solun/tuman valmistelusta, mutta lämpötilaa sekä eläimen kuoleman ja näytelasin valmistelun välistä aikaa on valvottava tarkkaan ja ne on validoitava laboratorion olosuhteissa. Näytelasien valmisteluun käytettävään alhaisen sulamispisteen agaroosiin lisättävän solususpension määrä (yleensä 0,5–1,0 prosenttia) ei saa laskea alhaisen sulamispisteen agaroosin osuutta alle 0,45 prosenttiin. Optimaalinen solutiheys määritetään komeettojen arviointiin käytettävällä kuva-analyysijärjestelmällä.

Lyysis

Myös lyysisolosuhteet ovat kriittinen muuttuja ja saattavat vaikuttaa säikeiden katkeamiseen, joka johtuu eri tyyppisistä DNA-muutoksista (tietyistä DNA-alkylaatioista ja emäsaddukteista). Siksi suositellaan, että lyysisolosuhteet pidetään mahdollisimman tasaisina kaikkien kokeessa käytettävien näytelasien osalta. Kun näytelasit on valmisteltu, ne upotetaan jäähdytettyyn (noin 2–8 °C) lyysisliuokseen ainakin yhdeksi tunniksi (tai yön yli) ja niitä pidetään heikoissa valaistusolosuhteissa (esimerkiksi keltaisessa valossa tai valoa läpäisemättömässä paikassa), jotta vältetään niiden altistuminen valkoiselle valolle, joka saattaa sisältää UV-komponentteja. Tämän inkubaatiovaiheen jälkeen näytelaseista huuhdellaan pois puhdistusainejäämät ja suolot ennen emäksen purkamisvaihetta. Tähän voidaan käyttää puhdistettua vettä, neutralointipuskuria tai fosfaattipuskuria. Myös elektroforeesipuskurin käyttäminen on mahdollista. Tämä pitää olosuhteet emäksisinä elektroforeesikammiossa.

Purkaminen ja elektroforeesi

Näytelasit asetetaan upotettavaa tyyppiä olevan elektroforeesiyksikön tasolle satunnaisesti; elektroforeesiliuosta on oltava riittävästi, jotta näytelasien pinnat peittyvät täysin (peittymissyvyys pitäisi pitää samana joka ajossa). Komeettakokeessa käytetyissä toisenlaisissa elektroforeesiyksiköissä, joissa on aktiivinen jäähdytys, kierto ja tehokas virtalähde – näytelasien upottaminen syvemmälle liuokseen johtaa suurempaan sähkövirtaan jännitteen pysyessä ennallaan. Näytelasit pitäisi asettaa elektroforeesisäiliöön tasapainoisella tavalla, jotta säiliössä ei ilmene erityisiä suuntauksia tai reunavaikutuksia ja jotta erien välinen vaihtelu saadaan pidettyä mahdollisimman vähäisenä; toisin sanoen kussakin elektroforeesiajossa pitäisi olla sama määrä näytelaseja kustakin tutkimuksessa käytetystä eläimestä sekä näytteitä eri annosryhmistä, negatiivisista ja positiivisista kontrolleista. Näytelasit pitäisi jättää liuokseen ainakin 20 minuutiksi DNA:han purkautumista varten, minkä jälkeen elektroforeesi pitäisi tehdä hallituissa oloissa, joilla maksimoidaan kokeen herkkyys ja dynamiikka-alue (eli jotka johtavat pyrstön DNA-pitoisuutta koskeviin hyväksyttäviin tasoihin herkkyyden maksimoivien negatiivisten ja positiivisten kontrollien osalta). DNA:n kulkeutumisen aste riippuu lineaarisesti elektroforeesin kestosta sekä jännitteestä (V/cm). JaCVAMin kokeen perusteella se voisi olla 0,7 V/cm vähintään 20 minuutin ajan. Elektroforeesin kestoa pidetään kriittisenä muuttujana, ja elektroforeesiaika pitäisi valita siten, että dynamiikka-alue optimoidaan. Pidemmät elektroforeesiajat (esimerkiksi 30 tai 40 minuuttia herkkyyden maksimoimiseksi) johtavat yleensä vahvempiin positiivisiin vasteisiin tunnettujen mutageenien kanssa. Pidemmät elektroforeesiajat voivat kuitenkin myös aiheuttaa liiallista kulkeutumista kontrollinäytteissä. Kussakin kokeessa jännite pitäisi pitää vakiona, ja muiden muuttujien vaihtelun pitäisi pysyä tietyllä kapealla vaihteluvälillä; esimerkkinä mainittakoon JaCVAM-kokeessa 300 mA:n käynnistymisvirralla saatu 0,7 V/cm. Puskurin syvyyttä pitäisi säätää niin, että vaaditut olosuhteet saavutetaan ja ne säilyvät koko kokeen ajan. Virta elektroforeesijakson alussa ja lopussa on kirjattava. Siksi optimaaliset olosuhteet pitäisi määrittää pätevyyden osoittamisen alkuvaiheessa

▼M7

kyseisessä laboratoriossa kullakin tutkitulla kudoksella. Purkamisen ja elektroforeesin aikana elektroforeesiliuoksen lämpötila pitäisi pitää alhaisena, yleensä 2–10 °C:ssä (10). Elektroforeesiliuoksen lämpötila purkamisen alussa, elektroforeesin alussa ja elektroforeesin lopussa on kirjattava.

Elektroforeesin päättyessä näytelasit on upotettava neutralointipuskuriin tai niitä on huuhdeltava neutralointipuskurilla vähintään viiden minuutin ajan. Geelit voidaan värjätä ja arvioida ”tuoreina” (esimerkiksi 1–2 päivän sisällä) tai ne voidaan kuivattaa myöhempää arviointia varten (esimerkiksi 1–2 viikon kuluttua värjäämisestä) (56). Olosuhteet pitäisi kuitenkin validoida pätevyyden osoittamisen aikana, ja kustakin tällaisesta olosuhteesta pitäisi hankkia ja säilyttää aiempia tietoja. Jälkimmäisessä vaihtoehdossa näytelasit pitäisi kuivattaa upottamalla ne puhtaaseen etanoliin vähintään viideksi minuutiksi ja antamalla niiden kuivua ilmassa, minkä jälkeen niitä säilytetään joko huoneenlämmössä tai säiliössä jääkaapissa, kunnes ne arvioidaan.

Mittausmenetelmät

Komeettoja pitäisi arvioida kvantitatiivisesti käyttämällä automaattista tai puoliautomaattista kuva-analyysijärjestelmää. Näytelasit värjätään käyttämällä sopivaa fluoresoivaa väriainetta, esimerkiksi SYBR Gold -väriainetta, Green I -väriainetta, propidiumjodidia tai etidiumbromidia, ja mitataan sopivaa suurennusta (esimerkiksi 200 ×) käyttäen mikroskoopilla, jossa on epifluoresenssivarustus ja sopivat detektorit tai digitaalinen kamera (esimerkiksi CCD-kamera).

Solut voidaan jakaa kolmeen komeettoja esittelevässä kuvastossa (57) esitettyyn luokkaan: nimittäin arviointikelpoisiin, arviointikelvottomiin ja niin sanottuihin ”siileihin” (ks. lisätietoja 56 kohdasta). Artefaktien välttämiseksi pyrstön DNA-pitoisuutta pitäisi arvioida vain arviointikelpoisista soluista (joiden ydin ja pyrstö erottuvat selvästi, ilman että viereiset solut aiheuttavat sekaannusta). Arviointikelvottomien solujen tiheyttä ei ole tarpeen raportoida. Ns. siilien tiheys pitäisi määrittää silmämääräisen laskennan perusteella (sillä kuva-analyysi ei havaitse selvästi soluja, joista puuttuu selväpiirteinen ydin), jos näytteessä on niitä ainakin 150 (ks. lisätietoja 56 kohdasta), ja ne pitäisi dokumentoida erikseen.

Kaikki analysoitavat näytelasit, mukaan lukien positiiviset ja negatiiviset kontrollit, pitäisi merkitä erikseen tunnisteella ja niitä pitäisi arvioida ”sokkona”, jotta arvioitsija ei tiedä, mistä käsittelystä on kyse. Kustakin näytteestä (yksi näyte kudosta kohti, yksi kudos eläintä kohti) pitäisi analysoida vähintään 150 solua (lukuun ottamatta ns. siilejä, ks. 56 kohta). 150 solun arviointi eläintä kohti, niin että eläimiä on ainakin viisi yhtä annosta kohti (vähemmän samanaikaisessa positiivisessa kontrollissa, ks. 29 kohta) antaa Smithin *et al*., 2008 analyysin mukaan (5) riittävän tilastollisen voiman. Kun eläimiä on yhdessä ryhmässä viisi, tämä voisi näytelaseja käytettäessä tarkoittaa 2:ta–3:a näytelasia yhtä näytettä kohti. Näytelasista pitäisi arvioida useita alueita, joiden sijainti valitaan siten, että pyrstöjen päällekkäisyyden mahdollisuus suljetaan pois. Näytelasien reunojen arviointia pitäisi välttää.

Komeettakokeessa DNA-säikeiden katkeamia voidaan arvoida käyttämällä riippumattomia päätetapahtumia, kuten pyrstön DNA-pitoisuutta (%), pyrstön pituutta ja pyrstön momenttia. Kaikki kolme mittausta voidaan tehdä käyttämällä sopivaa kuvien analysointiohjelmaa. Tulosten arviointiin ja tulkintaan suositellaan käytettävän pyrstön DNA-pitoisuutta (%) (johon viitataan myös ilmaisulla ”%:a pyrstön koosta”) (12) (40) (41) (42), ja sen ratkaisee DNA-fragmenttien määrä pyrstössä ilmaistuna prosentteina solun kokonaiskoosta (13).

▼M7

Kudosvaurio ja sytotoksisuus

Positiiviset havainnot komeettakokeessa eivät välttämättä johdu yksin genotoksisuudesta, vaan myös kohdekudoksen toksisuus voi lisätä DNA:n siirtymistä (12) (41). Sitä vastoin tunnettujen genotoksiinien yhteydessä nähdään usein alhaista tai kohtalaista sytotoksisuutta (12), mikä osoittaa, että genotoksisuuden aiheuttamaa DNA:n siirtymistä ei ole mahdollista erottaa sytotoksisuuden aiheuttamasta siirtymisestä yksin komeettakokeessa. Kun DNA:n kulkeutumisen havaitaan lisääntyneen, on kuitenkin suositeltavaa tutkia yksi tai useampi sytotoksisuusindikaattori, sillä tämä voi auttaa tulkitsemaan havaintoja. Kun sytotoksisuudesta on selvää näyttöä, DNA:n liikkumisen lisääntymistä on tulkittava varovasti.

Useita erityyppisiä sytotoksisuusmittauksia on ehdotettu. Histopatologisia muutoksia pidetään asiaankuuluvana tapana mitata kudoksen toksisuutta. DNA:n siirtymisen lisääntymiseen on liitetty tulehduksen, solujen infiltraation, apoptoottisten tai nekroottisten muutosten kaltaisia löydöksiä, mutta kuten JaCVAMin validointikoe (12) osoitti, saatavana ei ole ehdotonta luetteloa histopatologisista muutoksista, jotka liittyisivät aina DNA:n siirtymisen lisääntymiseen. Muutokset kliinisissä kemiallisissa mittauksissa (esimerkiksi AST, ALT) voivat myös tarjota hyödyllistä tietoa kudosvauriosta, ja ylimääräisiä indikaattoreita, kuten kaspaasiaktivaatiota, TUNEL-värjäystä, Annexin V -värjäystä jne., voidaan myös tarkastella. Saatavilla on kuitenkin vain rajallinen määrä julkaistuja tietoja, joiden mukaan jälkimmäistä olisi käytetty *in vivo* -tutkimuksissa Osa näistä tiedoista ei välttämättä ole erityisen luotettavia.

Siilit (eli pilvet tai haamusolut) ovat soluja, joilla on mikroskooppikuvassa pieni tai olematon ydin ja suuri hajanainen pyrstö; niitä pidetään pahasti vaurioituneina soluina, vaikka niiden etiologiasta ei olekaan varmuutta (ks. lisäys 3). Niiden ulkonäön vuoksi pyrstön DNA-pitoisuuden (%) mittaaminen kuva-analyysilla on epäluotettavaa, ja siksi siilejä pitäisi arvioida erikseen. Siilien esiintyminen on pantava merkille ja raportoitava, ja niiden määrän merkittävää kasvua, jonka ajatellaan johtuvan testikemikaalista, on tutkittava ja tulkittava varoen. Tieto testikemikaalien potentiaalisesta vaikutustavasta saattaa auttaa tällaisissa pohdinnoissa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Eläin on koeyksikkö, ja siksi sekä yksittäisen eläimen tiedot että tulosyhteenveto olisi esitettävä taulukkomuodossa. Tietojen hierarkkisen luonteen vuoksi suositellaan, että kunkin näytelasin osalta määritetään pyrstön DNA-pitoisuuden (%) mediaani ja että kunkin eläimen osalta lasketaan mediaanien keskiarvo (12). Sitten lasketaan yksittäisen eläimen keskiarvojen keskiarvo, jonka pohjalta saadaan ryhmän keskiarvo. Kaikki nämä arvot on kirjattava raporttiin. Vaihtoehtoisia lähestymistapoja (ks. 53 kohta) voidaan käyttää, jos se on tieteellisesti ja tilastollisesti perusteltua. Tilastoanalyysiin voidaan käyttää useita eri lähestymistapoja (58) (59) (60) (61). Käytettäviä tilastollisia menetelmiä valittaessa huomioon pitäisi ottaa tarve muuntaa tietoja (esimerkiksi log tai neliöjuuri) ja/tai lisätä pieni luku (esimerkiksi 0,001) kaikkiin arvoihin (jopa muihin kuin nolla-arvoihin) solujen nolla-arvojen vaikutusten minimoimiseksi, kuten edellä mainituissa kirjallisuusviitteissä on todettu. Yksityiskohtaiset tiedot käsittelyn ja sukupuolen keskinäisen vaikutuksen analysoinnista (molempia sukupuolia käytettäessä) sekä sen jälkeisestä tietojen analysoinnista (kun eroja havaitaan tai niitä ei havaita) esitetään liitteessä 2. Tiedot toksisuudesta ja kliinisistä merkeistä pitäisi myös raportoida.

Hyväksyttävyysperusteet

Testin hyväksyttävyysperusteet ovat seuraavat:

a. Samanaikainen negatiivinen kontrolli katsotaan voitavan lisätä laboratorion aiempaan negatiivisten kontrollien tietokantaan kohdassa 16 kuvatulla tavalla.

▼M7

b. Samanaikaisten positiivisten kontrollien (ks. 29 kohta) pitäisi tuottaa vasteita, jotka vastaavat aiemmassa positiivisten kontrollien tietokannassa olevia vasteita, ja saada aikaan tilastollisesti merkitsevä kasvu samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin nähden.

c. Soluja ja annoksia on analysoitu riittävät määrät (52 ja 36–38 kohta).

d. Suurimman annoksen valintaperusteet vastaavat kohdassa 36 kuvattuja.

Tulosten arviointi ja tulkinta

Jos kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaalia pidetään selvästi positiivisena, jos

a. ainakin yksi testiannoksista ilmentää tilastollisesti merkitsevää kasvua samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin verrattuna

b. kasvu riippuu annoksesta, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä

c. mikä tahansa tuloksista on aiempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella tietyn lajin, kantaja-aineen, reitin, kudoksen ja annostelutavan osalta.

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan aiheuttaa DNA:n säikeiden katkeamista testijärjestelmässä tutkituissa kudoksissa. Jos kriteereistä täyttyy vain yksi tai kaksi, ks. 62 kohta.

Jos kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaalia pidetään selvästi negatiivisena, jos

a. mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkittävää lisääntymistä verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

b. kasvu ei riipu pitoisuudesta, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä

c. kaikki tulokset ovat aiemman negatiivisten kontrollitietojen jakauman sisällä tietyn lajin, kantaja-aineen, reitin, kudoksen ja annostelutavan osalta

d. on saatu suoraa tai välillistä näyttöä kohdekudoksen/-kudosten altistumisesta tai toksisuudesta kohdekudokselle/-kudoksille.

Tällöin katsotaan, että testikemikaali ei kykene aiheuttamaan DNA-säikeiden katkeamista tässä testijärjestelmässä tutkituissa kudoksissa.

Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen (eli jos kaikki 59 tai 60 kohdassa luetellut perusteet eivät täyty), tuloksen biologisen merkityksellisyyden määrittämiseksi asiantuntijan pitäisi arvioida tietoja ja/tai pitäisi tehdä lisätutkimuksia, jos se on tieteellisesti perusteltua. Ylimääräisten solujen arvioinnista (tarvittaessa) tai kokeen toistamisesta mahdollisesti optimoiduissa olosuhteissa (esimerkiksi annosväli, muut annostelureitit, muut näytteenottoajat tai muut kudokset) voisi olla hyötyä.

Päätelmää positiivisuudesta tai negatiivisuudesta ei joissain erittäin harvoissa tapauksissa voida tehdä tietojen pohjalta edes lisätutkimusten jälkeen. Niitä pidetään tästä syystä epäselvinä tapauksina.

▼M7

Positiivisen tai epäselvän tuloksen biologisen merkityksellisyyden arviointi vaatii tietoa sytotoksisuudesta kohdekudoksessa (ks. 54–55 kohta). Kun sytotoksisuudesta on selvää näyttöä ja havainnot ovat positiivisia tai epäselviä, tutkimus on katsottava genotoksisuuden osalta epäselväksi, ellei saatavana ole riittävästi tietoa, joka tukee lopullisen johtopäätöksen tekemistä. Jos tutkimuksen tulos on negatiivinen ja toksisuudesta on merkkejä kaikilla testatuilla annoksilla, lisätutkimusten tekeminen ei-toksisilla annoksilla saattaa olla suositeltavaa.

Testiraportti

Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa.

Yhdestä aineosasta koostuva aine:

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen.

Useammasta aineosasta koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet sekä seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin/kantaja-aine:

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— annosformulaatioiden valmistelu

— formulaatioiden analyyttiset määritelmät (esimerkiksi stabiilius, homogeenisyys, nimelliset pitoisuudet).

Koe-eläin:

— käytetty laji/kanta sekä tieteelliset ja eettiset perustelut sen valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto, virikkeet jne.

— eläinten yksilöllinen paino testin alussa ja lopussa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

▼M7

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset (jos sellainen on tehty)

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— antotavan valintaperusteet

— injektiokohta (tutkimuksissa, joissa annostelu tapahtuu ihonalaisesti tai suonensisäisesti)

— näytteiden valmistelumenetelmät, jos ne ovat saatavana, histopatologiset analyysit erityisesti positiivisen komeettavasteen antavan kemikaalin osalta

— kudoksen valintaperusteet

— menettelyt, joilla varmistetaan, että testikemikaali välittyi kohdekudokseen tai verenkiertoon, jos saadaan negatiivisia tuloksia

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtaiset tiedot käsittely- ja näytteenottoaikataulusta ja perustelut valinnoille (esimerkiksi toksikokineettiset tiedot, jos niitä on saatavana)

— kivunlievitysmenetelmä, analgesia

— lopettamistapa

— kudosten eristämis- ja säilömismenetelmät

— yhden solun/tuman suspension valmistamismenetelmät

— kaikkien reagenssien lähde ja eränumerot (jos mahdollista)

— sytotoksisuuden arviointimenetelmät

— elektroforeesiolosuhteet

— käytetyt värjäystekniikat

— komeettojen arviointi- ja mittausmenetelmät.

Tulokset:

— yleiset kliiniset havainnot, jos sellaisia on, ennen testijaksoa ja sen ajalta kustakin eläimestä

— näyttö sytotoksisuudesta, jos tutkimus on tehty

▼M7

— yli viikon tutkimuksista: yksittäisten eläinten painot tutkimuksen aikana, mukaan lukien painon vaihteluväli, keskiarvo ja normaalijakauma kunkin ryhmän osalta ruoan kulutus

— annos-vastesuhde, kun se on ilmeinen

— kunkin kudoksen/eläimen osalta pyrstön DNA-pitoisuus (%) kunkin kudoksen/eläimen osalta, pyrstön DNA-pitoisuus (%) (tai muut toimenpiteet, jos sellaisia on valittu) ja mediaani näytelevyä kohti, eläinkohtaiset keskiarvot ja ryhmäkohtaiset keskiarvot

— rinnakkaiset ja aikaisemmat negatiivista kontrollia koskevat tiedot, joihin sisältyvät vaihteluvälit, keskiarvot/mediaanit ja keskihajonta kunkin arvioidun kudoksen osalta

— rinnakkaiset ja aikaisemmat positiivisilla kontrolleilla saadut tulokset

— muiden kudosten kuin maksan osalta annos-vastekäyrä positiivista kontrollia käytettäessä. Nämä voivat olla peräisin tiedoista, jotka on kerätty pätevyyden osoittamisen aikana (ks. 16–17 kohta), ja niiden lisäksi pitäisi esittää perustelut, jotka sisältävät viittaukset ajankohtaiseen kirjallisuuteen, jotta voidaan arvioida suuruusluokan asianmukaisuutta ja kontrollivasteiden hajanaisuutta kyseisessä kudoksessa

— tilastolliset analyysit ja käytetyt menetelmät sekä perusteet, joiden perusteella vaste katsotaan positiiviseksi, negatiiviseksi tai epäselväksi

— ns. siilien esiintymistiheys kussakin ryhmässä ja eläimessä.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

Viitteet

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, s. 114–32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, s. 245–54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, s. 31–5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, s. 143–63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, s. 233–40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, s. 45–51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, s. 47–63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, s. 206–21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, s. 184–91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, s. 40–69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the ”Comet” assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, s. 86–94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, s. 207–14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, s. 249–61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, s. 108–20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, s. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis,* Vol. 25/2, s. 187–99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, s. 7–19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, s. 149–62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, s. 621–3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, s. 51–9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, s. 28–41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*,Vol. 393(1–2), 175–8;

▼M7

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, s. 175–80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, s. 240–9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1–2, s. 26–30.

(28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1–2, s. 51–9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, s. 31–5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, s. 486–500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, s. 629–799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, s. 53–74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, s. 3–12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, s. 275–282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, s. 443–451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, s. 167–72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, s. 196–201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, s. 165–81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, s. 267–282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1–2), s. 7–16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, s. 31–5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, s. 53–64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, s. 689–95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, s. 109–11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, s. 113–23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, s. 41–45.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, s. 87–90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

(50) Tässä liitteessä oleva B.8 luku: *Subakuutti toksisuus hengityksen kautta: 28-päiväinen tutkimus*.

(51) Tässä liitteessä oleva B.29 luku: *Subkrooninen toksisuus hengitysteiden kautta: 90-päiväinen tutkimus*.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2–3, s. 141–45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, s. 35–41.

(54) OECD (2002), ”Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, s. 50–4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, s.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, s. 109–19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, s. 167–75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, s. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, s. 171–82.

▼**M7**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Emäksinen yhden solun geelielektroforeesi: Herkkä tekniikka, jolla havaitaan primaarinen DNA-vaurio yksittäisessä solussa/tumassa.

Kemikaali: Aine tai seos.

Komeetta: Komeettaa muistuttava muoto, jonka nukleoidit saavat sen jälkeen, kun ne on altistettu yhdelle elektroforeesikentälle: tuma muodostaa ytimen, ja pyrstö muodostuu DNA:sta, joka kulkeutuu ulos tumasta sähkökentässä.

Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine (UVCB): Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Kriittinen muuttuja/parametri: Protokollan muuttuja, jossa tapahtuvalla pienellä muutoksella voi olla suuri vaikutus kokeen lopputulokseen. Kriittiset muuttujat voivat olla kudoskohtaisia. Kriittisiä muuttujia ei pidä muuttaa varsinkaan kokeessa ottamatta huomioon sitä, miten muutos muuttaa kokeessa saatavaa vastetta, niin kuin esimerkiksi positiivisten ja negatiivisten kontrollien suuruusluokka ja vaihtelu osoittavat. Testiraportissa pitäisi luetella kokeen aikana tehdyt kriittisten muuttujien muutokset tai muutoksia pitäisi verrata laboratorion standardiprotokollaan ja kullekin muutokselle pitäisi esittää perustelut.

Pyrstön koko tai pyrstön DNA-pitoisuus (%): Suhteutuu komeetan pyrstön kokoon, joka puolestaan suhteutuu kokonaiskokoon (ydin ja pyrstö). Kertoo DNA:n hajoamisasteesta ja ilmoitetaan prosentteina.

Testikemikaali: Tällä testimenetelmällä testattu aine tai seos.

▼M7

Lisäys 2

YHDISTELYKOE SUKUPUOLIEROJEN MÄÄRITTÄMISEKSI *IN VIVO* -KOMEETTAKOKEESSA:

Yhdistelykoe ja sen analysointi

Tässä koemallissa testataan vähintään viisi urosta ja viisi naarasta kullakin pitoisuudella, minkä vuoksi mallissa käytetään vähintään 40:tä eläintä (20:tä urosta ja 20:tä naarasta, joihin lisätään asiaankuuluvat positiiviset kontrollit.)

Tämä koe, joka on yksi yksinkertaisemmista yhdistelykokeista, vastaa kaksisuuntaista varianssianalyysia, jossa sukupuoli ja pitoisuus ovat päävaikutukset. Tietoja voidaan analysoida käyttäen monia vakiintuneita tilastollisia ohjelmistopaketteja, kuten SPSS, SAS, STATA, Genstat ja R.

Analyysissa jaotellaan tietojen vaihtelu sukupuolten väliseksi vaihteluksi, pitoisuuksien väliseksi vaihteluksi sekä vaihteluksi, joka liittyy sukupuolten ja pitoisuuksien yhdysvaikutukseen. Kutakin perustetta testataan rinnakkaisten eläinten välisen vaihtelevuuden arvion perusteella samaa sukupuolta edustavissa eläinryhmissä, joille annetaan sama pitoisuus. Täydelliset tiedot menetelmästä annetaan useissa vakiintuneissa tilastollisissa oppikirjoissa (ks. viitteet) ja tilastopakettien tukitoiminnoissa.

Analyysissä tutkitaan sen jälkeen sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutustermi ANOVA-taulukossa ([1]). Merkitsevän yhdysvaikutustermin puuttuessa sukupuolten tai pitoisuustasojen yhdistetyt arvot ovat tasojen välisiä valideja tilastollisia testejä ANOVA-taulukon ryhmän sisäisen yhdistetyn vaihtelutekijän pohjalta.

Analyysi jatkuu siten, että arvio pitoisuuksien välisestä vaihtelusta jaetaan kontrasteihin, joista saadaan testi vasteiden lineaarisille ja kvadraattisille kontrasteille eri pitoisuustasoilla. Kun sukupuolen x pitoisuuteen liittyvä yhdysvaikutus on merkittävä, tämä termi voidaan myös osittaa sukupuoleen x liittyviksi lineaarisiksi ja sukupuoleen x liittyviksi kvadraattisiksi interaktiokontrasteiksi. Näiden tekijöiden perusteella voidaan testata, onko sukupuolten pitoisuusvaste rinnakkainen vai onko sukupuolten välillä vaste-eroa.

Arviota ryhmän sisäisestä yhdistetystä vaihtelusta voidaan käyttää keskiarvojen erotuksen parittaiseen testaukseen. Näitä vertailuja voitaisiin tehdä kummankin sukupuolen keskiarvojen välillä sekä eri pitoisuustasojen keskiarvojen välillä, kuten negatiivisten kontrollitasojen kanssa. Kun yhdysvaikutus on merkitsevä, vertailuja voitaisiin tehdä eri pitoisuuksia saaneen yhden sukupuolen keskiarvojen välillä tai samaa pitoisuutta saaneiden molempien sukupuolten keskiarvojen välillä.

Viitteet

Asiasta on laadittu monia tilastollisia oppikirjoja, joissa käsitellään yhdistelmäkokeiden – jotka vaihtelevat yksinkertaisimmista kaksifaktorianalyyseistä kokeiden suunnittelumetodologiassa käytettyihin monimutkaisimpiin analyyseihin – teoriaa, suunnittelua, metodologiaa, analyysia ja tulkintaa. Seuraava luettelo ei ole tyhjentävä. Joissain annetaan esimerkkejä vertailukelpoisista malleista ja joissakin tapauksissa annetaan koodit analyysien tekemiseen erilaisia ohjelmistoja hyödyntämällä.

([1]) Tilastotieteilijät, jotka valitsevat mallinnuslähestymistavan ja esimerkiksi käyttävät yleisiä lineaarisia malleja (*General Linear Models*, GLM), saattavat lähestyä analyysia erilaisella mutta vastaavalla tavalla mutta eivät välttämättä luo perinteistä ANOVA-taulukkoa, joka on perua tietokoneita edeltävänä aikana kehitetyistä algoritmeihin perustuvista tilastolaskennan lähestymistavoista.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York. John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Lisäys 3

KOKEEN NYKYISET RAJOITUKSET

Tämänhetkisen tietotason vuoksi *in vivo* -komeettakokeeseen liittyy useita rajoituksia. Nämä rajoitukset odotettavasti vähenevät tai supistuvat, kun kokeen käytöstä saadaan lisää kokemusta ja sääntelyllä voidaan vastata turvallisuuskysymyksiin.

1. Tietyntyyppiset DNA-vauriot voivat olla lyhytaikaisia eli korjaantua liian nopeasti ollakseen havaittavissa, kun viimeisestä annoksesta on kulunut 24 tuntia tai enemmän. Lyhytaikaisten vaurioiden tyypeistä ja tällaisia vaurioita todennäköisesti aiheuttavista kemikaaleista ei ole luetteloa, eikä tiedetä, millä aikavälillä tällainen vahinkotyyppi on havaittavissa. Optimaalinen näytteenottoaika voi olla myös kemikaali- tai reittikohtainen, ja näytteenottoajat pitäisikin määrittää kineettisten tietojen pohjalta (esimerkiksi aika, T_{max}, jossa saavutetaan huippupitoisuus plasmassa tai kudoksessa), kun tällaisia tietoja on saatavana. Useimmissa validointitutkimuksissa, jotka tukevat tätä testimetodia, määritetään ruumiinavausajankohdan olevan 2–3 tuntia viimeisen annoksen jälkeen. Julkaistussa kirjallisuudessa useimmissa tutkimuksissa viimeinen annos on annettu 2–6 tuntia ennen eläimen lopettamista. Siksi näiden kokemusten pohjalta testimenetelmässä suositellaan, että muuhun viittaavien tietojen puuttuessa viimeinen annos pitäisi antaa määriteltynä ajankohtana 2–6 tuntia ennen ruumiinavausta.

2. Missään tutkimuksessa ei tarkastella sitä, miten herkästi testi havaitsee lyhytaikaiset DNA-vauriot sen mukaan, onko annos on annettu ruoan tai juomaveden mukana vai ruokintaletkun kautta. Ruoan ja juomaveden kautta annetun annoksen on havaittu aiheuttavan DNA-vaurioita, mutta sen sijaan tällaisia raportteja on suhteellisen vähän ruokintaletkun ja ihonalaisen annostelun osalta, vaikka näistä annostelutavoista on paljon enemmän kokemusta. Siten kokeen herkkyys saattaa olla heikompi sellaisten kemikaalien osalta, jotka aiheuttavat lyhtyaikaista vauriota ruoassa tai juomavedessä annettuina.

3. Muista kudoksista kuin maksasta ja mahalaukusta ei ole tehty laboratorioiden välisiä tutkimuksia, minkä vuoksi ei ole annettu suositusta siitä, miten muissa kudoksissa kuin maksassa saavutetaan herkkä ja toistettavissa oleva vaste, kuten odotetut positiivisten ja negatiivisten kontrollien vaihteluvälit. Maksan osalta ei onnistuttu saamaan aikaan sopimusta negatiivisen kontrolliarvon alarajan asettamisesta.

4. Vaikka monet julkaisut osoittavatkin, että *in vitro* -sytotoksisuudella on häiritsevä vaikutus, tilanteesta *in vivo* on julkaistu hyvin vähän tietoa, minkä vuoksi yhtä ainutta sytotoksisuuden mittaa ei voida suositella. DNA:n siirtymisen lisääntymiseen on liitetty histopatologisten muutosten, kuten tulehduksen, solujen infiltraation, apoptoottisten tai nekroottisten muutosten kaltaisia löydöksiä, mutta kuten JaCVAMin validointikoe (OECD, 2014) osoitti, nämä muutokset eivät aina johda positiivisiin komeettahavaintoihin eikä saatavana siten ole ehdotonta luetteloa histopatologisista muutoksista, jotka liittyisivät aina DNA:n siirtymisen lisääntymiseen. Siilien (eli pilvien tai haamusolujen) on aiemmin esitetty viittaavan sytotoksisuuteen, mutta niiden etiologiasta ei ole kuitenkaan varmuutta. Olemassa on tietoja, jotka viittaavat siihen, että ne voivat johtua testikemikaaliin liittyvästä sytotoksisuudesta, mekaanisesta / entsyymin aiheuttamasta vahingosta, joka on saanut alkunsa näytteen valmistelun aikana (Guerard *et al*., 2014), ja/tai testikemikaalin genotoksisuuden rajummasta vaikutuksesta. Muut tiedot näyttävät osoittavan, että ne johtuvat laajoista mutta mahdollisesti korjaantuvista DNA-vaurioista (Lorenzo *et al*., 2013).

▼**M7**

5. Kudoksia tai solujen tumia on onnistuttu pakastamaan myöhempää analyysia varten. Tällä on usein mitattavissa oleva vaikutus vasteeseen kantaja-aineen ja positiivisen kontrollin osalta (Recio *et al.,* 2010; Recio *et al*., 2012; Jackson *et al.*, 2013). Jos pakastusmenetelmiä käytetään, laboratorion pitäisi osoittaa pätevyytensä ja vahvistaa hyväksyttävät, alhaiset pyrstön DNA-pitoisuuden (%) vaihteluvälit kantaja-aineella käsiteltyjen eläinten kohdekudoksissa, sekä se, että positiivisia vasteita voidaan silti havaita. Kirjallisuudessa on kuvattu kudosten pakastamista eri menetelmin. Tällä hetkellä ei kuitenkaan ole yhteisymmärrystä siitä, miten kudoksia olisi parasta pakastaa ja sulattaa ja miten arvioidaan sitä, voiko mahdollisesti muuttunut vaste vaikuttaa testin herkkyyteen.

6. Viimeaikaisen työn valossa kriittisten muuttujien luettelon odotetaan lyhenevän ja kriittisten muuttujien parametrien tarkentuvan (Guerard *et al*., 2014).

Viitteet

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, s. 114–21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, s. 699–707.

(3) Lorenzo,Y. *et al*. (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead**, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, s. 427–32.

(4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149–62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, s. 101–13.

▼**M8**

B.63. **LISÄÄNTYMIS-/KEHITYSTOKSISUUDEN SEULONTATESTI**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 421 (2016). Kemikaalien testaamiseen tarkoitettuja OECD:n testiohjeita tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen mukaisesti. Seulontatestiohje 421 hyväksyttiin alun perin vuonna 1995, ja se perustui alustava lisääntymistoksisuuden seulontatesti -protokollaan, jota käsiteltiin kahdessa asiantuntijakokouksessa, Lontoossa vuonna 1990 (1) ja Tokiossa vuonna 1992 (2).

2. Tätä testimenetelmää on päivitetty lisäämällä siihen hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkitykselliset päätetapahtumat sen jälkeen, kun OECD aloitti vuonna 1998 tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien testiohjeiden uudistamisen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten (3). OECD:n testiohjetta 407 (oraalinen toistuvan annostelun toksisuustutkimus (28 pv) jyrsijöillä, tämän liitteen B.7 luku) parannettiin vuonna 2008 lisäämällä siihen parametreja, joilla voidaan havaita testikemikaalien hormonitoimintaan kohdistuva vaikutus. Testiohjeen 421 päivittämisen tavoitteena oli sisällyttää seulontatestiohjeeseen joitakin hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkityksellisiä päätetapahtumia sellaisia tilanteita varten, kun altistusajat kattavat muutamia kehityksen kannalta herkkiä ajanjaksoja (syntymää edeltävät tai heti syntymän jälkeiset ajanjaksot).

3. Valitut hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkitykselliset uudet päätetapahtumat, jotka sisältyvät myös testiohjeeseen 443 (pidennetty yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskeva tutkimus, tämän liitteen B.56 luku), sisällytettiin testiohjeeseen 421 toteutettavuustutkimuksen perusteella. Tutkimuksessa käsiteltiin päätetapahtumien lisäämistä koskevia tieteellisiä ja teknisiä kysymyksiä ja mahdollisia muutoksia, joita testiasetelmaan pitäisi tehdä päätetapahtumien lisäämisen vuoksi (4).

4. Tämä testimenetelmä on suunniteltu tuottamaan tiettyjä tietoja, jotka koskevat testikemikaalin vaikutuksia uroksen ja naaraan lisääntymiskykyyn, kuten sukupuolirauhasten toimintaan, parittelukäyttäytymiseen, hedelmöittymiseen, conceptuksen kehittymiseen ja synnytykseen. Se ei ole vaihtoehtoinen eikä korvaa nykyisiä testimenetelmiä B.31, B.34, B.35 tai B.56.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Tätä seulontatestimenetelmää voidaan käyttää alustavien tietojen saamiseksi testikemikaalin mahdollisista vaikutuksista lisääntymiseen ja/tai kehitykseen joko kemikaalien toksikologisten ominaisuuksien varhaisvaiheen arvioinnissa tai huolta aiheuttavien kemikaalien tutkimuksessa. Sitä voidaan käyttää myös osana sellaisten olemassa olevien kemikaalien alustavien seulontatestien sarjaa, joista toksikologista tietoa on saatavilla niukasti tai joista sitä ei ole saatavilla lainkaan. Sitä voidaan käyttää myös annosalueen määritystutkimuksena laajemmissa lisääntymis-/kehitystutkimuksissa tai silloin, kun sitä pidetään muulloin tarpeellisena. Tutkimuksen toteuttamisessa on noudatettava periaatteita ja näkökohtia, jotka esitetään pääpiirteittäin OECD:n ohjeasiakirjassa 19 kliinisten oireiden tunnustamisesta, arvioimisesta ja soveltamisesta inhimillisinä toimenpiteinä turvallisuusarvioinneissa käytettäviin eläimiin (5).

▼M8

6. Tällä testimenetelmällä ei saada täydellisiä tietoja kaikista lisääntymiseen ja kehitykseen liittyvistä näkökohdista. Testimenetelmä on vain rajallinen mahdollisuus havaita syntymää edeltäneen altistuksen vaikutuksia syntymän jälkeen tai sellaisia vaikutuksia, joita voi ilmaantua syntymän jälkeisen altistuksen aikana. (Esimerkiksi) annosryhmissä käytettyjen eläinten pienen määrän, päätetapahtumien valikoivuuden ja tutkimuksen lyhyen keston vuoksi tällä menetelmällä ei saada sellaista näyttöä, jonka perusteella voitaisiin päätellä varmasti, ettei vaikutuksia ole. Koska myöskään muihin lisääntymis-/kehitystoksisuustesteihin pohjautuvia tietoja ei ole, positiiviset tulokset ovat hyödyllisiä alustavassa vaaran arvioinnissa, ja ne voivat vaikuttaa päätöksiin lisätestauksen tarpeellisuudesta ja ajoituksesta.

7. Hormonitoimintaan liittyvien parametrien avulla saatuja tuloksia on tarkasteltava OECD:n asiakirjaan ”Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (6) (hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva toimintamalli) liittyvässä kontekstissa. Tässä asiakirjassa OECD:n parannettu testiohje 421 sisältyy tasolle 4 *in vivo* -testinä, jolla saadaan tietoa haittavaikutuksista hormonitoiminnan kannalta merkityksellisten päätetapahtumien osalta. Hormonitoimintaan liittyvää signaalia ei kuitenkaan pidetä yksinään riittävänä näyttönä siitä, että testikemikaali olisi hormonaalinen haitta-aine.

8. Tässä testimenetelmässä testikemikaali annostellaan suun kautta. Jos käytetään muita altistusreittejä, menetelmään voi olla tarpeen tehdä muutoksia.

9. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

10. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

11. Testikemikaalia annetaan porrastettuina annoksina useille uros- ja naarasryhmille. Uroksille on annettava testikemikaalia vähintään neljä viikkoa suunniteltua lopettamispäivää edeltävään päivään saakka kyseinen päivä mukaan luettuna (ts. vähintään kaksi viikkoa ennen parittelua, parittelujakson aikana ja noin kaksi viikkoa parittelun jälkeen). Koska parittelua edeltävä annostelujakso on urosten osalta lyhyt, hedelmällisyys ei välttämättä ole erityisen herkkä indikaattori kiveksiin kohdistuvasta toksisuudesta. Sen vuoksi kivesten tarkka histologinen tutkimus on tärkeä. Parittelua edeltävää kahden viikon annostelujaksoa, jota seuraa parittelun/hedelmällisyyden tarkkailu, ja vähintään neljä viikkoa kestävä kokonaisannostelujakso ja urosten sukupuolielinten yksityiskohtainen histopatologinen tutkimus, katsotaan riittäväksi, jotta voidaan havaita suurin osa urosten hedelmällisyyteen ja spermatogeneesiin kohdistuvista vaikutuksista.

12. Naaraille on annettava testikemikaalia tutkimuksen koko keston ajan. Niille testikemikaalia annostellaan siis kahden viikon ajan ennen parittelua (tavoitteena on kattaa vähintään kaksi täyttä kiimakiertoa), hedelmöittymisen vaihteleva ajankohta, tiineyden kesto ja vähintään 13 päivää synnytyksen jälkeen suunniteltua lopettamispäivää edeltävään päivään saakka, kyseinen päivä mukaan luettuna.

13. Tutkimuksen kesto sopeutumisvaiheen ja annostelua edeltävän kiimakierron arvioinnin jälkeen määräytyy naaraan lisääntymiskyvyn mukaan, ja se on noin 63 päivää [vähintään 14 päivää ennen parittelua, (enintään) 14 päivän parittelujakso, 22 päivän tiineys ja 13 päivän imetysaika].

▼M8

14. Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin päivittäin toksisuusoireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

15. Tässä testimenetelmässä on suunniteltu käytettävän rottaa koe-eläimenä. Jos tässä testimenetelmässä määritettyjä parametreja tutkitaan muilla jyrsijöillä, sille on esitettävä yksityiskohtainen perustelu. Kansainvälisessä validointiohjelmassa, jossa tutkittiin hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemista OECD:n testiohjeen 407 (joka vastaa tämän liitteen B.7 lukua) perusteella, rotta oli ainoa käytetty laji. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen tai joilla tiedetään esiintyvän kehityshäiriöitä, ei tule käyttää. Koe-eläiminä on käytettävä terveitä pariutumattomia eläimiä, joilla ei ole tehty aikaisempia kokeita. Koe-eläinten laji, kanta, sukupuoli, paino ja ikä on oltava tiedossa. Tutkimuksen alkaessa eläinten painot saavat vaihdella mahdollisimman vähän, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta. Mikäli tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen tai koko sukupolven tutkimuksen esitestinä, molemmissa tutkimuksissa tulee mieluiten käyttää samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

16. Kaikissa menettelyissä on noudatettava laboratorioeläinten hoitoa koskevia paikallisia vaatimuksia. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:ää prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testikemikaalin ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna.

17. Eläimet voidaan pitää häkeissä muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä tai yksittäin, jos se on tieteellisesti perusteltua. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä. Parittelun tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Tiineet naaraat on laitettava häkkiin yksittäin, ja niille on annettava pesämateriaaleja. Imettävät naaraat laitetaan häkkiin yksittäin poikastensa kanssa.

18. Eläinten ravinto on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta. Näyte ruokavaliosta on säilytettävä siihen saakka, kunnes tutkimusraportti on valmis.

Eläinten valmistelu

19. Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaisesti verrokki- ja testiryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet merkitään yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

Annosten valmistelu

20. Testikemikaali suositellaan annosteltavaksi suun kautta, ellei muita annostelureittejä pidetä asianmukaisempina. Jos valitaan suun kautta annostelu, testikemikaali annetaan yleensä ruokintaletkun kautta; vaihtoehtoisesti testikemikaalit voidaan kuitenkin antaa myös ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna.

▼M8

21. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/emulsiota ja sitten mahdollisesti muihin kantaja-aineisiin perustuvia liuoksia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiliteetti ja homogeenisuus kantaja-aineessa on määritettävä.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

22. On suositeltavaa, että jokaisessa ryhmässä on aluksi vähintään 10 urosta ja 12–13 naarasta. Naaraiden kiimakierto arvioidaan ennen altistusta, ja eläimiä, joiden osalta tyypillistä 4–5 päivän kiertoa ei voida vahvistaa, ei oteta mukaan tutkimukseen. Jotta kuhunkin ryhmään saadaan varmasti 10 naarasta, niitä pitää olla aluksi enemmän kuin uroksia. Lukuun ottamatta selviä toksisia vaikutuksia, kuhunkin ryhmään oletetaan saatavan vähintään kahdeksan tiineenä olevaa naarasta, mikä on yleensä pienin hyväksyttävä tiineiden naaraiden määrä yhdessä ryhmässä. Tavoitteena on saada tarpeeksi tiineystapauksia ja poikasia, jotta voidaan tehdä luotettava arvio testikemikaalin mahdollisesta vaikutuksesta hedelmällisyyteen, tiineyteen, emon ja poikasen käytökseen sekä F_1-sukupolven kasvuun ja kehitykseen hedelmöityksestä synnytyksen jälkeiseen päivään 13 saakka.

Annostelu

23. Yleensä tulee käyttää vähintään kolmea testiryhmää ja yhtä verrokkiryhmää. Annostasojen perusteena voidaan käyttää akuuttia toksisuutta koskevista testeistä saatuja tietoja tai toistuvan annostelun tutkimusten tuloksia. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testikemikaalin annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

24. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki saatavilla olevat aikaisemmat toksisuustiedot ja (toksiko)kineettiset tiedot. Lisäksi on otettava huomioon, että tiineiden ja muiden kuin tiineiden eläinten herkkyydessä voi olla eroja. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa toksisia vaikutuksia mutta ei kuolemaa tai vakavia kärsimyksiä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla (NOAEL). Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin 10-kertaisia).

25. Jos havaitaan yleistä toksisuutta (kuten painonlaskua, maksaan, sydämeen, keuhkoihin tai munuaisiin kohdistuvia vaikutuksia jne.) tai muita muutoksia, jotka eivät ole välttämättä toksisia (esimerkiksi ravinnonoton vähentymistä, maksan suurenemista), hormonitoiminnan kannalta herkkiin ominaisuuksiin kohdistuvia vaikutuksia on tulkittava varauksellisesti.

Raja-annostesti

26. Jos oraalisessa testissä jokin annostaso, joka on vähintään 1 000 mg/kg (eläimen painokilo) /vrk tai vastaava suhteellinen määrä ravinnossa tai juomavedessä, kun testikemikaali annetaan ravinnon tai juomaveden seassa, ja joka annetaan tässä testimenetelmässä kuvattujen menettelyjen mukaisesti, ei aiheuta lainkaan havaittavaa toksista vaikutusta ja jos sitä ei aikaisempien tutkimustulosten perusteella ole odotettavissa (esimerkiksi rakenteellisesti samantyyppiset yhdisteet), täydellinen useita annostasoja käyttävä testi ei välttämättä ole tarpeen. Raja-annostestiä voidaan soveltaa muulloin paitsi silloin, kun ihmisten altistuminen viittaa siihen, että on käytettävä suurempaa suun kautta annettavaa annosta. Muiden antotapojen kuten inhalaation tai ihoapplikaation osalta suurin mahdollinen pitoisuus määräytyy yleensä testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella.

▼M8

Annostelu

27. Eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin seitsemänä päivänä viikossa. Jos testikemikaali annetaan ruokintaletkun kautta, se on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin yhdellä kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa olla yli 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksena ovat vesiliuokset, joita käytettäessä määrä voi olla 2 ml/100 g painoa. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät testikemikaalit, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Testikemikaalin määrän vaihtelu on minimoitava pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla varmistetaan tilavuudeltaan sama nestemäärä.

28. Kun testikemikaalit annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalin määrät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annostaso; käytetty tapa on mainittava. Jos testikemikaali annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava vähintään viikoittain siten, että annostaso pysyy samana eläimen painoon nähden.

Testiaikataulu

29. Testikemikaalia on alettava antaa kummallekin sukupuolelle vähintään kaksi viikkoa ennen parittelua sen jälkeen, kun eläimiä on sopeutettu vähintään viisi päivää ja kun eläimistä on seulottu ne naaraat, joiden kiimakierto on normaali (altistusta edeltävällä kahden viikon jaksolla). Tutkimus on aikataulutettava siten, että kiimakierron arviointi alkaa pian sen jälkeen, kun eläimet ovat saavuttaneet täyden sukukypsyyden. Eri rottakannoissa ja eri laboratorioissa voi olla tässä vaihtelua; esimerkiksi Sprague-Dawley-rotat tulevat sukukypsiksi 10-viikkoisina, Wistar-rotat taas noin 12-viikkoisina. Poikineet emot on lopetettava päivänä 13 synnytyksen jälkeen tai pian sen jälkeen. Syntymäpäivä (ts. kun synnytys on tapahtunut) määritellään synnytyksen jälkeiseksi päiväksi 0. Naaraat, joiden osalta parittelua ei voida todeta tapahtuneen, lopetetaan 24–26 päivää parittelujakson viimeisen päivän jälkeen. Annostelua jatketaan kummallekin sukupuolelle parittelujakson aikana. Uroksille annostelua on jatkettava parittelujakson jälkeen vähintään siihen saakka, kunnes annostelujakso on kokonaisuudessaan vähintään 28 päivää. Sen jälkeen urokset lopetetaan. Vaihtoehtoisesti ne pidetään elossa ja annostelua jatketaan mahdolliseen toiseen parittelukertaan asti, jos sitä pidetään tarkoituksenmukaisena.

30. Annostelua tiineeksi tulleille naaraille on jatkettava tiineyden ajan ja vähintään synnytyksen jälkeiseen päivään 13 asti, kyseinen päivä mukaan luettuna, tai lopettamista edeltävään päivään saakka. Tutkimuksissa, joissa testikemikaalia annostellaan hengitysteiden tai ihon kautta, annostelua on jatkettava vähintään tiineyden päivään 19 saakka, kyseinen päivä mukaan luettuna, ja annostelua on jatkettava mahdollisimman pian, viimeistään kuitenkin SJP:nä 4.

31. Lisäyksessä 2 on kaavio testiaikataulusta.

Paritus

32. Tässä tutkimuksessa on käytettävä yleensä 1:1-parittelua (yhden uroksen ja yhden naaraan parittelu). Poikkeuksia voidaan tehdä, jos yksittäisiä uroksia kuolee. Naaras on laitettava häkkiin saman uroksen kanssa, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen tai kunnes kaksi viikkoa on kulunut. Naaraat on tutkittava joka aamu sperman tai vaginatulpan havaitsemiseksi. Tiineyspäivä 0 määritellään päiväksi, jolloin todisteet parittelusta vahvistetaan (vaginatulpan muodostuminen tai spermaa havaitaan). Jos parittelua ei tapahdu, voidaan harkita naaraan uutta paritusta saman ryhmän hedelmällisiksi todettujen urosten kanssa.

▼M8

Poikueiden koko

33. Päivänä 4 synnytyksen jälkeen kunkin poikueen kokoa voidaan mukauttaa poistamalla siitä poikasia satunnaisvalinnalla siten, että yhteen poikueeseen jää neljä tai viisi poikasta kumpaakin sukupuolta sen mukaan, mikä on käytetyn rottakannan normaali poikuekoko. Kahdesta ylimääräisestä poikasesta on otettava verinäytteet, jotka yhdistetään ja käytetään seerumin T4-pitoisuuden määrittämiseen. Poikasten valikoiva eliminointi esimerkiksi painon tai peräaukon ja sukupuolielinten välisen etäisyyden perusteella ei ole tarkoituksenmukaista. Jos uros- tai naaraspuolisten poikasten määrä on sellainen, että poikueeseen ei jää neljää tai viittä poikasta kumpaakin sukupuolta, voidaan tehdä osittaismukautus (esimerkiksi kuusi urosta ja neljä naarasta). Poikasia ei eliminoida poikueesta, jos poikueen koko supistuisi karsintatavoitetta pienemmäksi (8 tai 10 poikasta / poikue). Jos käytettävissä on vain yksi poikanen karsimistavoitetta enemmän, eliminoidaan vain yksi poikanen, ja siltä otetaan verinäyte mahdollisia seerumin T4-määrityksiä varten.

34. Jos poikueen kokoa ei mukauteta, jokaisesta poikueesta lopetetaan kaksi poikasta päivänä 4 syntymän jälkeen, ja niiltä otetaan verinäytteet seerumin kilpirauhashormonipitoisuuden mittausta varten. Mikäli mahdollista, näiden kahden poikasen tulisi olla naaraita, jotta urospuolisista poikasista voidaan tutkia nännien vetäytyminen, mutta tämä ei saa johtaa siihen, ettei poikueeseen jäisi naaraspuolisia poikasia arvioitavaksi tutkimuksen päättyessä. Yhtään poikasta ei eliminoida, jos poikueen koko pienenisi alle 8 tai 10 poikaseen / poikue (käytetyn rottakannan normaalin poikuekoon mukaan). Jos käytettävissä on vain yksi poikanen normaalia poikuekokoa enemmän, eliminoidaan vain yksi poikanen, ja siltä otetaan verinäyte mahdollisia seerumin T4-määrityksiä varten.

Eläviä eläimiä koskevat havainnot

Kliiniset havainnot

35. Testijakson aikana yleisiä kliinisiä havaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä ja sitä useammin, jos toksisuuden merkkejä havaitaan. Havainnointi on tehtävä mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen ennakoidut vaikutukset ovat suurimmillaan. Käyttäytymistavan muutokset, merkit vaikeasta tai pitkittyneestä synnytyksestä ja kaikki toksisuuden merkit sekä kuolleisuus on kirjattava. Näihin tietoihin on kirjattava myös toksisuuden merkkien alkamisaika, vakavuusaste ja kesto.

Eläimen paino ja ravinnon/veden kulutus

36. Urokset ja naaraat on punnittava ensimmäisenä annostelupäivänä, vähintään kerran viikossa sen jälkeen ja tutkimuksen päättyessä. Tiineyden aikana naaraat on punnittava päivinä 0, 7, 14 ja 20 sekä 24 tunnin kuluessa synnytyksestä (päivänä 0 tai 1 synnytyksen jälkeen) ja vähintään päivänä 4 ja 13 synnytyksen jälkeen. Havainnot raportoidaan erikseen kustakin täysikasvuisesta eläimestä.

37. Ravinnon kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ennen parittelua sekä tiineyden ja imetyksen aikana. Ravinnon kulutuksen mittaus parittelujakson aikana ei ole pakollista, mutta sen voi tehdä. Myös vedenkulutus näiden jaksojen aikana on mitattava, jos testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna.

Kiimakierrot

38. Kiimakiertoja on seurattava ennen altistuksen aloittamista, jotta tutkimukseen voidaan valita naaraita, joiden kiimakierto on säännöllinen (ks. 22 kohta). Myös irtosolunäytteitä on seurattava päivittäin altistusjakson alkamisesta siihen saakka, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen. Jos annostelun aloittamisen

▼M8

epäillään aiheuttavan akuutteja stressireaktioita, jotka voivat muuttaa kiimakiertoja, laboratoriot voivat altistaa koe-eläimet testikemikaalille kahden viikon ajaksi ja ottaa niiltä irtosolunäytteet päivittäin, jotta ne voivat seurata kiimakiertoa vähintään kahden viikon ajan parittelua edeltävällä jaksolla. Seurantaa on jatkettava parittelujaksolla siihen saakka, että parittelun voidaan todeta tapahtuneen. Vagina-/kohdunkaulasolujen ottamisessa on pyrittävä välttämään limakalvon vaurioittamista, sillä se voi aiheuttaa valetiineyden (7) (8).

Poikasia koskevat parametrit

39. Tiineyden kesto on kirjattava, ja se lasketaan tiineyden päivästä 0 alkaen. Jokainen poikue on tutkittava mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen, jotta voidaan määrittää poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena ja elävänä syntyneiden poikasten määrä, pienikasvuisten poikasten lukumäärä (poikaset, jotka ovat huomattavasti pienempiä kuin verrokkiryhmän poikaset) ja selvästi näkyvät epämuodostumat.

40. Elävät poikaset on laskettava ja niiden sukupuoli on määritettävä ja poikueet on punnittava 24 tunnin kuluessa synnytyksestä (päivänä 0 tai 1 synnytyksen jälkeen) ja vähintään päivänä 4 ja 13 synnytyksen jälkeen. Edellä 35 kohdassa kuvattujen havaintojen lisäksi on kirjattava myös poikasten kaikenlainen poikkeava käyttäytyminen.

41. Jokaisen poikasen peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys on mitattava samana synnytyksen jälkeisenä päivänä SJP 0 – SJP 4. Poikasen paino on punnittava samana päivänä, kun peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys mitataan, ja tämä mittaus on normalisoitava poikasen koon mittauksen perusteella, mieluiten painon kuutiojuureen (9). Urospuolisten poikasten nännien/nännipihojen määrä on laskettava SJP:nä 12 tai 13 OECD:n ohjeasiakirjassa 151 suositellun mukaisesti (10).

Kliininen biokemia

42. Verinäytteet määrätystä paikasta otetaan seuraavan aikataulun mukaan:

— vähintään kahdelta poikaselta jokaisesta poikueesta päivänä 4 syntymän jälkeen, jos se on mahdollista poikasten lukumäärän perusteella (ks. 33–34 kohta)

— kaikilta emoilta ja vähintään kahdelta poikaselta jokaisesta poikueesta tutkimuksen päättyessä päivänä 13, ja

— kaikilta täysikasvuisilta uroksilta tutkimuksen päättyessä.

Kaikki verinäytteet on säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa. Päivänä 13 otetuista poikasten ja täysikasvuisten urosten verinäytteistä määritetään kilpirauhashormonien (T4) pitoisuus seerumissa. Emojen ja päivänä 4 poikasilta otettujen verinäytteiden T4-pitoisuus määritetään, jos se on tarpeen. Myös muiden hormonien pitoisuuksia voidaan määrittää, jos se on tarpeen. Poikasten verinäytteet voidaan yhdistää poikueittain kilpirauhashormonin määritystä varten. Kilpirauhashormonit (T4 ja THS) on mitattava mieluiten kokonaispitoisuutena.

43. Seuraavat seikat saattavat vaikuttaa hormonimääritysten vaihteluun ja absoluuttisiin pitoisuuksiin:

— lopettamisaika hormonipitoisuuksien vuorokausivaihtelun takia

— lopettamistapa: on vältettävä aiheuttamasta eläimille turhaa stressiä, joka voi vaikuttaa hormonipitoisuuksiin

— hormonimääritysten testipaketit, joiden standardikäyrät voivat vaihdella.

▼M8

44. Plasmanäytteet, jotka on nimenomaisesti tarkoitettu hormonimäärityksiin, on otettava samaan aikaan päivästä. Hormonipitoisuuksien analysoimisesta saadaan toisenlaisia numeerisia arvoja kuin erilaisten kaupallisten testipakettien avulla.

Patologia

Ruumiinavaustutkimukset

45. Kun täysikasvuiset eläimet lopetetaan tai kun ne kuolevat testin aikana, niistä on tutkittava makroskooppisesti mahdolliset epämuodostumat tai patologiset muutokset. Erityistä huomiota on kiinnitettävä lisääntymiselimiin. Kiinnittymiskohtien määrä on kirjattava. Irtosolunäytteet on tutkittava ruumiinavauspäivän aamuna, jotta kiimakierron vaihe voidaan määrittää ja jotta voidaan mahdollistaa korrelaatio munasarjojen histopatologisen tutkimuksen kanssa.

46. Kaikkien täysikasvuisten urospuolisten eläinten kiveksistä ja lisäkiveksistä sekä eturauhasesta ja rakkularauhasesta sekä niiden etuosista kokonaisuudessaan on poistettava kaikki ylimääräinen kudos tarvittaessa, ja niiden märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi. Lisäksi voidaan valinnaisesti punnita esimerkiksi levator ani- ja bulbocavernosus-lihaskompleksi, Cowperin rauhaset ja terska uroksilta sekä parilliset munasarjat (märkäpaino) ja kohtu (myös kohdunkaula) naarailta. Jos nämä päätetään punnita, se on tehtävä mahdollisimman pian dissektion jälkeen.

47. Kuolleet poikaset ja päivänä 13 synnytyksen jälkeen tai pian sen jälkeen lopetetut poikaset on tutkittava huolellisesti ulkoisesti selvästi näkyvien epämuodostumien varalta. Huomiota on kiinnitettävä erityisesti ulkoisiin lisääntymiselimiin, joista on tutkittava, näkyykö niissä merkkejä muuttuneesta kehityksestä. Yhden urospoikasen ja yhden naaraspoikasen kilpirauhanen on säilöttävä päivänä 13.

48. Kaikilta täysikasvuisilta eläimiltä on säilöttävä munasarjat, kivekset, avustavat sukupuolielimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, eturauhanen, rakkularauhanen ja niiden etuosat), kilpirauhanen ja kaikki muut elimet, joissa näkyy makroskooppisia leesioita. Formaliinilla kiinnittämistä ei suositella kivesten ja lisäkivesten tavanomaiseen tutkimukseen. Hyväksyttävä menetelmä on käyttää näihin kudoksiin Bouinin kiinnitysainetta tai Davidsonin muunneltua kiinnitysainetta (11). Tunica albugineaan on tehtävä varovasti pieni reikä neulalla elimen molempiin päihin, jotta kiinnitysaine pääsee tunkeutumaan sisään nopeasti.

Histopatologia

49. Suurimman annoksen ryhmän ja verrokkiryhmän eläinten munasarjoista, kiveksistä ja lisäkiveksistä (erityistä huomiota on kiinnitettävä spermatogeneesin vaiheisiin ja kivesten interstitiaalisolujen rakenteen histopatologiaan) on tehtävä tarkka histologinen tutkimus. Muut poikasilta ja täysikasvuisilta eläimiltä otetut elimet, myös kilpirauhanen, voidaan tutkia, jos se on tarpeen. Kilpirauhasen paino voidaan määrittää kiinnittämisen jälkeen. Puhdistus on tehtävä hyvin varovasti ja vasta kiinnittämisen jälkeen kudosvaurioiden välttämiseksi. Kudosvauriot voivat haitata histopatologista analyysia. Tutkimukset tulee tehdä myös kaikille muiden annostusryhmien eläimille, jos suurimman annoksen ryhmässä havaitaan muutoksia. Histopatologiaa koskevissa ohjeissa (11) on tarkempia tietoja endokriinisten kudosten dissektiosta, kiinnittämisestä, mikrotomiasta ja histopatologiasta.

▼**M8**

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

50. Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot. Lisäksi kaikki tiedot on esitettävä taulukossa, jossa on eritelty testiryhmittäin eläinten lukumäärä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, kuoleman tai inhimillisistä syistä lopettamisen ajankohta, hedelmällisten eläinten lukumäärä, tiineiden naaraiden lukumäärä, niiden eläinten määrä, joissa toksisuusvaikutuksia on havaittavissa, kuvaus havaituista toksisuuden merkeistä sekä mahdollisten toksisten vaikutusten alkamisaika, kesto ja vakavuus, histopatologisten muutosten tyypit sekä kaikki asiaankuuluvat tiedot poikueesta. Lisäyksessä 3 on malli yhteenvetotaulukosta, joka on osoittautunut erittäin hyödylliseksi lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa.

51. Tutkimuksen rajallisuuden vuoksi testien ”merkitsevyyttä” tarkastelevista tilastoanalyyseista on varsin vähän hyötyä monien päätetapahtumien, etenkin lisääntymiseen liittyvien päätetapahtumien, osalta. Jos tilastoanalyyseja tehdään, valitun menetelmän on oltava tutkitun muuttujan jakauman kannalta asianmukainen, ja se on valittava ennen tutkimuksen aloittamista. Peräaukon ja sukupuolielinten välistä etäisyyttä ja nännien vetäytymistä koskevan tilastoanalyysin on perustuttava yksilökohtaisiin tietoihin poikasista, ja poikueeseen kohdistuvat vaikutukset on otettava huomioon. Tarvittaessa poikue on analysoitava yksikkö. Poikasen painoa koskevan tilastoanalyysin on perustuttava yksilökohtaisiin tietoihin poikasista, ja poikueeseen kohdistuvat vaikutukset on otettava huomioon. Pienen ryhmäkoon vuoksi aikaisemmat kontrollitiedot (esimerkiksi poikueen koko), jos niitä on saatavilla, voivat olla hyödyllinen apu tutkimustulosten tulkinnassa.

Tulosten arviointi

52. Tämän toksisuustutkimuksen löydökset on arvioitava havaittujen vaikutusten, ruumiinavauksen ja mikroskopialöydösten avulla. Arvioinnissa tulee todeta testikemikaalin annoksen ja poikkeavuuksien – mukaan lukien vakavat vauriot, tietyt kohde-elimet, hedelmättömyys, kliiniset poikkeavuudet, vaikutukset lisääntymiskykyyn ja poikueen kokoon/laatuun, painon muutokset, vaikutukset kuolleisuuteen sekä muut toksiset vaikutukset – esiintyvyyden, ilmaantuvuuden ja vakavuuden välinen mahdollinen suhde.

53. Koska urosten altistusjakso on lyhyt, uroksen lisääntymiskykyyn kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa tulisi harkita myös kivesten ja lisäkivesten histopatologista tutkimusta hedelmällisyystietojen ohella. Lisääntymistä/kehitystä koskevien aiempien vertailutietojen (esimerkiksi poikueen koko, peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys, nännien vetäytyminen, seerumin T4-pitoisuus) käytöstä voi olla hyötyä tutkimuksen tulosten tulkinnan apuna.

54. Laadunvalvontaa varten on suositeltavaa kerätä vertailutietoja aiemmista tutkimuksista ja laskea vaihtelukertoimista numeeriset tiedot varsinkin sellaisista parametreista, jotka liittyvät hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseen. Näitä tietoja voidaan käyttää vertailutarkoituksiin, kun varsinaisia tutkimuksia arvioidaan.

Testiraportti

55. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa.

▼**M8**

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

Koe-eläin:

— käytetty laji/kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alussa

— lajin valinnan perustelut, jos se on muu kuin rotta.

Koeolosuhteet:

— annostason valintaperusteet

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, saavutetuista pitoisuuksista sekä valmisteen stabiiliudesta ja tasalaatuisuudesta

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— ravinnossa/juomavedessä olevan testikemikaalin määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtainen kuvaus satunnaistamismenettelystä, jolla valittiin karsittavat poikaset, jos karsinta tehtiin.

Tulokset:

— paino / painon muutokset

— ravinnon ja veden kulutus, jos tiedot ovat saatavilla

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, myös hedelmällisyyden, tiineyden ja toksisuuden mahdollisten muiden merkkien osalta

— tiineyden kesto

— toksiset tai muut vaikutukset lisääntymiseen, poikasiin, syntymänjälkeiseen kasvuun jne.

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)

— niiden täysikasvuisten naaraiden määrä, joilla on normaali tai epänormaali kiimakierto, ja kierron pituus

— elävänä syntyneiden poikasten määrä ja kiinnittymisen jälkeen tapahtuneet abortoitumiset

— poikasten painotiedot

— peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys kaikilta poikasilta (sekä paino tämän etäisyyden mittauspäivänä)

▼M8

— urospoikasten nännien vetäytyminen

— kilpirauhashormonipitoisuudet päivänä 13 urospoikasilta ja täysikasvuisilta uroksilta (ja emoilta ja naaraspoikasilta päivänä 4, jos pitoisuus mitataan niiltä)

— niiden poikasten lukumäärä, joilla on selvästi nähtäviä poikkeavuuksia, ulkoisten sukupuolielinten silmämääräinen arviointi, pienikasvuisten poikasten lukumäärä

— eläinten kuolinaika tutkimusaikana tai tieto siitä, pysyivätkö eläimet hengissä tutkimuksen päättymiseen saakka

— kiinnittymisten lukumäärä, poikueen koko ja painot kirjaushetkellä

— poikasia saaneiden eläinten paino lopetettaessa ja niiden elinten paino

— ruumiinavauslöydökset

— yksityiskohtaiset tiedot kaikista histopatologisista löydöksistä

— absorptiotiedot (jos saatavilla)

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Päätelmät.

Tulosten tulkinta

56. Tutkimuksen tuloksena saadaan arviot toistettujen annosten antamiseen liittyvästä lisääntymis-/kehitystoksisuudesta (ks. 5 ja 6 kohta). Sen perusteella tiedetään, onko tehtävä lisätutkimuksia, ja se voi ohjata myös myöhempien tutkimusasetelmien suunnittelua. OECD:n ohjeasiakirjaa 43 on käytettävä lisääntymiseen ja kehitykseen kohdistuviin vaikutuksiin liittyvien tulosten tulkinnan apuna (12). OECD:n ohjeasiakirjassa 106 (jyrsijöillä tehtyjen endokriinisten ja lisääntymiseen liittyvien testien histologinen arviointi) on tietoa (endokriinisten) elinten ja irtosolunäytteiden preparoinnista ja arvioinnista. Näistä tiedoista voi olla apua tämän testiohjeen soveltamisessa.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84–97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L. (1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383–390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT (KS. MYÖS OECD:N OHJEASIAKIRJA 150 (6))

Androgeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) tavoin.

Antiandrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Antiestrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Kilpirauhasen toimintaa estävä vaikutus on kemikaalin kyky estää luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Kemikaali on aine tai seos.

Kehitystoksisuus: Pre-, peri-, postnataalisina, rakenteellisina tai toiminnallisina häiriöinä jälkeläisissä esiintyvän lisääntymistoksisuuden ilmeneminen.

Annostelu on yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

Annos on annostellun testikemikaalin määrä. Annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg päivässä) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina (ppm).

Ilmeinen toksisuus on yleistermi, jolla tarkoitetaan testikemikaalin antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden merkkejä. Niitä on oltava riittävästi vaaran arviointia varten, ja niiden on oltava sellaisia, että annetun annoksen suurentamisen voidaan odottaa aiheuttavan vakavia merkkejä myrkyllisyydestä ja todennäköisesti kuolleisuutta.

Hedelmällisyyden heikentyminen tarkoittaa uroksen tai naaraan lisääntymistoimintojen tai -kyvyn häiriöitä.

Emoille myrkylliset vaikutukset: Tiineinä oleviin naaraisiin kohdistuvat haittavaikutukset, joita esiintyy joko spesifisti (suora vaikutus) tai epäspesifisti (epäsuora vaikutus).

NOAEL on lyhennys englanninkielisistä sanoista no-observed-adverse-effect level (taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta). Se on siis suurin annos, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

Estrogeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) tavoin.

Lisääntymistoksisuus tarkoittaa haitallisia vaikutuksia, jotka kohdistuvat jälkeläisiin, ja/tai uroksen ja naaraan lisääntymistoimintojen tai -kyvyn heikentymistä.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

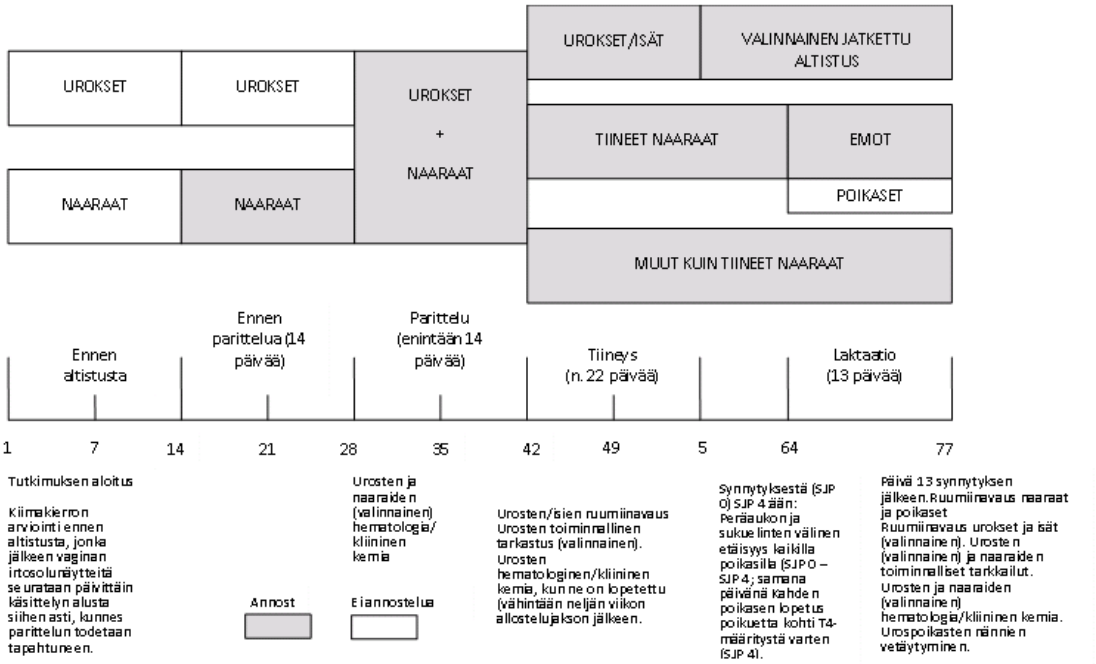
Kilpirauhasen kaltainen vaikutus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) tavoin.

Validointi on tieteellinen menettely, jonka tarkoituksena on luonnehtia testimenetelmän toiminnallisia vaatimuksia ja rajoituksia sekä osoittaa sen luotettavuus ja merkityksellisyys tiettyyn tarkoitukseen nähden.

▼**M8**

Lisäys 2

KAAVIO TESTIAIKATAULUSTA (TUTKIMUKSEN ENIMMÄISKESTO TÄYDEN 14 PÄIVÄN PITUISEN PARITTELUJAKSON PERUSTEELLA)



▼**M8**

Lisäys 3

YHTEENVETOTAULUKKO LISÄÄNTYMISEEN/KEHITYKSEEN KOHDISTUVISTA VAIKUTUKSISTA

HAVAINNOT	ARVOT				
Annostus (yksiköt)	0 (kontrolli)	…	…	…	…
Aloittaneet parit (N)					
Kiimakierto (vähintään keskimääräinen pituus ja epäsäännöllisten kiertojen tiheys)					
Naaraat, joissa merkkejä parittelusta (N)					
Tiineeksi tulleet naaraat (N)					
Hedelmöityspäivät 1–5 (N)					
Hedelmöityspäivät 6–… ([1]) (N)					
Tiineys ≤ 21 päivää (N)					
Tiineys = 22 päivää (N)					
Tiineys ≥ 23 päivää (N)					
Emot, joilla eläviä poikasia (N)					
Emot, joilla eläviä poikasia päivänä 4 synn. jälk. (N)					
Kiinnittyneet alkiot / emo (keskiarvo)					
Elävät poikaset / emo synnytyksessä (keskiarvo)					
Elävät poikaset / emo päivänä 4 (keskiarvo)					
Sukupuolijakauma (u/n) synnytyksessä (keskiarvo)					
Sukupuolijakauma (u/n) päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikueen paino synnytyksessä (keskiarvo)					
Poikueen paino päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikasen paino synnytyksessä (keskiarvo)					
Poikasen paino peräaukon ja sukupuolielinten välisen etäisyyden mittauksen yhteydessä (urosten ja naaraiden keskiarvot)					

▼**M8**

HAVAINNOT	ARVOT				
Annostus (yksiköt)	0 (kontrolli)	…	…	…	…
Poikasen peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys samana syntymänjälkeisenä päivänä, syntymä – päivä 4 (urosten ja naaraiden keskiarvot, merkitse SJP)					
Poikasen paino päivänä 4 (keskiarvo)					
Urospoikasten nännin vetäytyminen päivänä 13 (keskiarvo)					
Poikasen paino päivänä 13 (keskiarvo)					
POIKKEAVAT POIKASET					
Emot, joilla 0 poikkeavaa poikasta					
Emot, joilla 1 poikkeava poikanen					
Emot, joilla ≥ 2 poikkeavaa poikasta					
JÄLKELÄISTEN KUOLEMAT					
Prenataalit / kiinnittymisten jälkeiset tapaukset (kiinnittymiset miinus elävänä syntyneet poikaset)					
Naaraat, joilla 0 tapausta					
Naaraat, joilla 1 tapaus					
Naaraat, joilla 2 tapausta					
Naaraat, joilla ≥ 3 tapausta					
Postnataalit tapaukset (elävänä syntyneet poikaset miinus SJP:nä 13 elossa olevat poikaset)					
Naaraat, joilla 0 tapausta					
Naaraat, joilla 1 tapaus					
Naaraat, joilla 2 tapausta					
Naaraat, joilla ≥ 3 tapausta					

([1]) Parittelujakson viimeinen päivä

▼M8

B.64. YHDISTELMÄTESTI: TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS JA LISÄÄNTYMIS-/KEHITYSTOKSISUUDEN SEULONTATESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 422 (2016). Kemikaalien testaamiseen tarkoitettuja OECD:n testiohjeita tarkistetaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen mukaisesti. Seulontatestiohje 422 hyväksyttiin alun perin vuonna 1996, ja se perustui yhdistettyyn toistetun annoksen ja lisääntymis-/kehitystoksisuuden seulontatesti -protokollaan, jota käsiteltiin kahdessa asiantuntijakokouksessa, Lontoossa vuonna 1990 (1) ja Tokiossa vuonna 1992 (2).

2. Tässä testimenetelmässä yhdistetään lisääntymis-/kehitystoksisuuden seulontaa koskeva osa, joka perustuu jäsenmaissa kertyneeseen kokemukseen alkuperäisen menetelmän käyttämisessä nykyisten suurina määrinä tuotettavien kemikaalien yhteydessä ja kartoittaviin testeihin, joissa käytetään positiivisia kontrolliaineita (3) (4), sekä toistuvan annostelun toksisuutta koskeva osa, joka on OECD:n testiohjeen 407 (oraalinen toistuvan annostelun toksisuustutkimus (28 pv) jyrsijöillä, vastaa tämän liitteen B.7 lukua) mukainen.

3. Tätä testimenetelmää on päivitetty lisäämällä siihen hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkitykselliset päätetapahtumat sen jälkeen, kun OECD aloitti vuonna 1998 tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien testiohjeiden uudistamisen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten (5). Tässä yhteydessä testiohjetta 407 (joka vastaa tämän liitteen B.7 lukua) parannettiin vuonna 2008 lisäämällä siihen parametreja, jotka soveltuvat testikemikaalien endokriinisen toiminnan havaitsemiseen. Testiohjeen 422 päivittämisen tavoitteena oli sisällyttää seulontatestiohjeeseen joitakin hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkityksellisiä päätetapahtumia sellaisia tilanteita varten, kun altistusajat kattavat muutamia kehityksen kannalta herkkiä ajanjaksoja (syntymää edeltävät tai heti syntymän jälkeiset ajanjaksot).

4. Valitut hormonaalisten haitta-aineiden kannalta merkitykselliset uudet päätetapahtumat, jotka sisältyvät myös testiohjeeseen 443 (pidennetty yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskeva tutkimus, tämän liitteen B.56 luku), sisällytettiin testiohjeeseen 422 toteutettavuustutkimuksen perusteella. Tutkimuksessa käsiteltiin päätetapahtumien lisäämistä koskevia tieteellisiä ja teknisiä kysymyksiä ja mahdollisia muutoksia, joita testiasetelmaan pitäisi tehdä päätetapahtumien lisäämisen vuoksi (6).

5. Tämä testimenetelmä on suunniteltu tuottamaan tiettyjä tietoja, jotka koskevat testikemikaalin vaikutuksia uroksen ja naaraan lisääntymiskykyyn, kuten sukupuolirauhasten toimintaan, parittelukäyttäytymiseen, hedelmöittymiseen, conceptuksen kehittymiseen ja synnytykseen. Se ei ole vaihtoehtoinen eikä korvaa nykyisiä testimenetelmiä B.31, B.34, B.35 tai B.56.

ALUSTAVAT HUOMIOT

6. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin toksisia ominaisuuksia, toistettujen annosten aiheuttama oraalinen toksisuus voidaan määrittää sen jälkeen, kun akuutista testauksesta on saatu alustavia tietoja toksisuudesta. Tämä tutkimus antaa tietoa mahdollisista terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta melko lyhyen ajan kuluessa. Menetelmä koostuu tavanomaisesta toistuvan annostelun toksisuustutkimuksesta, jota voidaan käyttää sellaisten kemikaalien testaamisessa, joiden osalta 90 päivän tutkimus ei ole perusteltu (kun esimerkiksi tuotantomäärä ei ylitä tiettyjä rajoja), tai pitkäaikaisen tutkimuksen esitutkimuksena. Tutkimuksen toteuttamisessa on noudatettava periaatteita ja näkökohtia, jotka esitetään pääpiirteittäin OECD:n ohjeasiakirjassa 19 kliinisten oireiden tunnustamisesta, arvioimisesta ja soveltamisesta inhimillisinä toimenpiteinä turvallisuusarvioinneissa käytettäviin eläimiin (7).

▼M8

7. Lisäksi tutkimus koostuu lisääntymis-/kehitystoksisuuden seulontatestistä, ja siksi sitä voidaan käyttää alustavien tietojen saamiseksi mahdollisista vaikutuksista, jotka kohdistuvat uroksen ja naaraan lisääntymiskykyyn, kuten sukupuolirauhasten toimintaan, parittelukäyttäytymiseen, hedelmöittymiseen, conceptuksen kehittymiseen ja synnytykseen, joko testikemikaalien toksikologisten ominaisuuksien arvioinnin varhaisessa vaiheessa tai huolta aiheuttavien kemikaalien tutkimuksessa. Tällä testimenetelmällä ei saada täydellisiä tietoja kaikista lisääntymiseen ja kehitykseen liittyvistä näkökohdista. Testimenetelmällä voi vain rajallisesti havaita syntymää edeltäneen altistuksen vaikutuksia syntymän jälkeen tai sellaisia vaikutuksia, joita voi ilmaantua syntymän jälkeisen altistuksen aikana. (Esimerkiksi) päätetapahtumien valikoivuuden ja tutkimuksen lyhyen keston vuoksi tällä menetelmällä ei saada sellaista näyttöä, joka tukisi varmoja päätelmiä siitä, ettei lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvia vaikutuksia ole. Koska myöskään muihin lisääntymis-/kehitystoksisuustesteihin pohjautuvia tietoja ei ole, positiiviset tulokset ovat hyödyllisiä alustavassa vaaran arvioinnissa, ja ne voivat vaikuttaa päätöksiin lisätestauksen tarpeellisuudesta ja ajoituksesta.

8. Hormonitoimintaan liittyvien parametrien avulla saatuja tuloksia on tarkasteltava OECD:n asiakirjaan ”Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (8) (hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva toimintamalli) liittyvässä kontekstissa. Tässä asiakirjassa OECD:n parannettu testiohje 422 sisältyy tasolle 4 *in vivo* -testinä, jolla saadaan tietoa haittavaikutuksista hormonitoiminnan kannalta merkityksellisten päätetapahtumien osalta. Hormonitoimintaan liittyvää signaalia ei kuitenkaan pidetä yksinään riittävänä näyttönä siitä, että testikemikaali olisi hormonaalinen haitta-aine.

9. Tässä menetelmässä painotetaan neurologisia vaikutuksia nimenomaisena päätetapahtumana ja eläinten tarkan kliinisen havainnoinnin tarvetta, jotta tietoa saataisiin mahdollisimman paljon. Menetelmällä on tarkoitus tunnistaa mahdollisesti neurotoksisia kemikaaleja, jotka voivat vaatia tarkempia tutkimuksia tältä osin. Lisäksi menetelmällä voidaan saada perustietoja immunologisista vaikutuksista.

10. Koska muihin systeemistä toksisuutta, lisääntymis-/kehitystoksisuutta, neurotoksisuutta ja/tai immunotoksisuutta koskeviin tutkimuksiin pohjautuvia tietoja ei ole, positiiviset tulokset ovat hyödyllisiä alustavassa vaaran arvioinnissa, ja ne voivat vaikuttaa päätöksiin lisätestauksen tarpeellisuudesta ja ajoituksesta. Erityisen hyödyllinen tämä testi voi olla osana OECD:n seulontatietoaineistoa (Screening Information Data Set, SIDS) sellaisten olemassa olevien kemikaalien arvioinnissa, joista toksikologista tietoa on saatavilla niukasti tai joista sitä ei ole saatavilla lainkaan. Sitä voidaan käyttää myös vaihtoehtona kahdelle erilliselle testille, joissa tarkastellaan toistuvasta annostelusta johtuvaa toksisuutta (OECD:n testiohje 407, joka vastaa tämän liitteen B.7 lukua) ja lisääntymis-/kehitystoksisuutta (OECD:n testiohje 421, joka vastaa tämän liitteen B.63 lukua). Sitä voidaan käyttää myös annosalueen määritystutkimuksena laajemmissa lisääntymis-/kehitystutkimuksissa tai silloin, kun sitä pidetään muulloin tarpeellisena.

11. Yleensä oletetaan, että tiineiden ja muiden kuin tiineiden eläinten herkkyydessä on eroja. Siksi tässä yhdistelmätestissä voi olla vaikeampaa määrittää annostasot, jotka ovat asianmukaiset sekä yleisen systeemisen toksisuuden että nimenomaisen lisääntymis-/kehitystoksisuuden arvioinnin kannalta, verrattuna siihen, että kumpikin testi tehtäisiin erikseen. Lisäksi yleistä systeemistä toksisuutta koskevien testitulosten tulkinta voi olla vaikeampaa kuin silloin, kun tehdään erillinen toistuvan annostelun tutkimus, etenkin jos seerumiin liittyviä ja histopatologisia parametreja ei arvioida tutkimuksessa samaan aikaan. Näiden teknisten haasteiden vuoksi tämän yhdistetyn seulontatestin tekeminen

▼M8

edellyttää vankkaa kokemusta toksisuuden testaamisesta. Toisaalta yhdistelmätesti voi olla parempi keino erotella lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvat suorat vaikutukset niistä, jotka ovat toissijaisia muihin (systeemisiin) vaikutuksiin nähden, ja lisäksi yhdistelmätestissä tarvitaan vähemmän koe-eläimiä.

12. Tässä testissä annostelujakso on pidempi kuin tavanomaisessa 28 päivän mittaisessa toistuvan annostelun tutkimuksessa. Siinä käytetään kuitenkin vähemmän eläimiä kummankin sukupuolen ryhmässä kuin silloin, kun tavanomainen 28 päivän mittainen toistuvan annostelun tutkimus tehdään lisääntymis-/kehitystoksisuutta koskevan seulontatestin lisäksi.

13. Tässä testimenetelmässä testikemikaali annostellaan suun kautta. Jos käytetään muita altistusreittejä, menetelmään voi olla tarpeen tehdä muutoksia.

14. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

15. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

16. Testikemikaalia annetaan porrastettuina annoksina useille uros- ja naarasryhmille. Uroksille on annettava testikemikaalia vähintään neljä viikkoa suunniteltua lopettamispäivää edeltävään päivään saakka kyseinen päivä mukaan luettuna (ts. vähintään kaksi viikkoa ennen parittelua, parittelujakson aikana ja noin kaksi viikkoa parittelun jälkeen). Koska parittelua edeltävä annostelujakso on urosten osalta lyhyt, hedelmällisyys ei välttämättä ole erityisen herkkä indikaattori kiveksiin kohdistuvasta toksisuudesta. Sen vuoksi kivesten tarkka histologinen tutkimus ontärkeä. Parittelua edeltävää kahden viikon annostelujaksoa, jota seuraa parittelun/hedelmällisyyden tarkkailu, ja vähintään neljä viikkoa kestävä kokonaisannostelujakso katsotaan riittäväksi, jotta voidaan havaita suurin osa urosten hedelmällisyyteen ja spermatogeneesiin kohdistuvista vaikutuksista.

17. Naaraille on annettava testikemikaalia tutkimuksen koko keston ajan. Niille testikemikaalia annostellaan siis kahden viikon ajan ennen parittelua (tavoitteena on kattaa vähintään kaksi täyttä kiimakiertoa), hedelmöittymisen vaihteleva ajankohta, tiineyden kesto ja vähintään 13 päivää synnytyksen jälkeen suunniteltua lopettamispäivää edeltävään päivään saakka kyseinen päivä mukaan luettuna.

18. Tutkimuksen kesto sopeutumisvaiheen ja annostelua edeltävän kiimakierron arvioinnin jälkeen määräytyy naaraan lisääntymiskyvyn mukaan, ja se on noin 63 päivää [vähintään 14 päivää ennen parittelua, (enintään) 14 päivän parittelujakso, 22 päivän tiineys ja 13 päivän imetysaika].

19. Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin päivittäin toksisuusoireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

▼M8

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

20. Tässä testimenetelmässä on suunniteltu käytettävän rottaa koe-eläimenä. Jos tässä testiohjeessa 422 määritettyjä parametreja tutkitaan muilla jyrsijöillä, sille on esitettävä yksityiskohtainen perustelu. Kansainvälisessä validointiohjelmassa, jossa tutkittiin hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemista testiohjeen 407 mukaisesti, rotta oli ainoa käytetty laji. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen tai joilla tiedetään esiintyvän kehityshäiriöitä, ei tule käyttää. Koe-eläiminä on käytettävä terveitä pariutumattomia eläimiä, joilla ei ole tehty aikaisempia kokeita. Koe-eläinten laji, kanta, sukupuoli, paino ja ikä on oltava tiedossa. Käytettävien eläinten paino ei saisi juurikaan vaihdella eikä ylittää ±20:tä prosenttia kummankaan sukupuolen keskipainosta kokeen alussa. Mikäli tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen tai koko sukupolven tutkimuksen esitestinä, molemmissa tutkimuksissa tulee mieluiten käyttää samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

21. Kaikissa menettelyissä on noudatettava laboratorioeläinten hoitoa koskevia paikallisia vaatimuksia. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °). Suhteellisen kosteuden olisi oltava vähintään 30 prosenttia eikä mielellään yli 70 prosenttia muulloin kuin tilan puhdistuksen aikana. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testikemikaalin ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna.

22. Eläimet voidaan pitää häkeissä muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä tai yksittäin, jos se on tieteellisesti perusteltua. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä. Parituksen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Tiineet naaraat on laitettava häkkiin yksittäin, ja niille on annettava pesämateriaaleja. Imettävät naaraat laitetaan häkkiin yksittäin poikastensa kanssa.

23. Eläinten ravinto on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta. Näyte ruokavaliosta on säilytettävä siihen saakka, kunnes tutkimusraportti on valmis.

Eläinten valmistelu

24. Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet satunnaistetaan ja jaetaan altistusryhmiin ja häkkeihin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet merkitään yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-oloihin.

Annosten valmistelu

25. Testikemikaali suositellaan annosteltavaksi suun kautta, ellei muita annostelureittejä pidetä asianmukaisempina. Jos valitaan suun kautta annostelu, testikemikaali annetaan yleensä ruokintaletkun kautta; vaihtoehtoisesti testikemikaalit voidaan kuitenkin antaa myös ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna.

26. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muihin kantaja-aineisiin perustuvia liuoksia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiliteetti kantaja-aineessa on määritettävä.

▼M8

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

27. On suositeltavaa, että jokaisessa ryhmässä on aluksi vähintään 10 urosta ja 12–13 naarasta. Naaraiden kiimakierto arvioidaan ennen altistusta, ja eläimiä, joiden osalta tyypillistä 4–5 päivän kiertoa ei voida vahvistaa, ei oteta mukaan tutkimukseen. Jotta kuhunkin ryhmään saadaan varmasti 10 naarasta, niitä pitää olla aluksi enemmän kuin uroksia. Lukuun ottamatta selviä toksisia vaikutuksia kuhunkin ryhmään oletetaan saatavan vähintään kahdeksan tiineenä olevaa naarasta, mikä on yleensä pienin hyväksyttävä tiineiden naaraiden määrä yhdessä ryhmässä. Tavoitteena on saada tarpeeksi tiineystapauksia ja poikasia, jotta voidaan tehdä luotettava arvio testikemikaalin mahdollisesta vaikutuksesta hedelmällisyyteen, tiineyteen, emon ja poikasen käytökseen sekä F_1-sukupolven kasvuun ja kehitykseen hedelmöityksestä synnytyksen jälkeiseen päivään 13 saakka. Jos eläimiä lopetetaan kokeen aikana, testiin on otettava alussa sen verran enemmän eläimiä kuin niitä lopetetaan ennen tutkimuksen päättymistä. Myös ylimääräisen, kymmenestä eläimestä (viisi kumpaakin sukupuolta) koostuvan satelliittiryhmän käyttöä voidaan harkita verrokkiryhmässä ja suurimman annoksen ryhmässä, jotta systeemisten toksisten vaikutusten korjaantuvuutta, jatkuvuutta ja ilmaantumisen viivästymistä voidaan havainnoida vähintään 14 päivän ajan käsittelyn jälkeen. Satelliittiryhmien eläimiä ei pariuteta, eikä niitä näin ollen käytetä lisääntymis-/kehitystoksisuuden arviointiin.

Annostelu

28. Yleensä tulee käyttää vähintään kolmea testiryhmää ja yhtä verrokkiryhmää. Jos sopivia tietoja yleisestä toksisuudesta ei ole saatavilla, voidaan tehdä annosalueen määritystesti (samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä käyttäen) käytettävien annosten määrittämisen helpottamiseksi. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testikemikaalin annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

29. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki saatavilla olevat aikaisemmat toksisuustiedot ja (toksiko)kineettiset tiedot. Lisäksi on otettava huomioon, että tiineiden ja muiden kuin tiineiden eläinten herkkyydessä voi olla eroja. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa toksisia vaikutuksia mutta ei kuolemaa tai selviä kärsimyksiä. Sen jälkeen annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla. Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin 10-kertaisia).

30. Jos havaitaan yleistä toksisuutta (kuten painonlaskua, maksaan, sydämeen, keuhkoihin tai munuaisiin kohdistuvia vaikutuksia jne.) tai muita muutoksia, jotka eivät ole välttämättä toksisia (esimerkiksi ravinnonoton vähentymistä, maksan suurenemista), hormonitoiminnan kannalta herkkiin päätetapahtumiin kohdistuvia vaikutuksia on tulkittava varauksellisesti.

Raja-annostesti

31. Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg painokiloa kohti / vrk tai jota annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna vastaava prosenttiosuus (painomääritysten perusteella), tehdyssä oraalisessa testissä, joka on tehty tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita myrkyllisiä vaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus

▼M8

useilla annostasoilla ei ehkä ole välttämätön. Raja-annostestiä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa. Muiden antotapojen kuten inhalaation tai ihoapplikaation osalta suurin mahdollinen altistus määräytyy yleensä testikemikaalien fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien perusteella.

Annostelu

32. Eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin seitsemänä päivänä viikossa. Jos testikemikaali annetaan ruokintaletkun kautta, se on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin yhdellä kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa olla yli 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksena ovat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Poikkeuksena tästäovat ärsyttävät tai syövyttävät testikemikaalit, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Testikemikaalin määrän vaihtelu on minimoitava pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla varmistetaan tilavuudeltaan sama nestemäärä.

33. Kun testikemikaalit annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalin määrät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annostaso; käytetty tapa on mainittava. Jos testikemikaali annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava vähintään viikoittain siten, että annostaso pysyy samana eläimen painoon nähden. Mikäli yhdistelmätutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen tai täydellisen lisääntymistoksisuustutkimuksen esitestinä, kummassakin tutkimuksessa on käytettävä samanlaista ruokavaliota.

Testiaikataulu

34. Testikemikaalia on alettava antaa kummallekin sukupuolelle vähintään kaksi viikkoa ennen parittelua sen jälkeen, kun eläimiä on sopeutettu vähintään viisi päivää ja kun eläimistä on seulottu ne naaraat, joiden kiimakierto on normaali (altistusta edeltävällä kahden viikon jaksolla). Tutkimus on aikataulutettava siten, että kiimakierron arviointi alkaa pian sen jälkeen, kun eläimet ovat saavuttaneet täyden sukukypsyyden. Eri rottakannoissa ja eri laboratorioissa voi olla tässä vaihtelua; esimerkiksi Sprague-Dawley-rotat tulevat sukukypsiksi 10-viikkoisina, Wistar-rotat taas noin 12-viikkoisina. Poikineet emot on lopetettava päivänä 13 synnytyksen jälkeen tai pian sen jälkeen. Jotta emot voivat paastota ennen verinäytteen ottamista (jos tämä vaihtoehto on ensisijainen), emoja ja niiden jälkeläisiä ei välttämättä tarvitse lopettaa samana päivänä. Syntymäpäivä (ts. kun synnytys on tapahtunut) määritellään synnytyksen jälkeiseksi päiväksi 0. Naaraat, joiden osalta parittelua ei voida todeta tapahtuneen, lopetetaan 24–26 päivää parittelujakson viimeisen päivän jälkeen. Annostelua jatketaan kummallekin sukupuolelle parittelujakson aikana. Uroksille annostelua on jatkettava parittelujakson jälkeen vähintään siihen saakka, kunnes annostelujakso on kokonaisuudessaan vähintään 28 päivää. Sen jälkeen urokset lopetetaan. Vaihtoehtoisesti ne pidetään elossa ja annostelua jatketaan mahdolliseen toiseen parittelukertaan asti, jos sitä pidetään tarkoituksenmukaisena.

35. Annostelua tiineeksi tulleille naaraille on jatkettava tiineyden ajan ja vähintään synnytyksen jälkeiseen päivään 13 asti, kyseinen päivä mukaan luettuna, tai lopettamista edeltävään päivään saakka. Tutkimuksissa, joissa testikemikaalia annostellaan hengitysteiden tai ihon kautta, annostelua on jatkettava vähintään tiineyden päivään 19 saakka, kyseinen päivä mukaan luettuna, ja annostelua on jatkettava mahdollisimman pian, viimeistään kuitenkin synnytyksen jälkeisenä päivänä (SJP) 4.

▼M8

36. Niitä satelliittiryhmän eläimiä, jotka on varattu seurantahavaintoihin (jos tutkimuksessa tehdään niitä), ei pariuteta. Niitä on pidettävä ilman altistusta vähintään 14 päivää ensimmäisen suunnitellun emojen lopettamispäivän jälkeen, jotta voidaan todeta toksisten vaikutusten ilmaantuneen viipeellä, pysyneen tai korjaantuneen.

37. Lisäyksessä 2 on kaavio testiaikataulusta.

Kiimakierrot

38. Kiimakiertoja on seurattava ennen altistuksen aloittamista, jotta tutkimukseen voidaan valita naaraita, joiden kiimakierto on säännöllinen (ks. 27 kohta). Myös irtosolunäytteitä on seurattava päivittäin altistusjakson alkamisesta siihen saakka, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen. Jos annostelun aloittamisen epäillään aiheuttavan akuutteja stressireaktioita, jotka voivat muuttaa kiimakiertoja, laboratoriot voivat altistaa koe-eläimet testikemikaalille kahden viikon ajaksi ja ottaa niiltä irtosolunäytteet päivittäin, jotta ne voivat seurata kiimakiertoa vähintään kahden viikon ajan parittelua edeltävällä jaksolla. Seurantaa on jatkettava parittelujaksolla siihen saakka, että parittelun voidaan todeta tapahtuneen. Vagina-/kohdunkaulasolujen ottamisessa on pyrittävä välttämään limakalvon vaurioittamista, sillä se voi aiheuttaa valetiineyden (8) (9).

Paritus

39. Tässä tutkimuksessa on käytettävä yleensä 1:1-parittelua (yhden uroksen ja yhden naaraan parittelu). Poikkeuksia voidaan tehdä, jos yksittäisiä uroksia kuolee. Naaras on laitettava häkkiin saman uroksen kanssa, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen tai kunnes kaksi viikkoa on kulunut. Naaraat on tutkittava joka aamu sperman tai vaginatulpan havaitsemiseksi. Tiineyspäivä 0 määritellään päiväksi, jolloin todisteet parittelusta vahvistetaan (vaginatulpan muodostuminen tai spermaa havaitaan). Jos parittelua ei tapahdu, voidaan harkita naaraan uutta paritusta saman ryhmän hedelmällisiksi todettujen urosten kanssa.

Poikueiden koko

40. Päivänä 4 synnytyksen jälkeen kunkin poikueen kokoa voidaan mukauttaa poistamalla siitä poikasia satunnaisvalinnalla siten, että yhteen poikueeseen jää neljä tai viisi poikasta kumpaakin sukupuolta sen mukaan, mikä on käytetyn rottakannan normaali poikuekoko. Kahdesta ylimääräisestä poikasesta on otettava verinäytteet, jotka yhdistetään ja joita käytetään seerumin T4-pitoisuuden määrittämiseen. Poikasten valikoiva eliminointi esimerkiksi painon tai peräaukon ja sukupuolielinten välisen etäisyyden perusteella ei ole tarkoituksenmukaista. Jos uros- tai naaraspuolisten poikasten määrä on sellainen, että poikueeseen ei jää neljää tai viittä poikasta kumpaakin sukupuolta, voidaan tehdä osittaismukautus (esimerkiksi kuusi urosta ja neljä naarasta). Poikasia ei eliminoida poikueesta, jos poikueen koko supistuisi karsintatavoitetta pienemmäksi (8 tai 10 poikasta / poikue). Jos käytettävissä on vain yksi poikanen karsimistavoitetta enemmän, eliminoidaan vain yksi poikanen, ja siltä otetaan verinäyte mahdollisia seerumin T4-määrityksiä varten.

41. Jos poikueen kokoa ei mukauteta, jokaisesta poikueesta lopetetaan kaksi poikasta päivänä 4 syntymän jälkeen, ja niiltä otetaan verinäytteet seerumin kilpirauhashormonipitoisuuden mittausta varten. Mikäli mahdollista, näiden kahden poikasen tulisi olla naaraita, jotta urospuolisista poikasista voidaan tutkia nännien vetäytyminen, mutta tämä ei saa johtaa siihen, ettei poikueeseen jäisi naaraspuolisia poikasia arvioitavaksi tutkimuksen päättyessä. Yhtään poikasta ei eliminoida, jos poikueen koko pienenisi alle 8 tai 10 poikaseen / poikue (käytetyn rottakannan normaalin poikuekoon mukaan). Jos käytettävissä on vain yksi poikanen normaalia poikuekokoa enemmän, eliminoidaan vain yksi poikanen, ja siltä otetaan verinäyte mahdollisia seerumin T4-määrityksiä varten.

▼M8

Havainnot

42. Kliinisiä yleishavaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä ja ottaen huomioon, että odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Eläinten terveydentila on kirjattava. Eläinten sairastavuus ja kuolleisuus tarkistetaan vähintään kahdesti päivässä.

43. Kaikkia poikasia saaneita eläimiä on havainnoitava kliinisesti seikkaperäisesti kerran ennen ensimmäistä altistuskertaa (samaa koe-eläintä koskevia vertailuja varten) ja sen jälkeen vähintään kerran viikossa. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella vakioalueella mieluiten samaan kellonaikaan joka päivä. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. Vaihtelut koeolosuhteissa on pyrittävä minimoimaan, ja havainnoijien on mieluiten oltava annostelusta tietämättömiä henkilöitä. Kirjattavia havaintoja ovat mm. ihon, karvapeitteen, silmien ja limakalvojen muutokset sekä sisäeritteiden, kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko ja epätavallinen hengitys) esiintyminen. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen), vaikea tai pitkittynyt synnytys tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (10).

44. Yhden kerran tutkimuksen aikana viideltä urokselta ja viideltä naaraalta, jotka valitaan satunnaisesti kustakin ryhmästä, on arvioitava aistien reaktiivisuus erityyppisille ärsykkeille (ts. kuulon, näön tai asentotunnon kautta välittyville ärsykkeille) (8) (9) (11), tarttumaotteen voimakkuus (12) ja motorinen toiminta (13). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittauksissa mainittuja toimenpiteitä voidaan käyttää. Urosten osalta nämä toiminnalliset havainnot on tehtävä annostelujakson loppupuolella hieman ennen suunniteltua lopettamista mutta ennen hematologisia tai kliinis-biokemiallisia määrityksiä varten tarvittavien verinäytteiden ottamista (ks. 53–56 kohta ja alaviite 1). Naaraiden tulee olla fysiologisesti samanlaisessa tilassa näiden toiminnallisten testien aikana, ja ne olisi mieluiten testattava kerran imetyksen viimeisellä viikolla (ts. IP 6–13) hieman ennen suunniteltua lopetusta. Mahdollisuuksien mukaan emoja ja poikasia tulisi pitää erossa toisistaan vain hyvin lyhyitä aikoja.

45. Kerran tutkimuksen loppupuolella tehtäviä toiminnallisia havaintoja ei tarvitse tehdä, jos kyseessä on myöhemmän subkroonisen (90 päivän) tutkimuksen tai pitkäaikaistutkimuksen esitutkimus. Tällöin toiminnalliset havainnot tehdään seurantatutkimuksessa. Toisaalta tästä toistuvan annostelun tutkimuksesta saatavat toiminnallisia havaintoja koskevat tiedot voivat helpottaa annostasojen valintaa myöhempää subkroonista tutkimusta tai pitkäaikaistutkimusta varten.

46. Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei myöskään tarvitse tehdä ryhmillä, joissa muutoin ilmenee merkkejä myrkyllisyydestä laajuudessa, joka häiritsisi merkitsevästi toiminnallisten kokeiden suorittamista.

47. Tiineyden kesto on kirjattava, ja se lasketaan tiineyden päivästä 0 alkaen. Jokainen poikue on tutkittava mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen, jotta voidaan määrittää poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena ja elävänä syntyneiden poikasten määrä, pienikasvuisten poikasten lukumäärä (poikaset, jotka ovat huomattavasti pienempiä kuin verrokkiryhmän poikaset) ja selvästi näkyvät epämuodostumat.

▼M8

48. Elävät poikaset on laskettava ja niiden sukupuoli on määritettävä ja poikueet on punnittava 24 tunnin kuluessa synnytyksestä (päivänä 0 tai 1 synnytyksen jälkeen) ja vähintään päivänä 4 ja 13 synnytyksen jälkeen. Poikasia saaneita eläimiä koskevien havaintojen lisäksi (ks. 43 ja 44 kohta) on kirjattava myös poikasten kaikenlainen poikkeava käyttäytyminen.

49. Jokaisen poikasen peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys on mitattava samana synnytyksen jälkeisenä päivänä välillä SJP 0 – SJP 4. Poikasen paino on punnittava samana päivänä, kun peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys mitataan, ja tämä mittaus olisi normalisoitava poikasen koon mittauksen perusteella, mieluiten kuutiojuureen painosta (14). Urospuolisten poikasten nännien/nännipihojen määrä on laskettava SJP:nä 12 tai 13 OECD:n ohjeasiakirjassa 151 suositellun mukaisesti (15).

Eläimen paino ja ravinnon/veden kulutus

50. Urokset ja naaraat on punnittava ensimmäisenä annostelupäivänä, vähintään kerran viikossa sen jälkeen ja tutkimuksen päättyessä. Tiineyden aikana naaraat on punnittava päivinä 0, 7, 14 ja 20 sekä 24 tunnin kuluessa synnytyksestä (päivänä 0 tai 1 synnytyksen jälkeen) ja vähintään päivänä 4 ja 13 synnytyksen jälkeen. Havainnot raportoidaan erikseen kustakin täysikasvuisesta eläimestä.

51. Ravinnon kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ennen parittelua sekä tiineyden ja imetyksen aikana. Ravinnon kulutuksen mittaus parittelujakson aikana ei ole pakollista, mutta sen voi tehdä. Myös vedenkulutus näiden jaksojen aikana on mitattava, jos testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna.

Hematologia

52. Seuraavat hematologiset tutkimukset on tehtävä kerran tutkimuksen aikana viidellä uroksella ja viidellä naaraalla, jotka valitaan satunnaisesti kustakin ryhmästä: hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, retikulosyytit, leukosyyttien kokonaismäärä ja erittelylaskenta, trombosyyttien määrä ja veren hyytymisajan/-potentiaalin mittaus. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalilla tai sen oletetuilla metaboliiteilla on tai epäillään olevan hapettavia ominaisuuksia, ovat methemoglobiinipitoisuus ja Heinzin kappaleet.

53. Verinäytteet on otettava määrätystä paikasta. Naaraiden on oltava fysiologisesti samanlaisessa tilassa näytteenoton aikana. Jotta vältetään käytännön hankaluudet, jotka liittyvät tiineyden alkamisen vaihteluun, naaraiden verinäytteet voidaan ottaa parittelua edeltävän jakson lopussa vaihtoehtona sille, että ne otetaan juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Urosten verinäytteet on otettava mieluiten juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Vaihtoehtoisesti verinäytteet voidaan ottaa uroksilta myös parittelua edeltävän jakson lopussa, jos niin tehtiin myös naaraiden kanssa.

54. Verinäytteet on säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa.

Kliininen biokemia

55. Kliinisen biokemian määritykset tärkeimpien myrkyllisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan jokaisesta ryhmästä valitulta viideltä urokselta ja viideltä

▼M8

naaraalta. On suositeltavaa, että eläimet paastoaisivat yli yön ennen verinäytteiden ottoa ([1]). Plasma- ja seerumikokeisiin tulee sisällyttää natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, kreatiniini, kokonaisproteiini ja albumiini, vähintään kaksi hepatosellulaarisia vaikutuksia osoittavaa entsyymiä (kuten alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi ja sorbitolidehydrogenaasi) ja sappihapot. Muiden entsyymien (maksasta tai muualta peräisin olevien) ja bilirubiinin mittauksista voidaan saada hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa.

56. Verinäytteet määrätystä paikasta otetaan seuraavan aikataulun mukaan:

— vähintään kahdelta poikaselta jokaisesta poikueesta päivänä 4 syntymän jälkeen, jos se on mahdollista poikasten lukumäärän perusteella (ks. 40–41 kohta)

— kaikilta emoilta ja vähintään kahdelta poikaselta jokaisesta poikueesta tutkimuksen päättyessä päivänä 13 ja

— kaikilta täysikasvuisilta uroksilta tutkimuksen päättyessä.

Kaikki verinäytteet on säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa. Päivänä 13 otetuista poikasten ja täysikasvuisten urosten verinäytteistä määritetään kilpirauhashormonien (T4) pitoisuus seerumissa. Emojen ja päivänä 4 poikasilta otettujen verinäytteiden T4-pitoisuus määritetään, jos se on tarpeen. Myös muiden hormonien pitoisuuksia voidaan määrittää, jos se on tarpeen. Poikasten verinäytteet voidaan yhdistää poikueittain kilpirauhashormonin määritystä varten. Kilpirauhashormonit (T4 ja THS) on mitattava mieluiten kokonaispitoisuutena.

57. Valinnaisesti viideltä satunnaisesti valitulta urokselta jokaisesta ryhmästä voidaan ottaa ajoitetut virtsanäytteet tutkimuksen viimeiseltä viikolta, ja näytteistä voidaan tehdä seuraavat määritykset: ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH, valkuainen, glukoosi ja veri ja/tai verisolut.

58. Lisäksi on harkittava yleistä kudosvauriota osoittavien seerumissa esiintyvien merkkiaineiden määritystä. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalin tunnetut ominaisuudet voivat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan tähän liittyviin metaboliaprofiileihin, ovat kalsium, fosfaatti, triglyseridien ja glukoosin paastoarvot, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliiniesteraasi. Nämä on määritettävä tapauskohtaisesti.

59. Seuraavat seikat saattavat vaikuttaa hormonimääritysten vaihteluun ja absoluuttisiin pitoisuuksiin:

— lopettamisaika hormonipitoisuuksien vuorokausivaihtelun takia

([1]) Yön yli paastoaminen on suositeltavaa monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksissa. Tärkein syy tälle suositukselle on se, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta yön yli paastoaminen voi häiritä (tiineiden) eläinten yleistä metaboliaa, imetys- ja hoivakäyttäytymistä ja etenkin ruokintatutkimuksissa päivittäistä altistusta testikemikaalille. Jos eläin paastoaa yön yli, kliiniset biokemialliset määritykset tulee tehdä urosten osalta neljännellä tutkimusviikolla tehtävien toiminnallisten havaintojen jälkeen. Emoja on pidettävä häkissä yksi ylimääräinen päivä sen jälkeen, kun poikaset on poistettu häkistä esimerkiksi SJP:nä 13. Emojen on paastottava yön yli imetyspäivän 13–14 jälkeen, ja kliinis-biokemiallisten parametrien määrityksessä on käytettävä terminaaliverinäytteitä.

▼**M8**

— lopettamistapa: on vältettävä aiheuttamasta eläimille turhaa stressiä, joka voi vaikuttaa hormonipitoisuuksiin

— hormonimääritysten testipaketit, joiden standardikäyrät voivat vaihdella.

60. Plasmanäytteet, jotka on nimenomaisesti tarkoitettu hormonimäärityksiin, on otettava samaan aikaan päivästä. Hormonipitoisuuksien analysoimisesta saadaan toisenlaisia numeerisia arvoja kuin erilaisten kaupallisten testipakettien avulla.

61. Jos aiemmat lähtötason tiedot eivät riitä, hematologiset ja kliiniset biokemialliset muuttujat on määritettävä ennen annostelun aloittamista tai mieluiten ryhmällä eläimiä, jotka eivät kuulu koeryhmiin. Naaraiden osalta tiedot on saatava imettävistä eläimistä.

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

62. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Erityistä huomiota on kiinnitettävä lisääntymiselimiin. Kiinnittymiskohtien määrä on kirjattava. Irtosolunäytteet on tutkittava ruumiinavauspäivänä, jotta kiimakierron vaihe voidaan määrittää ja jotta voidaan mahdollistaa korrelaatio naaraan lisääntymiselinten histopatologisen tutkimuksen kanssa.

63. Kaikkien täysikasvuisten urospuolisten eläinten kiveksistä ja lisäkiveksistä sekä eturauhasesta ja rakkularauhasesta sekä niiden etuosista kokonaisuudessaan on poistettava kaikki ylimääräinen kudos tarvittaessa, ja niiden märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi. Lisäksi elimistä voidaan valinnaisesti punnita esimerkiksi levator ani- ja bulbocavernosus-lihaskompleksi, Cowperin rauhaset ja terska uroksilta sekä parilliset munasarjat (märkäpaino) ja kohtu (myös kohdunkaula) naarailta. Jos nämä päätetään punnita, se on tehtävä mahdollisimman pian dissektion jälkeen. Kaikkien täysikasvuisten eläinten munasarjat, kivekset, lisäkivekset, avustavat sukupuolielimet ja kaikki elimet, joissa on makroskooppisia leesioita, on säilöttävä.

64. Kaikkien täysikasvuisten urosten ja naaraiden sekä jokaisesta poikueesta yhden urospoikasen ja yhden naaraspoikasen (päivä 13) kilpirauhaset on säilöttävä tarkoituksenmukaisimmalla kiinnitysaineella myöhemmin tehtäväksi suunniteltua histopatologista tutkimusta varten. Kilpirauhasen paino voidaan määrittää kiinnittämisen jälkeen. Puhdistus on tehtävä hyvin varovasti ja vasta kiinnittämisen jälkeen kudosvaurioiden välttämiseksi. Kudosvauriot voivat haitata histopatologista analyysia. Verinäytteet tulee ottaa nimetystä kohdasta juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Näytteet tulee säilyttää asianmukaisissa olosuhteissa (ks. 56 kohta).

▼M8

65. Lisäksi vähintään viiden täysikasvuisen uroksen ja naaraan, jotka valitaan satunnaisesti jokaisesta ryhmästä (lukuun ottamatta niitä, jotka on löydetty kuolemaisillaan ja/tai lopetettu ennen tutkimuksen päättymistä), maksasta, munuaisista, lisämunuaisista, kateenkorvasta, pernasta, aivoista ja sydämestä on poistettava kaikki ylimääräinen kudos tarvittaessa, ja niiden märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen välttämiseksi. Seuraavat kudokset on säilöttävä sellaiseen kiinnitysaineeseen, joka sopii parhaiten kyseiselle kudostyypille ja myöhemmin tehtäväksi suunniteltuun histopatologiseen tutkimukseen: kaikki silmin havaittavat vauriot, aivot (edustavat alueet, myös iso- ja pikkuaivot ja aivosilta), selkäydin, silmä, mahalaukku, ohutsuoli, paksusuoli (myös Peyerin levyt), maksa, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, kateenkorva, henkitorvi ja keuhkot (säilötään puhaltamalla keuhkot täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla ne sitten kiinnitysaineeseen), sukurauhaset (kivekset ja munasarjat), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, eturauhanen ja rakkularauhanen sekä niiden etuosat), vagina, virtsarakko, imusolmukkeet (proksimaalisimman imusolmukkeen lisäksi on otettava vielä toinen imusolmukelaboratorion kokemuksen perusteella sopivasta paikasta (16)), ääreishermo (lonkka- tai säärihermo) mieluiten läheltä lihasta, luurankolihas ja luu sekä osa luuydintä (leike tai vaihtoehtoisesti tuore luuydinaspiraatti). Kivekset suositellaan kiinnitettävän upottamalla ne Bouinin tai muunneltuun Davidsonin kiinnitysaineeseen (16) (17) (18); formaliinikiinnitystä ei suositella näille kudoksille. Tunica albugineaan on tehtävä varovasti pieni reikä neulalla elimen molempiin päihin, jotta kiinnitysaine pääsee tunkeutumaan sisään nopeasti. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella voi olla tarpeen tutkia myös muita kudoksia. Myös elimet, joita pidetään testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköisinä kohde-eliminä, on säilöttävä.

66. Seuraavista kudoksista voi löytyä tärkeitä merkkejä hormonitoimintaan liittyvistä vaikutuksista: sukurauhaset (munasarjat ja kivekset), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, rakkularauhanen ja sen etuosa, dorsolateraalinen ja ventraalinen eturauhanen), vagina, aivolisäke, uroksen rintarauhanen ja lisämunuainen. Uroksen rintarauhasten muutoksia ei ole dokumentoitu riittävästi, mutta tämä parametri voi olla hyvin herkkä aineille, joilla on estrogeenisia vaikutuksia. Niiden elinten/kudosten, joita ei ole lueteltu kohdassa 65, havainnointi ei ole pakollista.

67. Kuolleet poikaset ja päivänä 13 synnytyksen jälkeen tai pian sen jälkeen lopetetut poikaset on tutkittava huolellisesti ulkoisesti selvästi näkyvien epämuodostumien varalta. Huomiota on kiinnitettävä erityisesti ulkoisiin lisääntymiselimiin, joista on tutkittava, näkyykö niissä merkkejä muuttuneesta kehityksestä.

Histopatologia

68. Kaikille verrokkiryhmään ja suuriannoksiseen ryhmään kuuluneiden eläinten säilötyille elimille ja kudoksille on tehtävä perusteellinen histopatologinen tutkimus (erityistä huomiota on kiinnitettävä spermatogeneesiin urosten sukupuolirauhasissa ja kivesten interstitiaalisolujen rakenteeseen). Poikasten ja muiden täysikasvuisten eläinten kilpirauhanen voidaan tutkia, jos se on tarpeen. Histopatologiset tutkimukset tulee tehdä myös kaikille muiden annostusryhmien eläimille, jos altistukseen liittyviä muutoksia havaitaan suuren annoksen ryhmässä. Histopatologiaa koskevissa ohjeissa (10) on tarkempia tietoja endokriinisten kudosten dissektiosta, kiinnittämisestä, mikrotomiasta ja histopatologiasta.

69. Kaikki suuret leesiot on tutkittava. NOAEL-arvon määrittämisen tueksi on tutkittava myös muiden annosryhmien kohde-elimet, etenkin niistä ryhmistä, joissa havaittavia haittavaikutuksia ei vaikuttaisi aiheutuneen.

▼M8

70. Mahdolliseen satelliittiryhmään kuuluvilta eläimiltä tulee tutkia histopatologisesti sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

71. Tuloksina on esitettävä yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot. Lisäksi kaikki tiedot on esitettävä taulukossa, jossa on eritelty testiryhmittäin eläinten lukumäärä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, kuoleman tai inhimillisistä syistä lopettamisen ajankohta, hedelmällisten eläinten lukumäärä, tiineiden naaraiden lukumäärä, niiden eläinten määrä, joissa toksisuusvaikutuksia on havaittavissa, kuvaus havaituista toksisuuden merkeistä sekä mahdollisten toksisten vaikutusten alkamisaika, kesto ja vakavuus, histopatologisten muutosten tyypit sekä kaikki asiaankuuluvat tiedot poikueesta. Lisäyksessä 3 on malli yhteenvetotaulukosta, joka on osoittautunut erittäin hyödylliseksi lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa.

72. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastomenetelmällä. Verrattaessa vaikutusta pitoisuusalueen mukaan on vältettävä monien t-testien käyttöä. Tilastomenetelmät tulee valita tutkimusasetelman suunnitteluvaiheessa. Peräaukon ja sukupuolielinten välistä etäisyyttä ja nännien vetäytymistä koskevan tilastoanalyysin on perustuttava yksilökohtaisiin tietoihin poikasista, ja poikueeseen kohdistuvat vaikutukset on otettava huomioon. Tarvittaessa poikue on analysoitava yksikkö. Poikasen painoa koskevan tilastoanalyysin on perustuttava yksilökohtaisiin tietoihin poikasista, ja poikueeseen kohdistuvat vaikutukset on otettava huomioon. Tutkimuksen rajallisuuden vuoksi testien ”merkitsevyyttä” tarkastelevista tilastoanalyyseista on varsin vähän hyötyä monien päätetapahtumien, etenkin lisääntymiseen liittyvien päätetapahtumien, osalta. Jotkin eniten käytetyistä menetelmistä, varsinkin keskilukujen määrittämisessä käytetyt parametritestit, eivät ole tarkoituksenmukaisia. Jos tilastoanalyyseja tehdään, valitun menetelmän on oltava tutkitun muuttujan jakauman kannalta asianmukainen, ja se on valittava ennen tutkimuksen aloittamista.

Tulosten arviointi

73. Tämän toksisuustutkimuksen löydökset on arvioitava havaittujen vaikutusten, ruumiinavauksen ja mikroskopialöydösten avulla. Arvioinnissa tulee todeta testikemikaalin annoksen ja poikkeavuuksien – mukaan lukien vakavat vauriot, tietyt kohde-elimet, hedelmättömyys, kliiniset poikkeavuudet, vaikutukset lisääntymiskykyyn ja poikueen kokoon/laatuun, painon muutokset, vaikutukset kuolleisuuteen sekä muut toksiset vaikutukset – esiintyvyyden, ilmaantuvuuden ja vakavuuden välinen mahdollinen suhde.

74. Koska urosten altistusjakso on lyhyt, uroksen lisääntymiskykyyn kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa tulisi harkita myös kivesten ja lisäkivesten histopatologista tutkimusta hedelmällisyystietojen ohella. Lisääntymistä/kehitystä koskevien aiempien kontrollitietojen (esimerkiksi poikueen koko, peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys, nännien vetäytyminen, seerumin T4-pitoisuus) käytöstä voi olla hyötyä tutkimuksen tulosten tulkinnan apuna.

75. Laadunvalvontaa varten on suositeltavaa kerätä vertailutietoja aiemmista tutkimuksista ja laskea vaihtelukertoimista numeeriset tiedot varsinkin sellaisista parametreista, jotka liittyvät hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseen. Näitä tietoja voidaan käyttää vertailutarkoituksiin, kun varsinaisia tutkimuksia arvioidaan.

▼**M8**

Testiraportti

76. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläin:

— käytetty laji/kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alussa

— lajin valinnan perustelut, jos se on muu kuin rotta.

Koeolosuhteet:

— annostason valintaperusteet

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, saavutetuista pitoisuuksista sekä valmisteen stabiiliudesta ja tasalaatuisuudesta

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— ravinnossa/juomavedessä olevan testikemikaalin määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtainen kuvaus satunnaistamismenettelystä, jolla valittiin karsittavat poikaset, jos karsinta tehtiin.

Tulokset:

— paino / painon muutokset

— ravinnon ja veden kulutus tarvittaessa

▼**M8**

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, myös hedelmällisyyden, tiineyden ja toksisuuden mahdollisten muiden merkkien

— osalta

— tiineyden kesto

— toksiset tai muut vaikutukset lisääntymiseen, poikasiin, syntymänjälkeiseen kasvuun jne.

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)

— arvioinnit aistitoiminnoista, tarttumaotteen voimakkuudesta ja motorisesta aktiivisuudesta

— verikokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— kliiniset biokemialliset kokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— niiden täysikasvuisten naaraiden määrä, joilla on normaali tai epänormaali kiimakierto, ja kierron pituus

— elävänä syntyneiden poikasten määrä ja kiinnittymisen jälkeen tapahtuneet abortoitumiset

— niiden poikasten lukumäärä, joilla on selvästi näkyviä epämuodostumia ulkoisten sukupuolielinten silmämääräinen arviointi, pienikasvuisten poikasten lukumäärä

— eläinten kuolinaika tutkimusaikana tai tieto siitä, pysyivätkö eläimet hengissä tutkimuksen päättymiseen saakka

— kiinnittymisten lukumäärä, poikueen koko ja painot kirjaushetkellä

— poikasten painotiedot

— peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys kaikilta poikasilta (sekä paino tämän etäisyyden mittauspäivänä)

— urospoikasten nännien vetäytyminen

— kilpirauhashormonipitoisuudet päivänä 13 urospoikasilta ja täysikasvuisilta uroksilta (ja emoilta ja poikasilta päivänä 4, jos pitoisuus mitataan)

— poikasia saaneiden eläinten paino lopetettaessa ja niiden elinten paino

— ruumiinavauslöydökset yksityiskohtaiset tiedot kaikista histopatologisista löydöksistä

— absorptiotiedot (jos saatavilla)

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Päätelmät.

▼M8

Tulosten tulkitseminen

77. Tutkimuksen tuloksena saadaan arviot toistettujen annosten antamiseen liittyvästä lisääntymis-/kehitystoksisuudesta. Koska tutkimuksessa painotetaan sekä yleiseen toksisuuteen että lisääntymis-/kehitystoksisuuteen liittyviä päätetapahtumia, tutkimustulosten perusteella voidaan erotella toisaalta ne lisääntymiseen/kehitykseen kohdistuvat vaikutukset, joiden osalta yleistä toksisuutta ei ilmene, sekä toisaalta ne vaikutukset, jotka ilmenevät ainoastaan pitoisuuksilla, jotka ovat myrkyllisiä myös emoille ja isille (ks. 7–11 kohta). Sen perusteella tiedetään, onko tehtävä lisätutkimuksia, ja se voi ohjata myös myöhempien tutkimusasetelmien suunnittelua. OECD:n ohjeasiakirjaa 43 on käytettävä lisääntymiseen ja kehitykseen kohdistuviin vaikutuksiin liittyvien tulosten tulkinnan apuna (19). OECD:n ohjeasiakirjassa 106 (jyrsijöillä tehtyjen endokriinisten ja lisääntymiseen liittyvien testien histologinen arviointi (16) on tietoa (endokriinisten) elinten ja irtosolunäytteiden preparoinnista ja arvioinnista. Näistä tiedoista voi olla apua tämän testimenetelmän käyttämisessä.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Saatavana OECD:stä pyynnöstä.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141–149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. Toxicol., 18, 89–95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84–97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) 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. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267–283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233–236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599–609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", Reproductive Toxicology, 13: 383–390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. Teoksessa: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, s. 52–85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524–533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT (KS. MYÖS OECD:N OHJEASIAKIRJAN 150 KOHTA 20)

Androgeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) tavoin.

Antiandrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Antiestrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Kilpirauhasen toimintaa estävä vaikutus on kemikaalin kyky estää luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Kemikaali on aine tai seos.

Kehitystoksisuus Pre-, peri-, postnataalisina, rakenteellisina tai toiminnallisina häiriöinä jälkeläisissä esiintyvän lisääntymistoksisuuden ilmeneminen.

Annos on annostellun testikemikaalin määrä. Annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg päivässä) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina.

Annostelu on yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

Ilmeinen toksisuus on yleistermi, jolla tarkoitetaan testikemikaalin antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden merkkejä. Niitä on oltava riittävästi vaaran arviointia varten, ja niiden on oltava sellaisia, että annetun annoksen suurentamisen voidaan odottaa aiheuttavan vakavia merkkejä myrkyllisyydestä ja todennäköisesti kuolleisuutta.

Hedelmällisyyden heikentyminen tarkoittaa uroksen tai naaraan lisääntymistoimintojen tai -kyvyn häiriöitä.

Emoille myrkylliset vaikutukset Tiineinä oleviin naaraisiin kohdistuvat haittavaikutukset, joita esiintyy joko spesifisti (suora vaikutus) tai epäspesifisti (epäsuora vaikutus) ja jotka liittyvät tiineyteen.

NOAELon lyhennys englanninkielisistä sanoista no-observed-adverse-effect level (taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta). Se on siis suurin annos, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

Estrogeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) tavoin.

Lisääntymistoksisuus tarkoittaa haitallisia vaikutuksia, jotka kohdistuvat jälkeläisiin, ja/tai uroksen ja naaraan lisääntymistoimintojen tai -kyvyn heikentymistä.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

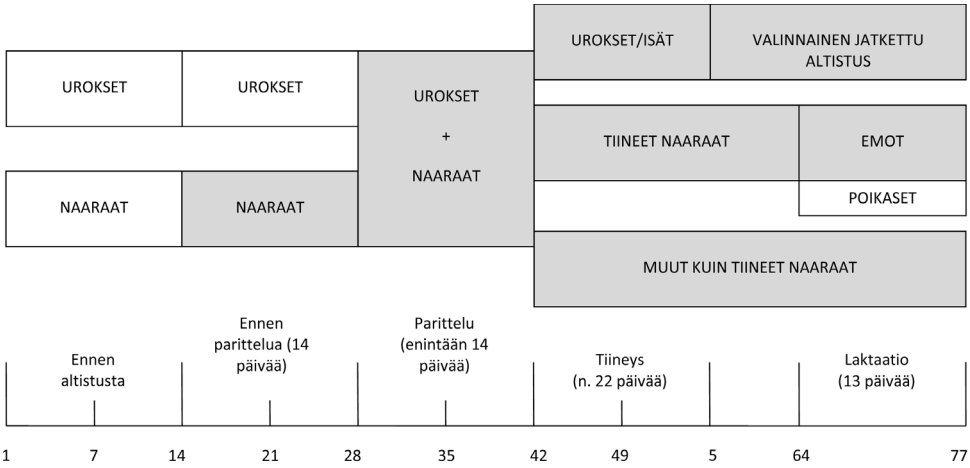
Kilpirauhasen kaltainen vaikutus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) tavoin.

Validointi on tieteellinen menettely, jonka tarkoituksena on luonnehtia testimenetelmän toiminnallisia vaatimuksia ja rajoituksia sekä osoittaa sen luotettavuus ja merkityksellisyys tiettyyn tarkoitukseen nähden.

▼**M8**

Lisäys 2

KAAVIO TESTIAIKATAULUSTA (TUTKIMUKSEN ENIMMÄISKESTO TÄYDEN 14 PÄIVÄN PITUISEN PARITTELUJAKSON PERUSTEELLA)



Tutkimuksen aloitus

Kiimakierron arviointi ennen altistusta, jonka jälkeen vaginan irtosolunäytteitä seurataan päivittäin käsittelyn alusta siihen asti, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen.

Annost

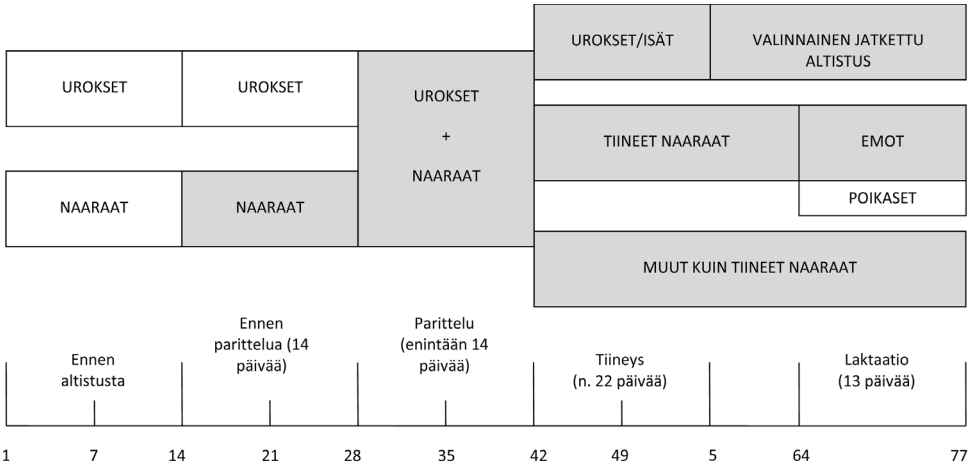
Urosten ja naaraiden (valinnainen) hematologia/ kliininen kemia

Ei annostelua

Urosten/isien ruumiinavaus
Urosten toiminnallinen tarkastus (valinnainen).
Urosten hematologinen/kliininen kemia, kun ne on lopetettu (vähintään neljän viikon allostelujakson jälkeen.

Synnytyksestä (SJP 0) SJP 4:ään: Peräaukon ja sukuelinten välinen etäisyys kaikilla poikasilla (SJP 0 – SJP 4; samana päivänä Kahden poikasen lopetus poikuetta kohti T4-määritystä varten (SJP 4).

Päivä 13 synnytyksen jälkeen.Ruumiinavaus naaraat ja poikaset
Ruumiinavaus urokset ja isät (valinnainen). Urosten (valinnainen) ja naaraiden toiminnalliset tarkkailut.
Urosten ja naaraiden (valinnainen) hematologia/kliininen kemia.
Urospoikasten nännien vetäytyminen.



Tutkimuksen aloitus

Kiimakierron arviointi ennen altistusta, jonka jälkeen vaginan irtosolunäytteitä seurataan päivittäin käsittelyn alusta siihen asti, kunnes parittelun todetaan tapahtuneen.

Annost

Urosten ja naaraiden (valinnainen) hematologia/ kliininen kemia

Ei annostelua

Urosten/isien ruumiinavaus
Urosten toiminnallinen tarkastus (valinnainen).
Urosten hematologinen/kliininen kemia, kun ne on lopetettu (vähintään neljän viikon allostelujakson jälkeen.

Synnytyksestä (SJP 0) SJP 4:ään: Peräaukon ja sukuelinten välinen etäisyys kaikilla poikasilla (SJP 0 – SJP 4; samana päivänä Kahden poikasen lopetus poikuetta kohti T4-määritystä varten (SJP 4).

Päivä 13 synnytyksen jälkeen.Ruumiinavaus naaraat ja poikaset
Ruumiinavaus urokset ja isät (valinnainen). Urosten (valinnainen) ja naaraiden toiminnalliset tarkkailut.
Urosten ja naaraiden (valinnainen) hematologia/kliininen kemia.
Urospoikasten nännien vetäytyminen.

▼**M8**

Lisäys 3

YHTEENVETOTAULUKKO LISÄÄNTYMISEEN/KEHITYKSEEN KOHDISTUVISTA VAIKUTUKSISTA

HAVAINNOT	ARVOT				
Annostus (yksiköt)…….	0 (kontrolli)	…	…	…	…
Aloittaneet parit (N)					
Kiimakierto (vähintään keskimääräinen pituus ja epäsäännöllisten kiertojen tiheys)					
Naaraat, joissa merkkejä parittelusta (N)					
Tiineeksi tulleet naaraat (N)					
Hedelmöityspäivät 1–5 (N)					
Hedelmöityspäivät 6–… ([1]) (N)					
Tiineys ≤ 21 päivää (N)					
Tiineys = 22 päivää (N)					
Tiineys ≥ 23 päivää (N)					
Emot, joilla eläviä poikasia (N)					
Emot, joilla eläviä poikasia päivänä 4 synn. jälk. (N)					
Kiinnittyneet alkiot / emo (keskiarvo)					
Elävät poikaset / emo synnytyksessä (keskiarvo)					
Elävät poikaset / emo päivänä 4 (keskiarvo)					
Sukupuolijakauma (u/n) synnytyksessä (keskiarvo)					
Sukupuolijakauma (u/n) päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikueen paino synnytyksessä (keskiarvo)					
Poikueen paino päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikasen paino synnytyksessä (keskiarvo)					
Poikasen paino peräaukon ja sukupuolielinten välisen etäisyyden mittauksen yhteydessä (urosten ja naaraiden keskiarvot)					
Poikasen peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys samana syntymänjälkeisenä päivänä, syntymä – päivä 4 (urosten ja naaraiden keskiarvot, merkitse SJP)					
Poikasen paino päivänä 4 (keskiarvo)					
Poikasen paino päivänä 13 (keskiarvo)					

▼M8

HAVAINNOT	ARVOT				
Urospoikasten nännin vetäytyminen päivänä 13 (keskiarvo)					
POIKKEAVAT POIKASET					
Emot, joilla 0 poikkeavaa poikasta					
Emot, joilla 1 poikkeava poikanen					
Emot, joilla ≥ 2 poikkeavaa poikasta					
JÄLKELÄISTEN KUOLEMAT					
Prenataalit tapaukset (kiinnittymiset miinus elävänä syntyneet poikaset)					
Naaraat, joilla 0 tapausta					
Naaraat, joilla 1 tapaus					
Naaraat, joilla 2 tapausta					
Naaraat, joilla ≥ 3 tapausta					
Postnataalit tapaukset (elävänä syntyneet poikaset miinus SJP:nä 13 elossa olevat poikaset)					
Naaraat, joilla 0 tapausta					
Naaraat, joilla 1 tapaus					
Naaraat, joilla 2 tapausta					
Naaraat, joilla ≥ 3 tapausta					

([1]) Parittelujakson viimeinen päivä

▼M8

B.65. **KALVOESTEESEEN PERUSTUVA *IN VITRO* -TESTIMENETELMÄ IHOSYÖVYTTÄVYYDEN TESTAAMISEEN**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 435 (2015). Ihosyövyttävyydellä tarkoitetaan pysyvän ihovaurion eli orvaskeden läpi verinahkaan ulottuvan näkyvän kuolion ilmaantumista testikemikaalin annostelun jälkeen Yhdistyneiden kansakuntien yhdenmukaistetussa kemikaalien luokittelu- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa asetuksessa (EU) 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti. Tässä testimenetelmässä, joka vastaa OECD:n päivitettyä testiohjetta 435, esitellään kalvon läpäisynestokykyyn perustuva *in vitro* -testimenetelmä, jota voidaan käyttää syövyttävien kemikaalien tunnistamisessa. Tässä menetelmässä käytetään keinotekoista kalvoa, joka on kehitetty reagoimaan syövyttäviin kemikaaleihin samalla tavalla kuin eläimen iho.

2. Ihosyövyttävyyttä on perinteisesti tutkittu laittamalla testikemikaalia elävien koe-eläinten iholle ja arvioimalla kudosvaurion laajuutta tietyn ajan kuluttua (2). Tämän testimenetelmän lisäksi joukko muitakin *in vitro* -testimenetelmiä on hyväksytty vaihtoehdoiksi (3)(4) *in vivo* -vakiomenetelmälle, jossa käytetään kanin ihoa (tämän liitteen B.4 luku, joka vastaa OECD:n testiohjetta 404) syövyttävien kemikaalien tunnistamiseen (2). YK:n GHS-järjestelmään liittyvässä, ihosyövyttävyyden arviointia ja luokitusta koskevassa vaiheittaisessa testaus- ja arviointistrategiassa sekä ihoärsyttävyyden/-syövyttävyyden testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa suositellaan validoitujen ja hyväksyttyjen, moduulien 3 ja 4 mukaisten *in vitro* -testimenetelmien käyttöä (1) (5). Yhdennetyissä lähestymistavoissa kuvataan useita moduuleita, joihin on ryhmitelty tietolähteitä ja analysointityökaluja. Lisäksi niissä annetaan i) ohjeita siitä, miten integroida ja käyttää nykyisiä testaukseen perustuvia ja testauksen ulkopuolella saatuja tietoja kemikaalien ihoärsyttävyyden ja ihosyövyttävyyden potentiaalin arvioinnissa, ja ii) selostetaan, miten toimitaan, kun lisätestaus on tarpeen, tai negatiivisten tulosten yhteydessä (5). Tässä modulaarisessa lähestymistavassa *in vitro* -testimenetelmillä saatujen positiivisten tulosten perusteella kemikaali voidaan luokitella syövyttäväksi ilman eläinkokeita. Näin voidaan vähentää ja parantaa eläinten käyttöä näissä kokeissa ja välttää kipua ja kärsimystä, joita voisi aiheutua, jos tähän tarkoitukseen käytettäisiin eläimiä.

3. Validointitutkimuksia on tehty kalvoesteeseen perustuvasta *in vitro* -mallista, joka on kaupallisesti saatavana Corrositex®-nimellä (6) (7) (8). Tutkimus osoitti, että mallin kokonaistarkkuus ihosyövyttävyyden ennustamisessa oli 79 prosenttia (128/163), herkkyys 85 prosenttia (76/89) ja spesifisyys 70 prosenttia (52/74) tietokannassa, jossa oli 163 ainetta ja seosta (7). Vahvistetun validiteetin perusteella tätä validoitua vertailumenetelmää (VVM:ää) on suositeltu käytettäväksi osana kemikaalien ihosyövyttävyysvaarapotentiaalin arvioinnin vaiheittaista testausstrategiaa (5) (7). Ennen kuin ihosyövyttävyyttä selvittävää kalvoesteeseen perustuvaa *in vitro* -mallia voidaan käyttää sääntelytarkoituksiin, on määritettävä sen luotettavuus, merkityksellisyys (tarkkuus) ja ehdotetun käytön rajoitukset, jotta voidaan varmistaa, että sitä voidaan verrata validoituun vertailumenetelmään 9 vahvistettujen suoritusvaatimusten mukaisesti (10). OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼M8

taataan vasta, kun ehdotettu uusi tai päivitetty suoritusvaatimusten mukainen menetelmä on tarkistettu ja sisällytetty OECD:n vastaavaan testiohjeeseen. Tällä hetkellä OECD:n testiohjeeseen 435 sisältyy vain yksi *in vitro* -menetelmä ja tämä testimenetelmä eli kaupallisesti saatavilla oleva Corrositex®-malli.

4. Muut ihosyövyttävyyden testaukseen tarkoitetut testimenetelmät perustuvat rekonstruoidun ihmisihon (OECD:n testiohje 431) (3) ja eristetyn rotan ihon (OECD:n testiohje 430) (4) käyttöön. Tämän testimenetelmän avulla syövyttäviä kemikaaleja voidaan myös jakaa alaluokkiin YK:n GHS-järjestelmän syövyttävyyden alaluokkien ja YK:n kuljetusmääräyksien kolmen pakkausryhmän mukaisesti syövyttävyysvaaran osalta. Tämä testiohje hyväksyttiin alun perin vuonna 2006, ja sitä päivitettiin vuonna 2015 ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevan ohjeasiakirjan mukaiseksi. Samalla päivitettiin myös luettelo pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista.

MÄÄRITELMÄT

5. Käytettävät määritelmät esitetään lisäyksessä.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

6. Tässä testimenetelmässä kuvatulla testillä voidaan tunnistaa syövyttävät testikemikaalit ja jaotella niitä alaluokkiin YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti (taulukko 1). Lisäksi tätä testimenetelmää voidaan käyttää tiettyjen kemikaaliluokkien (esimerkiksi orgaaniset ja epäorgaaniset hapot, happojohdannaiset ([1]) ja emäkset) syövyttävyyttä ja syövyttämättömyyttä koskevien päätösten tekemisessä tietyissä kuljetukseen liittyvissä testaustarkoituksissa (7) (11) (12). Tässä testimenetelmässä kuvataan yleinen menettely, joka on samanlainen kuin validoituvertailutestimenetelmä (7). Tällä testimenetelmällä ei saada asianmukaista tietoa ihoärsytyksestä, mutta testimenetelmä B.46 (joka vastaa OECD:n testiohjetta 439) koskee nimenomaan terveysvaikutusta ihoärsytys *in vitro* (13). Jotta paikalliset ihovaikutukset ihon kerta-altistuksen jälkeen voidaan arvioida kattavasti, on tukeuduttava ihosyövyttävyyden ja -ärsytyksen testauksen ja arvioinnin yhdennettyjä lähestymistapoja koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan (5).

Taulukko 1

YK:n GHS-järjestelmän ihosyövyttävyysluokat ja alaluokat ([1])

Syövyttävä-luokka (luokka 1) (viranomaisille, jotka eivät käytä alaluokkia)	Mahdollisesti syövyttävä -alaluokat ([1]) (viranomaisille, jotka käyttävät alaluokkia ja CLP-asetusta)	Syövyttävä ≥ yhdellä kolmesta koe-eläimestä	
		Altistus	Havainto
Syövyttävä	Syövyttävyyden alaluokka 1A	≤ 3 minuuttia	≤ 1 tunti
	Syövyttävyyden alaluokka 1B	> 3 minuuttia / ≤ 1 tunti	≤ 14 päivää
	Syövyttävyyden alaluokka 1C	> 1 tunti / ≤ 4 tuntia	≤ 14 päivää

([1]) EU:ssa CLP-asetuksessa sovelletaan ihosyövyttävyyden kolmea alaluokkaa 1A, 1B ja 1C.

7. Validoidun vertailumenetelmän (7) rajoitus on se, etteivät monet syövyttämättömät kemikaalit ja jotkin syövyttävät kemikaalit kenties sovellu testattavaksi alustavan yhteensopivuustestin tulosten perusteella (ks. 13 kohta). Vesipohjaiset

([1]) ”Happojohdannainen” on epätarkka luokka, joka määritellään laajasti haposta suoraan, muuntamalla tai osittain korvaamalla tuotetuksi kemikaaliksi. Tähän luokkaan kuuluvat anhydridit, halogeenihapot, suolat ja muuntyyppiset kemikaalit.

▼M8

kemikaalit, joiden pH on 4,5–8,5, eivät usein sovellu testattavaksi; 85 prosenttia tällä pH-alueella testatuista kemikaaleista oli kuitenkin syövyttämättömiä eläinkokeissa (7). Kalvoesteeseen perustuvaa *in vitro* -menetelmää voidaan käyttää kiinteiden aineiden (veteen liukenevien tai liukenemattomien), nesteiden (vesipohjaisten tai ei-vesipohjaisten) ja emulsioiden testaamiseen. Testikemikaaleja, jotka eivät aiheuta havaittavaa muutosta yhteensopivuustestissä (ts. värinmuutosta validoidun vertailutestimenetelmän mukaisessa kemikaalien havaitsemisjärjestelmässä), ei kuitenkaan voida testata kalvoesteeseen perustuvalla menetelmällä, vaan ne on testattava muilla menetelmillä.

TESTIN PERIAATE

8. Testijärjestelmässä on kaksi osaa: synteettinen makromolekulaarinen biologinen este ja kemikaalien havaitsemisjärjestelmä. Sen jälkeen, kun testikemikaalia on laitettu synteettisen makromolekulaarisen kalvoesteen pinnalle, kemikaalien havaitsemisjärjestelmän avulla tällä testimenetelmällä havaitaan kalvoesteen vaurioituminen (7), jonka aiheuttavat syövyttävät testikemikaalit luultavasti samalla syövytysmekanismilla (-mekanismeilla), joka toimii / jotka toimivat myös elävällä iholla.

9. Kalvoesteen läpi tunkeutumista (tai sen läpäisyä) voidaan mitata monilla menetelmillä tai kemikaalien havaitsemisjärjestelmällä, esimerkiksi pH-indikaattorin värin muutoksella tai jollakin muulla kalvoesteen alapuolella olevan indikaattoriliuoksen ominaisuudella.

10. Kalvoesteen on todettava olevan validi eli tarkka ja luotettava aiottuun käyttötarkoitukseensa. Tähän kuuluu sen varmistaminen, että eri valmisteet ovat läpäisynesto-ominaisuuksiltaan yhtenäiset eli että niiden läpäisynestokyky säilyy syövyttämättömien kemikaalien yhteydessä ja että niillä voidaan luokitella kemikaalien syövyttävät ominaisuudet YK:n GHS-järjestelmän syövyttävyyden eri alaluokkien mukaisesti (1). Määritetty luokitus perustuu siihen, missä ajassa kemikaali tunkeutuu kalvoesteen läpi indikaattoriliuokseen.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

11. Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä tämän testimenetelmän mukaista *in vitro* -kalvoestemenetelmää rutiininomaisesti, sen on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla taulukossa 2 suositellut 12 ainetta oikein. Jos luettelossa mainittua ainetta ei ole saatavilla tai jos se on perusteltua, voidaan käyttää toista ainetta, josta on saatavana asianmukaiset *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutiedot (esimerkiksi vertailukemikaalien luettelosta (10)), kunhan sovelletaan taulukossa 1 kuvattuja samoja valintaperusteita.

Taulukko 2

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet ([1])

Aine ([2])	CAS-nro	Kemiallinen luokka	YK:n GHS-järjestelmän alaluokka *in vivo* ([3])	YK:n GHS-järjestelmän alaluokka *in vitro* ([3])
Booritrifluorididihydraatti	13319-75-0	Epäorgaaniset hapot	1A	1A
Typpihappo	7697-37-2	Epäorgaaniset hapot	1A	1A
Fosforipentakloridi	10026-13-8	Epäorgaanisten happojen esiasteet	1A	1A
Valeryylikloridi	638-29-9	Happokloridit	1B	1B
Natriumhydroksidi	1310-73-2	Epäorgaaniset emäkset	1B	1B

▼**M8**

Aine ([2])	CAS-nro	Kemiallinen luokka	YK:n GHS-järjestelmän alaluokka *in vivo* ([3])	YK:n GHS-järjestelmän alaluokka *in vitro* ([3])
1-(2-aminoetyyli)-piperatsiini	140-31-8	Alifaattiset amiinit	1B	1B
Bentseenisulfonyylikloridi	98-09-9	Happokloridit	1C	1C
N,N-dimetyylibentsylamiini	103-83-3	Aniliinit	1C	1C
Tetraetyleenipentamiini	112-57-2	Alifaattiset amiinit	1C	1C
Eugenoli	97-53-0	Fenolit	ES	ES
Nonyyliakrylaatti	2664-55-3	Akrylaatit/metakrylaatit	ES	ES
Natriumbikarbonaatti	144-55-8	Epäorgaaniset suolat	ES	ES

([1]) Edellä luetellut 12 ainetta sisältävät kolme ainetta YK:n GHS-järjestelmän jokaisesta kolmesta syövyttävien aineiden alakategoriasta ja kolme syövyttämätöntä ainetta. Niitä on saatavana kaupallisilta toimittajilta. YK:n GHS-järjestelmä perustuu erittäin laadukkaan *in vivo* -testauksen tuloksiin. Nämä aineet on otettu niiden 40 vertailuaineen luettelosta, jotka sisältyvät minimiluetteloon kemikaaleista, jotka on määritetty validoidun vertailutestimenetelmän kanssa rakenteellisesti ja toiminnallisesti samanlaisten testimenetelmien tarkkuuden ja luotettavuuden osoittamiseen ja jotka on valittu vertailutestimenetelmän (Corrositex®) validoimiseen alun perin käytetyistä 163 vertailukemikaalista (7) (10) (14). Tämän valintaprosessin tavoitteena oli sisällyttää luetteloon mahdollisuuksien mukaan kemikaaleja, jotka edustavat erilaisia syövyttävyysvasteita (ts. syövyttämättömiä sekä YK:n pakkausryhmien I, II ja III mukaisia syövyttäviä aineita) ja jotka validoidulla vertailutestimenetelmällä voidaan mitata tai ennustaa; edustavat validointiprosessissa käytettyjä kemikaaliluokkia; ovat kemialliselta rakenteeltaan tarkoin määritettyjä; antoivat toistettavia tuloksia *in vivo* -vertailutestimenetelmällä; antoivat varmoja tuloksia *in vivo* -vertailutestillä; olivat kaupallisesti saatavilla; ja joiden hävityskustannukset eivät ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön (14).

([2]) Aineet, jotka on testattu raakana tai joiden puhtaus on ≥ 90 %.

([3]) YK:n GHS-järjestelmän mukaisia alaluokkia 1A, 1B ja 1C vastaavat YK:n pakkausryhmät ovat I, II ja III. **ES**: ei syövyttävä.

MENETTELY

12. Seuraavissa kohdissa kuvataan syövyttävyyden arviointiin tarkoitetun, keinotekoiseen kalvoesteeseen perustuvan testimenetelmän osat ja menettelyt (7) (15) nykyisen VVM:n eli kaupallisesti saatavan Corrositexin® pohjalta. Kalvoeste sekä yhteensopivuus-/indikaattori- ja luokitteluliuokset voidaan rakentaa, valmistaa tai ostaa (esimerkiksi VVM Corrositex®). Validoidusta vertailutestimenetelmästä on saatavana testimenetelmäprotokollan malli (7). Testi on tehtävä huoneenlämpötilassa (17–25 °C), ja osien on täytettävä seuraavassa kuvatut edellytykset.

Testikemikaalin yhteensopivuustesti

13. Ennen kalvoestetestin tekemistä on tehtävä yhteensopivuustesti, jolla selvitetään, pystyykö kemikaalien havaitsemisjärjestelmä havaitsemaan testikemikaalin. Jos järjestelmä ei havaitse testikemikaalia, kalvoesteeseen perustuva testimenetelmä ei sovellu kyseisen testikemikaalin mahdollisen syövyttävyyden arvioimiseen, ja sen testaamisessa on käytettävä jotakin toista testimenetelmää. Yhteensopivuustestissä käytettävän kemikaalien havaitsemisjärjestelmän ja altistusolosuhteiden on vastattava kalvoestetestissä käytettävää altistusta.

Testikemikaalin aikaskaalaluokitus -testi

14. Testikemikaalille, joka on todettu sopivaksi yhteensopivuustestissä, on tehtävä aikaskaalaluokitustesti eli seulontatesti, jonka avulla erotellaan heikot ja voimakkaat hapot tai emäkset, mikäli se on testimenetelmän kannalta tarkoituksenmukaista. Esimerkiksi validoidussa vertailutestimenetelmässä käytetään

▼M8

aikaskaalaluokitustestiä sen määrittämisessä, kumpaa aikaskaalaa on käytettävä sen perusteella, havaitaanko testissä huomattava happo- vai emäskapasiteetti. Syövyttävyyden ja YK:n GHS-järjestelmän ihosyövyttävyyden alaluokkien määrittämisessä on käytettävä kahta eri läpäisyaikaskaalaa testikemikaalin happo- tai emäskapasiteetin mukaan.

KALVOESTEESEEN PERUSTUVAN TESTIMENETELMÄN OSAT

Kalvoeste

15. Kalvoesteessä on kaksi osaa: proteiinipitoinen makromolekulaarinen vesipohjainen geeli ja läpäisevä tukikalvo. Proteiinigeelin pitäisi olla nesteitä ja kiinteitä aineita läpäisemätön, mutta se voi syöpyä ja tulla läpäiseväksi. Valmiiksi rakennettua kalvoestettä on säilytettävä määrätyissä olosuhteissa, joiden on osoitettu estävän geelin vaurioitumisen eli kuivumisen, mikrobikasvun, liikkumisen ja halkeilun, jotka heikentäisivät sen toimintakykyä. Hyväksyttävä säilytysaika on määritettävä, eikä kalvoestevalmisteita tule käyttää tämän ajan umpeuduttua.

16. Läpäisevä tukikalvo antaa proteiinigeelille mekaanista tukea geeliytymisprosessin ja testikemikaalille altistuksen aikana. Tukikalvon pitäisi estää geelin taipuminen tai liikkuminen, ja sen tulisi olla kaikki testikemikaalit läpäisevä.

17. Testikemikaalin kohde on proteiinigeeli, joka koostuu proteiinista eli keratiinista, kollageenista tai proteiinien sekoituksesta ja muodostaa geelimatriisin. Proteiinipitoinen materiaali asetetaan tukikalvon pinnalle ja sen annetaan geeliytyä ennen kuin kalvoeste asetetaan indikaattoriliuoksen päälle. Proteiinigeelin on oltava kauttaaltaan yhtä paksu ja tiheä, eikä siinä saa olla ilmakuplia tai muita vaurioita, jotka voivat vaikuttaa sen toiminnalliseen eheyteen.

Kemikaalien havaitsemisjärjestelmä

18. Indikaattoriliuoksen, joka on sama kuin yhteensopivuustestissä käytetty liuos, on reagoitava testikemikaalin olemassaoloon. Testissä on käytettävä pH-indikaattoriväriä tai niiden yhdistelmää, *esim.* kresolipunaista ja metyylioranssia, jotka osoittavat värin muuttumisen reaktiona testikemikaaliin. Mittausjärjestelmä voi olla visuaalinen tai elektroninen.

19. Havaitsemisjärjestelmien, jotka on kehitetty havaitsemaan testikemikaalin kulkeutuminen kalvoesteen läpi, merkityksellisyys ja luotettavuus on arvioitava, jotta voidaan määrittää ne kemikaalit, jotka järjestelmällä voidaan havaita, ja määrälliset havaintorajat.

TESTIN TEKEMINEN

Testimenetelmän osien kokoaminen

20. Kalvoeste asetetaan indikaattoriliuosta sisältävään lasipulloon (tai putkeen) siten, että tukikalvo on kauttaaltaan kosketuksissa indikaattoriliuokseen, eikä ilmakuplia saa olla. Kalvoestettä on käsiteltävä varovasti, jotta se pysyy ehjänä.

▼M8

Testikemikaalin annostelu

21. Sopiva määrä testikemikaalia, esimerkiksi 500 µl nestettä tai 500 mg hienoksi jauhettua kiinteää ainetta (7), levitetään kalvoesteen yläpinnalle varovasti ja tasaisesti. Jokaiselle testikemikaalille ja sitä vastaavalle kontrollille valmistetaan tarvittava määrä rinnakkaisnäytteitä, esimerkiksi neljä (7) (ks. 23–25 kohta). Aika, jona testikemikaali levitetään kalvoesteelle, merkitään muistiin. Sen varmistamiseksi, että lyhyet syöpymisajat kirjataan tarkasti muistiin, testikemikaali levitetään rinnakkaisnäytteisiin porrastetusti.

Kalvoesteen läpäisyn mittaus

22. Jokaista pulloa seurataan asianmukaisesti. Indikaattoriliuoksen ensimmäisen värimuutoksen ajankohta (ts. esteen läpäisy) kirjataan muistiin, ja kemikaalin levittämisen ja kalvoesteen läpäisyn välillä kulunut aika määritetään.

Kontrollit

23. Testeissä, joissa käytetään kantaja-aine- tai liuotinkontrollia testikemikaalin kanssa, kantaja-aineen tai liuottimen on oltava yhteensopivia kalvoestekokonaisuuden kanssa: ne eivät saa vaikuttaa kalvoestekokonaisuuden eheyteen eivätkä muuttaa testikemikaalin syövyttävyyttä. Tarvittaessa liuotin- (tai kantaja-aine)kontrolli on testattava yhtä aikaa testikemikaalin kanssa liuottimen ja kalvoestekokonaisuuden yhteensopivuuden osoittamiseksi.

24. Positiivinen (syövyttävä) kontrolli, joka on kohtalaisen syövyttävä, esimerkiksi 110 ± 15 mg natriumhydroksidia (YK:n GHS-järjestelmän syövyttävien aineiden alaluokka 1B) (7), on testattava yhtä aikaa testikemikaalin kanssa, jotta voidaan arvioida, toimiiko testijärjestelmä hyväksyttävästi. Toinen positiivinen kontrolli, joka kuuluu samaan kemikaaliluokkaan kuin testikemikaali, voi olla hyödyllinen syövyttävän testikemikaalin suhteellisen syövyttävyyspotentiaalin arvioinnissa. Positiiviseksi kontrolliksi (positiivisiksi kontrolleiksi) on valittava kohtalaisen syövyttäviä aineita (esimerkiksi YK:n GHS-järjestelmän alaluokka 1B), jotta havaitaan vahvistettua vertailuarvoa niin paljon pidempien tai lyhyempien läpäisyaikojen muutokset, joita ei voida hyväksyä, sillä ne osoittavat, ettei testijärjestelmä toimi asianmukaisesti. Tähän tarkoitukseen erittäin syövyttävien (YK:n GHS-järjestelmän alaluokka 1A) tai syövyttämättömien kemikaalien käyttökelpoisuus on rajallinen. YK:n GHS-järjestelmän alaluokan 1B mukaisen syövyttävän kemikaalin avulla voidaan havaita liian nopea tai liian hidas läpäisyaika. Lievästi syövyttävää kemikaalia (YK:n GHS-järjestelmän alaluokka 1C) voidaan käyttää positiivisena kontrollina mittaamaan, pystyykö testimenetelmä erottelemaan lievästi syövyttävät ja syövyttämättömät kemikaalit toisistaan johdonmukaisesti. Käytetystä lähestymistavasta riippumatta positiivisen kontrollin hyväksyttävä vastealue on määritettävä positiivis(t)en kontrolli(e)n aikaisempien läpäisyaikatietojen mukaisesti (esimerkiksi keskiarvo ± 2–3 keskihajontaa). Jokaisessa tutkimuksessa on määritettävä positiivisen kontrollin tarkka läpäisyaika, jotta voidaan havaita hyväksyttävän alueen ulkopuolella olevat poikkeamat.

25. Negatiivinen (syövyttämätön) kontrolli, esimerkiksi 10-prosenttinen sitruunahappo tai 6-prosenttinen propionihappo (7), on myös testattava yhtä aikaa testikemikaalin kanssa toisena laadunvalvontatoimena kalvoesteen toiminnallisen eheyden osoittamiseksi.

▼M8

Testin hyväksyttävyysperusteet

26. Kullekin YK:n GHS-järjestelmän mukaiselle syövyttävyyden alaluokalle vahvistettujen aikaparametrien mukaisesti testikemikaalin syövyttävyyden ennustamisessa käytetään aikaa (minuutteina), joka kuluu testikemikaalin kalvoesteen päälle levittämisestä siihen, kun kemikaali läpäisee esteen. Jotta tutkimus katsottaisiin hyväksyttäväksi, samanaikaisesta positiivisesta kontrollista pitäisi saada odotuksenmukainen läpäisyn vasteaika (ts. 8–16 minuutin läpäisyaika natriumhydroksidille, jos positiivisena kontrollina käytetään sitä) ja samanaikaisen negatiivisen kontrollin tulisi olla syövyttämätön, ja jos tutkimukseen sisältyy samanaikainen liuotinkontrolli, sen tulisi olla syövyttämätön eikä se saa muuttaa testikemikaalin syövyttävyyspotentiaalia. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tämän testimenetelmän mukaista menetelmää rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä taulukossa 2 suositeltujen 12 aineen avulla. Sellaisten tämän testimenetelmän mukaisesti kehitettyjen uusien (me-too) testimenetelmien, jotka vastaavat rakenteellisesti ja toiminnallisesti validoitua vertailumenetelmää (14), luotettavuus ja tarkkuus on osoitettava määrättyjen suorituskykyvaatimusten mukaisesti ennen kuin niitä käytetään säännösten nojalla tehtäviin testeihin (10).

Tulosten tulkinta ja testikemikaalien syövyttävyysluokitus

27. Testikemikaalin luokittelemisessa YK:n GHS-järjestelmän syövyttävyyden alaluokkiin (1) ja tarvittaessa YK:n pakkausryhmään (16) käytetään aikaa (minuutteina), joka kuluu testikemikaalin levittämisestä kalvoesteen pinnalle siihen, kun kemikaali läpäisee esteen. Jokaiselle kolmelle syövyttävyyden alaluokalle ja kullekin ehdotetulle testimenetelmälle määritetään aikaraja-arvot. Lopullisissa aikaraja-arvoja koskevissa päätöksissä on otettava huomioon tarve pitää syöpymisvaaran aliluokitus mahdollisimman vähäisenä (ts. väärät negatiiviset tulokset). Tässä testiohjeessa on käytettävä taulukossa 3 kuvattuja Corrositexin® aikaraja-arvoja, sillä se on ainoa testimenetelmä, joka on tällä hetkellä testiohjeen mukainen (7).

Taulukko 3

Corrositex®-ennustemalli

Keskimääräinen läpäisyaika (min)		YK:n GHS-järjestelmän mukainen ennuste (3)
Luokan 1 testikemikaalit (1) (määritettyinä menetelmän luokitustestin mukaan)	Luokan 2 testikemikaalit (2) (määritettyinä menetelmän luokitustestin mukaan)	
0–3 min	0–3 min	Syövyttävä Valinnainen alaluokka 1A
> 3–60 min	> 3–30 min	Syövyttävä Valinnainen alaluokka 1B
> 60–240 min	> 30–60 min	Syövyttävä Valinnainen alaluokka 1C
> 240 min	> 60 min	Syövyttämätön

(1) Testikemikaalit, joiden happo-emäskapasiteetti on suuri (6).
(2) Testikemikaalit, joiden happo-emäskapasiteetti on pieni (6).
(3) YK:n GHS-järjestelmän alaluokat 1A, 1B ja 1C vastaavat YK:n pakkausryhmiä I, II ja III.

▼**M8**

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

28. Testikemikaalin sekä positiivis(t)en kontrolli(e)n levittämisen ja esteen läpäisemisen välinen aika (minuutteina) on ilmoitettava taulukossa. Myös tiedot jokaisesta rinnakkaisnäytteestä sekä keskiarvot ± keskihajonta on ilmoitettava jokaisesta kokeesta.

Testiraportti

29. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrolliaineet:

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

— Monesta ainesosasta muodostuva aine, UVCB-aine sekä seos: luonnehditaan mahdollisimman tarkoin kemiallisten tunnistetietojen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja merkityksellisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— tarvittaessa testikemikaalin ja/tai kontrolliaineen käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testikemikaalin stabiilisuus, viimeinen käyttöpäivä tai uudelleenanalysointipäivä, jos se on tiedossa

— säilytysolosuhteet.

Kantaja-aine:

— tunnistetiedot, pitoisuus (tarvittaessa), käytetty tilavuus

— perustelut kantaja-aineen valinnalle.

In vitro -kalvoestemalli ja käytetty protokolla sekä tiedot osoitetusta tarkkuudesta ja luotettavuudesta

Testiolosuhteet:

— kuvaus käytetyistä laitteista ja valmistelumenettelyistä

— käytetyn *in vitro* -kalvoesteen alkuperä ja koostumus

— indikaattoriliuoksen koostumus ja ominaisuudet

— havaitsemismenetelmä

— testikemikaalin ja kontrolliaineen määrät

— rinnakkaisnäytteiden lukumäärä

— aikaskaalaluokitustestin kuvaus ja perustelut

▼**M8**

— levitysmenetelmä

— havainnointiajat

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja luokitteluperusteista

— pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla kemikaaleilla tehtyyn testaukseen perustuva osoitus pätevyydestä tämän testimenetelmän osalta ennen rutiininomaisen käytön aloittamista.

Tulokset:

— taulukko jokaisen testin yksittäisistä raakatiedoista ja jokaisen rinnakkaisnäytteen kontrolliotoksesta

— kuvaukset muista havaituista vaikutuksista

— tulosten perusteella tehty luokitus ja tiedot käytetystä ennustemallista ja/tai käytetyistä päätöksentekoperusteista.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Tämän liitteen luku B.4, Akuutti toksisuus: ihoärsyttävyys/-syövyttävyys.

(3) Tämän liitteen luku B.40a *In vitro* -ihosyövyttävyys: Rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä.

(4) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* -ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(6) 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, 483–524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37–45.

▼**M8**

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, s. 96–97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Tämän liitteen luku B.46, *In vitro* -ihoärsyttävyys: rekonstruoidun ihmisorvaskeden testimenetelmä. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Saatavana osoitteessa http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Saatavana osoitteessa http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼**M8**

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssia) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (9).

Kemikaali: Aine tai seos.

Kemikaalien havaitsemisjärjestelmä: Visuaalinen tai elektroninen mittausjärjestelmä, jossa on testikemikaaliin reagoiva indikaattoriliuos, *esim*. pH-indikaattorin väri tai väriyhdistelmä, joka reagoi testikemikaaliin väriä muuttamalla tai muuntyyppisillä kemiallisilla tai sähkökemiallisilla reaktioilla.

Vastaavuus: Testimenetelmän suorituskyvyn mitta sellaisille testimenetelmille, joiden tulokset ovat luokittelevia, ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Vastaavuutta ja tarkkuutta käytetään joskus toisiaan korvaavasti, ja vastaavuus on määritelty kaikkien niiden testikemikaalien osuudeksi, jotka on luokiteltu oikein positiivisiksi tai negatiivisiksi. Vastaavuuteen vaikuttaa suuresti positiivisten tulosten esiintyminen tutkittavien testikemikaalien tyypeissä (9).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu luokitus- ja merkintäjärjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niihin liittyvät vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment, testauksen ja arvioinnin yhdennetyt lähestymistavat.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu vähintään kahdesta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat vähintään 10 painoprosenttia ja alle 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

ES: Ei syövyttävä.

Suoritusvaatimukset: Validoituihin vertailumenetelmiin perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Siihen sisältyvät i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) samanlaiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat luotettavuuden ja tarkkuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (9).

▼**M8**

Merkityksellisyys: Kuvaus testimenetelmän ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testimenetelmä tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testimenetelmällä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (9).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla laboratorionsisäinen ja laboratorioidenvälinen uusittavuus (9).

Herkkyys: Niiden negatiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmässä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Ihosyövyttävyys *in vivo*: Korjautumattoman ihovaurion eli näkyvän orvasketeen ja verinahkaan ulottuvan kuolion ilmaantuminen enintään neljä tuntia kestäneen testikemikaalin annostelun jälkeen. Tyypillisiä syöpymisreaktioita ovat haavaumat, verenvuoto, veriset ruvet sekä 14 päivän tarkkailujakson lopussa ihon vaalenemisen aiheuttama värinmuutos, kokonaan kaljuuntuneet alueet ja arvet. Epäselvien vaurioiden yhteydessä on harkittava histopatologista tutkimusta.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testimenetelmässä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (9).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantoprosessein tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

▼M8

B.66. *IN VITRO* -TRANSAKTIVAATIOTESTIT, JOISSA KÄYTETÄÄN PYSYVÄSTI TRANSFEKTOITUJA SOLUJA JA JOILLA VOIDAAN TUNNISTAA ESTROGEENIRESEPTORIN AGONISTEJA JA ANTAGONISTEJA

YLEISJOHDANTO

OECD:n tulosperusteinen testiohje

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 455 (2016). Testiohje 455 on tulosperusteinen testiohje, jossa kuvataan *in vitro* -transaktivaatiotestien menetelmä, jossa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja ja joilla voidaan tunnistaa estrogeenireseptorin agonisteja ja antagonisteja (ER TA -testit). Se koostuu useista mekanistisesti ja toiminnallisesti samanlaisista testimenetelmistä, jotka on tarkoitettu estrogeenireseptorin (ts. ERα ja/tai ERβ) agonistien ja antagonistien tunnistamiseen, ja sen tavoitteena on osaltaan edistää uusien samanlaisten tai muunneltujen testimenetelmien kehittämistä OECD:n vaaran arvioinnissa käytettävien uusien tai päivitettyjen testimenetelmien validointia ja kansainvälistä hyväksyntää koskevassa ohjeasiakirjassa esitettyjen validointiperiaatteiden mukaisesti (1). Kokonaisuudessaan validoidut vertailutestimenetelmät (lisäys 2 ja lisäys 3), joihin tämä tulosperusteinen testiohje pohjautuu, ovat seuraavat:

— pysyvästi transfektoituja soluja hyödyntävä transaktivaatiotesti (STTA) (2), jossa käytetään (h) ERα-HeLa-9903 -solulinjaa ja

— VM7Luc ER TA -testi (3), jossa käytetään VM7Luc4E2-solulinjaa ([1]), joka ilmentää pääasiassa hERα:aa ja jossain määrin hERβ:aa (4) (5).

Samaa vaaran vaikutuskohdetta koskevien samanlaisten testien kehittämistä ja validointia varten (6) (7) on laadittu suoritusvaatimukset, ja niitä tulee noudattaa. Niiden avulla tulosperusteista testiohjetta 455 voidaan muuttaa ajoissa, jotta päivitettyyn tulosperusteiseen testiohjeeseen voidaan lisätä uusia samanlaisia testejä. Samanlaisia testejä lisätään ohjeeseen kuitenkin vasta sitten, kun OECD on tarkistanut ne ja vahvistanut, että suoritusvaatimukset täyttyvät. Testiohjeeseen 455 sisältyviä testejä voidaan käyttää OECD:n jäsenvaltioiden estrogeenireseptorin transaktivaatiota koskeviin testituloksiin liittyvien vaatimusten yhteydessä samalla OECD:n sopimuksen mukaista tietojen vastavuoroista hyväksyntää hyödyntäen.

Taustaa ja tähän testimenetelmään sisältyviä testejä koskevat periaatteet

2. Vuonna 1998 OECD aloitti tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien testiohjeiden uudistuksen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten. Mahdollisten hormonaalisten

([1]) Ennen kesäkuuta 2016 tämän solulinjan nimi oli BG1Luc. BG-1-soluja kuvasivat ensimmäisen kerran Geisinger ja muut (1998) (35), ja myöhemmin niitä luonnehtivat National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) -tutkimuslaitoksen tutkijat (36). Melko hiljattain havaittiin, että tutkijoiden käyttämistä BG-1-soluista on kaksi erilaista varianttia, BG-1 Fr ja BG-1 NIEHS. Lin työtovereineen toteuttama tarkempi analyysi ja DNA-testaus (2014) (37) näiden kahden BG-1-variantin solulinjoista osoitti, että BG-1 Fr oli ainutkertainen ja että BG-1 NIEHS, testin kehittämisessä käytetty alkuperäinen solulinja, ei ollutkaan ihmisen munasarjakarsinooman BG1-solulinja, vaan ihmisen rintasyövän MCF7-solulinjan variantti. Testissä käytetty solulinja, jonka nimi oli aikaisemmin BG1Luc4E2 (38), on nyt nimeltään VM7Luc4E2 (”” = variantti; ”M7” = MCF7-solut). Niinpä testin nimi on nyt VM7Luc ER TA. Vaikka tämä muuttaa sen solulinjan alkuperää, johon testi perustuu, se ei kuitenkaan vaikuta julkaistuihin validointitutkimuksiin eikä tämän testin käyttökelpoisuuteen ja soveltamiseen niiden kemikaalien seulonnassa, joilla voi olla estrogeenisia tai antiestrogeenisia vaikutuksia.

▼**M8**

haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva OECD:n toimintamalli tarkistettiin vuonna 2012. Alkuperäinen ja tarkistettu toimintamalli sisältyvät liitteinä OECD:n ohjeasiakirjaan Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (8). Toimintamallissa on viisi tasoa, joista kukin vastaa biologisen monimutkaisuuden eri tasoa. Tässä testimenetelmässä kuvatut estrogeenireseptorin transaktivaatio -testit kuuluvat tasolle 2, joka sisältää ”*in vitro -testit, jotka tuottavat tietoa tietyistä endokriinisistä mekanismeista/reiteistä*”. Tässä testimenetelmässä on *in vitro* -transaktivaatiotestejä, jotka on kehitetty tunnistamaan estrogeenireseptorin agonisteja ja antagonisteja.

3. Estrogeenien ja estrogeenireseptoreiden yhteisvaikutus voi vaikuttaa estrogeenin säätelemien geenien transkriptioon, mikä voi käynnistää tai estää solujen prosesseja, myös niitä, joita tarvitaan solujen proliferaatiossa, sikiön normaalissa kehityksessä ja lisääntymistoiminnoissa (9) (10) (11). Normaalien estrogeenin säätelemien järjestelmien häiritseminen saattaa aiheuttaa haittavaikutuksia, jotka kohdistuvat normaaliin kehitykseen (ontogeneesiin), lisääntymisterveyteen ja lisääntymisjärjestelmän eheyteen.

4. *In vitro* TA -testit perustuvat aineiden ja tietyn reportterigeenituotteen transkriptiota säätelevän reseptorin suoraan tai epäsuoraan yhteisvaikutukseen. Näitä testejä on käytetty laajalti tiettyjen tumareseptoreiden, kuten estrogeenireseptoreiden, säätelemän geenien ilmentymisen arvioimisessa (12) (13) (14) (15) (16). Niitä on ehdotettu käytettäväksi myös estrogeenireseptorin säätelemän estrogeenisen transaktivaation havaitsemisessa (17) (18) (19). Nukleaarisista estrogeenireseptoreista on ainakin kaksi pääasiallista alatyyppiä, α ja β, jotka ovat eri geenien koodaamia. Kyseisillä proteiineilla on erilaiset biologiset tehtävät, ja ne eroavat toisistaan myös kudoksiin jakautumisen ja ligandin sitoutumisaffiniteetin osalta (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Nukleaarinen ERα välittää klassista estrogeenivaikutusta (27) (28) (29) (30), ja sen vuoksi useimmat tällä hetkellä kehitteillä olevat mallit, joilla mitataan estrogeenireseptorin aktivaatiota tai inhibitiota, ovat spesifejä ERα:lle. Testejä käytetään sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, jotka aktivoivat (tai inhiboivat) estrogeenireseptorin ligandin sitoutumisen jälkeen, minkä jälkeen reseptori-ligandikompleksi sitoutuu tiettyihin DNA:ssa oleviin vaste-elementteihin ja transaktivoi reporttergeenin. Tämä johtaa siihen,että merkkiaineproteiinin ilmentyminen solussa lisääntyy. Näissä testeissä voidaan käyttää erilaisia reportterivasteita. Lusiferaasiin perustuvissa järjestelmissä lusiferaasientsyymi muuttaa lusiferiinisubstraatin bioluminesenssituotteeksi, joka voidaan mitata kvantitatiivisesti luminometrillä. Muita esimerkkejä yleisistä reporttereista ovat fluoresoiva proteiini ja *LacZ*-geeni, joka koodaa β-galaktosidaasia, entsyymiä, joka voi muuttaa värittömän X-gal-substraatin (5- bromi-4-kloori-indolyyli-galaktopyranosidi) siniseksi tuotteeksi, joka voidaan kvantifioida spektrofotometrillä. Nämä reportterit voidaan analysoida nopeasti ja edullisesti kaupallisesti saatavilla testipaketeilla.

5. STTA- ja VM7Luc TA -testien merkityksellisyys ja luotettavuus niiden suunnitellussa käyttötarkoituksessa on osoitettu validointitutkimuksissa (3) (4) (5) (30). Luminesenssipohjaisten, rintasyövän solulinjoja käyttävien ER TA -testien suoritusvaatimukset sisältyvät ICCVAMin LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmää koskevaan arviointiraporttiin: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3). Näitä suoritusvaatimuksia on muokattu sekä STTA-testiin että VM7Luc TA -testiin sopiviksi (2).

6. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

▼M8

TA-testien soveltamisala ja rajoitukset

7. Näitä testejä suositellaan käytettäväksi seulonnassa ja priorisoinnissa, mutta niistä voidaan saada myös mekanistista tietoa, jota voidaan hyödyntää näyttöön perustuvassa toimintatavassa. Niissä on kyse transaktivaatiosta, jonka aiheuttaa kemikaalin sitoutuminen estrogeenireseptoreihin *in vitro* -järjestelmässä. Tuloksia ei siis ole syytä ekstrapoloida suoraan intaktin endokriinisen *in vivo* -järjestelmän monimutkaiseen viestinvälitykseen ja säätelyyn.

8. Estrogeenireseptoreiden välittämää transaktivaatiota pidetään yhtenä keskeisistä hormonitoiminnan häiriöitä aiheuttavista mekanismeista, vaikka niitä voivat aiheuttaa myös muut mekanismit, esimerkiksi i) yhteisvaikutukset endokriinisen järjestelmän muiden reseptorien ja entsymaattisten järjestelmien kanssa, ii) hormonien synteesi, iii) hormonien metabolinen aktivaatio ja/tai inaktivaatio, iv) hormonien jakautuminen kohdekudoksiin ja v) hormonien poistuminen kehosta. Missään tähän testimenetelmään kuuluvista testeistä ei käsitellä näitä vaikutustapoja.

9. Tässä testimenetelmässä käsitellään kemikaalien kykyä aktivoida (ts. toimia agonisteina) ja myös estää (ts. toimia antagonisteina) estrogeenireseptorivälitteinen transkriptio. Jotkin kemikaalit voivat, solutyypin mukaan, toimia sekä agonistina että antagonistina. Näitä kemikaaleja kutsutaan selektiivisiksi estrogeenireseptorin modulaattoreiksi (SERM). Kemikaaleja, jotka todetaan negatiivisiksi näissä testeissä, voidaan arvioida estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevalla testillä, ennen kuin tehdään päätelmä, ettei kemikaali sitoudu reseptoriin. Lisäksi testeistä saataneen tietoa vain alkuperäismolekyylin aktiivisuudesta, kun muistetaan, että *in vitro* -solujärjestelmien metabolointikyky on rajallinen. Koska validoinnissa käytettiin vain yksittäisiä aineita, menetelmän soveltuvuutta seosten testaamiseen ei ole vahvistettu. Teoriassa testimenetelmää voidaan kuitenkin soveltaa useasta ainesosasta muodostuvien aineiden, UVCB-aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin testimenetelmää käytetään useasta ainesosasta koostuvan aineen, UVCB-aineen tai seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

10. Taulukossa I esitetään tiedoksi agonistitestin tulokset 34 aineesta, jotka testattiin kummallakin tässä testimenetelmässä kuvatulla kokonaisuudessaan validoidulla testimenetelmällä. Julkaistujen raporttien perusteella näistä aineista 26 on luokiteltu varmoiksi estrogeenireseptorin agonisteiksi ja 8 negatiivisiksi. Tutkimuksissa on käytetty estrogeenireseptoriin sitoutumista ja transaktivaatiota koskevia in vitro -testejä ja/tai kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevaa testiä (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Taulukossa 2 esitetään antagonistitestin tulokset 15 aineesta, jotka testattiin kummallakin tässä testimenetelmässä kuvatulla kokonaisuudessaan validoidulla testimenetelmällä. Julkaistujen raporttien perusteella näistä aineista 4 on luokiteltu varmoiksi/oletetuiksi estrogeenireseptorin antagonisteiksi ja 10 negatiivisiksi. Tutkimuksissa on käytetty estrogeenireseptoriin sitoutumiseen ja transaktivaatioon perustuvia in vitro- testejä (2) (3) (18) (31). Taulukossa 1 ja taulukossa 2 esitettyjen tietojen osalta kaikkien aineiden luokituksessa käytetyillä kahdella vertailutestimenetelmällä saatiin täysin yhtenevät tulokset lukuun ottamatta yhtä ainetta (mifepristonia) antagonistitestissä, ja jokainen aine luokiteltiin oikein estrogeenireseptorin agonistiksi/antagonistiksi tai negatiiviseksi. Täydentäviä tietoja tästä kemikaaliryhmästä ja muista kemikaaleista, jotka testattiin STTA- ja VM7Luc ER TA -testeillä validointitutkimuksissa, on ER TA -testiä koskevissa suoritusvaatimuksissa (6) (7) (lisäys 2, taulukot 1, 2 ja 3).

▼M8

Taulukko 1

Yhteenveto STTA- ja VM7Luc ER TA -testien tuloksista: aineet, jotka testattiin kummallakin agonistitestillä ja luokiteltiin estrogeenireseptorin agonisteiksi (POS) tai negatiivisiksi (NEG)

	Aine	CAS-nro	STTA-testi (1)			VM7Luc ER TA -testi (2)		Tiedonlähde luokitusta varten (4)		
			ER TA- aktiivisuus	PC_{10}-arvo (M)	PC_{50}-arvo (b) (M)	ER TA -aktiivisuus	EC_{50}-arvo (b), (3) (M)	Muut ER TA -testit (c)	ER:ään sitoutuminen	Kohtuun vaikuttava
1	17ß-estradioli (a)	50-28-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$5{,}63 \times 10^{-12}$	POS (227/227)	POS	POS
2	17ß-estradioli (a)	57-91-0	POS	$7{,}24 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}40 \times 10^{-9}$	POS (11/11)	POS	POS
3	17ß-etinyyliestradioli (a)	57-63-6	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	POS	$7{,}31 \times 10^{-12}$	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-trenboloni	10161-33-8	POS	$1{,}78 \times 10^{-8}$	$2{,}73 \times 10^{-7}$	POS	$4{,}20 \times 10^{-8}$	POS (2/2)	ET	ET
5	19-nortestosteroni (a)	434-22-0	POS	$9{,}64 \times 10^{-9}$	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}80 \times 10^{-6}$	POS (4/4)	POS	POS
6	4-kumyylifenoli (a)	599-64-4	POS	$1{,}49 \times 10^{-7}$	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}20 \times 10^{-7}$	POS (5/5)	POS	ET
7	4-*tert*-oktyylifenoli (a)	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	POS	$3{,}19 \times 10^{-8}$	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigeniini (a)	520-36-5	POS	$1{,}31 \times 10^{-7}$	$5{,}71 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}60 \times 10^{-6}$	POS (26/26)	POS	ET
9	Atratsiini (a)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	ET
10	Bisfenoli A (a)	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	POS	$5{,}33 \times 10^{-7}$	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisfenoli B (a)	77-40-7	POS	$2{,}36 \times 10^{-8}$	$2{,}11 \times 10^{-7}$	POS	$1{,}95 \times 10^{-7}$	POS (6/6)	POS	POS
12	Butyylibentsyyliftalaatti (a)	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}98 \times 10^{-6}$	POS (12/14)	POS	NEG

▼M8

	Aine	CAS-nro	STTA-testi (1)			VM7Luc ER TA -testi (2)		Tiedonlähde luokitusta varten (4)		
			ER TA- aktiivisuus	PC_{10}-arvo (M)	PC_{50}-arvo (b) (M)	ER TA -aktiivisuus	EC_{50}-arvo (b), (3) (M)	Muut ER TA -testit (c)	ER:ään sitoutuminen	Kohtuun vaikuttava
13	Kortikosteroni (a)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	ET
14	Kumestroli (a)	479-13-0	POS	$1{,}23 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	POS	$1{,}32 \times 10^{-7}$	POS (30/30)	POS	ET
15	Daidtseiini (a)	486-66-8	POS	$1{,}76 \times 10^{-8}$	$1{,}51 \times 10^{-7}$	POS	$7{,}95 \times 10^{-7}$	POS (39/39)	POS	POS
16	Dietyylistilbestroli (a)	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	POS	$3{,}34 \times 10^{-11}$	POS (42/42)	POS	ET
17	Di-n-butyyliftalaatti	84-74-2	POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$		POS	$4{,}09 \times 10^{-6}$	POS (6/11)	POS	NEG
18	Etyyliparabeeni	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	(ei PC_{50})	POS	$2{,}48 \times 10^{-5}$	POS		ET
19	Estroni (a)	53-16-7	POS	$3{,}02 \times 10^{-11}$	$5{,}88 \times 10^{-10}$	POS	$2{,}34 \times 10^{-10}$	POS (26/28)	POS	POS
20	Genisteiini (a)	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	POS	$2{,}71 \times 10^{-7}$	POS (100/102)	POS	POS
21	Haloperidoli	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	ET
22	Kempferoli (a)	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	POS	$3{,}99 \times 10^{-6}$	POS (23/23)	POS	ET
23	Keponi (a)	143-50-0	POS	$7{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}68 \times 10^{-6}$	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS (14/18)	POS	ET
24	Ketokonatsoli	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	ET
25	Linuroni (a)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	ET
26	*meso*-heksestroli (a)	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	POS	$1{,}65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	ET
27	Metyylitestosteroni (a)	58-18-4	POS	$1{,}73 \times 10^{-7}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	ET

▼M8

	Aine	CAS-nro	STTA-testi ([1])			VM7Luc ER TA -testi ([2])		Tiedonlähde luokitusta varten ([4])		
			ER TA- aktiivisuus	PC_{10}-arvo (M)	PC_{50}-arvo ([b]) (M)	ER TA -aktiivisuus	EC_{50}-arvo ([b]), ([3]) (M)	Muut ER TA -testit ([c])	ER:ään sitoutuminen	Kohtuun vaikuttava
28	Moriini	480-16-0	POS	$5{,}43 \times 10^{-7}$	$4{,}16 \times 10^{-6}$	POS	$2{,}37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	ET
29	Noretynodreeli ([a])	68-23-5	POS	$1{,}11 \times 10^{-11}$	$1{,}50 \times 10^{-9}$	POS	$9{,}39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	ET
30	*p,p*'-metoksikloori ([a])	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	(ei PC_{50}) ([a])	POS	$1{,}92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Fenobarbitaali ([a])	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	ET
32	Reserpiini	50-55-5	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	ET
33	Spironolaktoni ([a])	52-01-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (4/4)	NEG	ET
34	Testosteroni	58-22-0	POS	$2{,}82 \times 10^{-8}$	$9{,}78 \times 10^{-6}$	POS	$1{,}75 \times 10^{-5}$	POS (5/10)	POS	ET

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; M = molaarinen; EC_{50} = puolet testiaineen suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta; NEG = negatiivinen; POS = positiivinen; ET = ei testattu; PC_{10} (ja PC_{50}) = testiaineen pitoisuus, jossa vaste on 10 prosenttia (tai 50 % PC_{50}-määrityksessä) positiivisen kontrollin aiheuttamasta vasteesta (E2, 1nM) kussakin maljassa.

([a]) Yleiset aineet, jotka testattiin STTA- ja VM7Luc ER TA -testeissä ja jotka määritettiin estrogeenireseptorin agonisteiksi tai negatiivisiksi ja joita käytettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimuksessa tarkkuuden arviointiin (ICCVAMin VM7Luc ER TA -arviointiraportti, taulukko 4-1(3)).

([b]) Testattu enimmäispitoisuus, kun sytotoksisuudesta tai liukenemattomuudesta johtuvia rajoituksia ei ollut, oli 1×10^{-5} M (STTA-testi) ja 1×10^{-3} M (VM7Luc ER TA -testi).

([c]) Suluissa olevat numerot tarkoittavat niitä testituloksia, jotka luokiteltiin positiivisiksi (POS) tai negatiivisiksi (NEG) kyseisten tutkimusten kokonaismäärästä.

([1]) Arvot, jotka on ilmoitettu estrogeenisen vaikutuksen havaitsemiseen tarkoitetun, pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transkriptionaalinen aktivaatio -testin prevalidointia ja laboratorioiden välistä validointia koskevassa raporttiluonnoksessa (ihmisen estrogeenireseptorin alfavälitteinen reporttergeenitesti, jossa käytetään solulinjaa hER-HeLa-9903) (2)

([2]) ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportti: LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: estrogeenireseptorin agonistien ja antagonistien määrittämiseen tarkoitettu *in vitro* -menetelmä (3)

([3]) EC_{50}-arvojen keskiarvot laskettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimukseen osallistuneiden laboratorioiden ilmoittamilla arvoilla (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) (3).

([4]) Luokittelu estrogeenireseptorin agonistiksi tai antagonistiksi perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testimenetelmiä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (31) sekä näiden tausta-asiakirjojen laatimisen jälkeen julkaistuista ja arvioiduista julkaisuista saatuihin tietoihin (2) (3) (18) (31) (33) (34).
Huom. Kaikissa tämän testimenetelmän mukaisissa testeissä ei tehty samoja mittauksia. Tietyissä tapauksissa EC_{50}-arvoa ei voida laskea, koska täydellistä annos-vastekäyrää ei ole laadittu. STTA-testissä PC_{10}-arvo on keskeinen mitattava arvo, joten voi olla myös muita esimerkkejä, joissa PCx-arvosta saa hyödyllistä tietoa.

▼M8

Taulukko 2

Vertailu STTA- ja VM7Luc ER TA -testien tuloksista: aineet, jotka testattiin kummallakin antagonistitestillä ja luokiteltiin estrogeenireseptorin antagonisteiksi (POS) tai negatiivisiksi (NEG)

	Aine ([a])	CAS-nro	ER STTA -testi ([1])		VM7Luc ER TA -testi ([2])		ER STTA -testin mahdolliset vaikutukset ([4])	ICCVAMin ([5]) yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän ([6]) kemiallinen luokka	Tuoteluokka ([7])
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]) (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]), ([3]) (M)				
1	4-hydroksitamoksifeeni	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	kohtalaisesti POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
2	Dibentso[a.h]antraseeni	53-70-3	POS	Ei IC_{50}	POS	Ei IC_{50}	POS	OP	Polysyklinen yhdiste	Laboratoriokemikaali, luonnontuote
3	Mifepristoni	84371-65-3	POS	$5{,}61 \times 10^{-6}$	NEG	—	lievästi POS	NEG	Steroidi	Lääkkeet
4	Raloksifeeni HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	kohtalaisesti POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
5	Tamoksifeeni	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
6	17ß-estradioli	50-28-2	NEG	—	NEG	—	ON	ON	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääkkeet

▼M8

	Aine ([a])	CAS-nro	ER STTA -testi ([1])		VM7Luc ER TA -testi ([2])		ER STTA -testin mahdolliset vaikutukset ([4])	ICCVAMin ([5]) yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän ([6]) kemiallinen luokka	Tuoteluokka ([7])
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]) (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]), ([3]) (M)				
7	Apigeniini	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterosyklinen yhdiste	Väriaine, luonnontuote, farmaseuttinen välituote
8	Atratsiini	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	ON	Heterosyklinen yhdiste	Rikkakasvien torjunta-aine
9	Di-n-butyyliftalaatti	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Esteri, ftaalihappo	Kosmetiikan ainesosa, teollisuuskemikaali, pehmennin
10	Fenarimoli	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	ei testattu	ON	Heterosyklinen yhdiste, pyrimidiini	Sienitautien torjunta-aine
11	Flavoni	525-82-6	NEG	—	NEG	—	ON	ON	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
12	Flutamidi	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	ON	Amidi	Lääkkeet, eläinlääkkeet
13	Genisteiini	446-72-0	NEG	—	NEG	—	ON	NEG	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet

▼M8

	Aine ([a])	CAS-nro	ER STTA -testi ([1])		VM7Luc ER TA -testi ([2])		ER STTA -testin mahdolliset vaikutukset ([4])	ICCVAMin ([5]) yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän ([6]) kemiallinen luokka	Tuoteluokka ([7])
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]) (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50}-arvo ([b]), ([3]) (M)				
14	p-n-nonyylifenoli	104-40-5	NEG	—	NEG	—	ei testattu	NEG	Fenoli	Välituote
15	Resveratroli	501-36-0	NEG	—	NEG	—	ON	NEG	Hiilivety (syklinen)	Luonnontuote

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; M = molaarinen; IC_{50} = testiaineen enimmäispitoisuus, joka estää tietyn parametrin 50-prosenttisesti; NEG = negatiivinen; ON = oletettavasti negatiivinen; POS = positiivinen; OP = oletettavasti positiivinen.

([a]) Yleiset aineet, jotka testattiin STTA- ja VM7Luc ER TA -testeissä ja jotka määritettiin estrogeenireseptorin antagonisteiksi tai negatiivisiksi ja joita käytettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimuksessa tarkkuuden arviointiin (2) (3).

([b]) Testattu enimmäispitoisuus, kun sytotoksisuudesta tai liukenemattomuudesta johtuvia rajoituksia ei ollut, oli 1×10^{-3} M (STTA-testi) ja 1×10^{-5} M (VM7Luc ER TA -testi).

([1]) Estrogeenireseptorivälitteisten vaikutusten havaitsemiseen tarkoitetun, pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transkriptionaalinen aktivaatio -testin validointiraportti, osa B (2)

([2]) ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportti: LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

([3]) IC_{50}-arvojen keskiarvot laskettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimukseen osallistuneiden laboratorioiden ilmoittamilla arvoilla (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) (3).

([4]) Estrogeenireseptorin STTA-vaikutus pääteltiin niiden ilmoitettujen vaikutusten perusteella, jotka tunnetaan estrogeenireseptorin sitoutumistestistä saatujen aikaisempien CERI-tietojen pohjalta sekä kohtuun kohdistuvien vaikutusten testin ja avoimesta kirjallisuudesta kerättyjen tietojen pohjalta (2).

([5]) Luokittelu estrogeenireseptorin antagonistiksi tai negatiiviseksi perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testejä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (31) sekä näiden tausta-asiakirjojen laatimisen jälkeen julkaistuista ja arvioiduista julkaisuista saatuihin tietoihin (2) (3) (18) (31).

([6]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan kemialliseen luokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen lääketieteen asiasanaston (MeSH) mukaisesti. Se on kansainvälisesti hyväksytty standardoitu luokittelumalli (saatavana osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan tuoteluokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen vaarallisten aineiden tietokannan mukaisesti (saatavana osoitteessa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

ER TA -TESTIN OSAT

Testin oleelliset osat

11. Tätä testimenetelmää sovelletaan testeihin, joissa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja sisältävää tai endogeenista ERα-reseptoria ja pysyvästi transfektoituja soluja sisältävää reportterigeenikonstruktiota yhden tai useamman estrogeenivaste-elementin säätelemänä; myös muita reseptoreita, kuten ERβ:aa, voidaan käyttää. Nämä ovat testin oleelliset osat.

Kontrollit

12. Ehdotukset kunkin agonisti- ja antagonistitestin samanaikaisista vertailustandardeista on perusteltava. Samanaikaiset kontrollit (negatiivinen, liuotin ja positiivinen), sen mukaan mikä on tarpeen, osoittavat, että testi toimii testiolosuhteissa. Lisäksi ne muodostavat perustan kokeiden välisille vertailuille; ne ovat yleensä osa tietyn kokeen hyväksymisperusteita (1).

Laadunvalvonnan vakiomenettelyt

13. Laatua on valvottava kuvattujen vakiomenettelyjen mukaisesti jokaisessa testissä, jotta varmistetaan, että solulinja pysyy vakaana useamman siirrostuksen yhteydessä ja mykoplasmattomana (ts. ettei siinä ole bakteerikontaminaatiota) ja että sen kyky tuottaa odotuksenmukaisia estrogeenireseptorivälitteisiä vasteita säilyy pidemmällä aikavälillä. Lisäksi solulinjoista on tarkistettava, että niiden identiteetti on oikea ja ettei niissä ole muita kontaminantteja (esimerkiksi sieniä, hiivoja ja viruksia).

Laboratorion pätevyyden osoittaminen

14. Ennen tuntemattomien kemikaalien testaamista tällä testimenetelmällä jokaisen laboratorion on osoitettava pätevyytensä testin käyttämisessä. Osoittaakseen pätevyytensä jokaisen laboratorion on testattava taulukossa 3 luetellut 14 pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta agonistitestissä ja taulukossa 4 luetellut 10 pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta antagonistitestissä. Pätevyyden osoittamistestillä vahvistetaan myös testijärjestelmän reagointikyky. Luettelo pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista koostuu joukosta ER TA -testien suoritusvaatimuksissa esitettyjä vertailuaineita (6). Nämä aineet ovat kaupallisesti saatavilla, ja ne edustavat sellaisten kemikaalien luokkia, jotka yleensä liitetään estrogeenireseptorin agonisti- tai antagonistivaikutukseen. Lisäksi niiden vaikutuksen voimakkuuden vaihteluväli on estrogeenireseptorin agonistien/antagonistien kannalta sopiva (ts. voimakkaasta heikkoon), ja niiden joukossa on myös negatiivisia aineita. Pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaus on toistettava vähintään kahdesti eri päivinä. Pätevyys osoitetaan luokittelemalla jokainen pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu aine oikein (positiivinen/negatiivinen). Jokaisen laboratorioteknikon on toistettava pätevyystesti testien tekemistä opetellessaan. Solutyypin mukaan jotkin näistä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista voivat toimia SERMeinä ja vaikuttaa sekä agonistin että antagonistin tavoin. Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on kuitenkin luokiteltu taulukossa 3 ja 4 niiden tunnetun pääasiallisen vaikutuksen mukaan, ja pätevyyden arvioinnissa tulisi käyttää sitä.

15. Pätevyyden osoittamiseksi ja laadunvalvontaa varten jokaisen laboratorion on kerättävä agonisteista ja antagonisteista aikaisempia tietoja sisältävät tietokannat, jotka perustuvat tietoihin vertailustandardeista (esimerkiksi 17β-estradioli ja tamoksifeeni), positiivisista ja negatiivisista kontrollikemikaaleista ja liuotinkontrollista (esimerkiksi DMSO). Aluksi tietokanta on luotava vähintään 10 riippumattomasta agonistitestiajosta (esimerkiksi 17β-estradioli) ja 10 riippumattomasta antagonistitestiajosta (esimerkiksi tamoksifeeni). Tietokantaa on laajennettava lisäämällä siihen tulokset näillä vertailustandardeilla ja liuotinkontrolleilla myöhemmin tehtävistä analyyseista. Näin varmistetaan laboratorion biotestien tasalaatuisuus ja suorituskyky pidemmällä aikavälillä.

▼M8

Taulukko 3

Luettelo (14:stä) pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta (agonistitesti) [1]

Nro [8]	Aine	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste [2]	STTA-testi			VM7Luc ER TA -testi		MeSH-järjestelmän mukainen kemiallinen luokka [6]	Tuoteluokka [7]
				PC_{10}-arvo (M) [3]	PC_{50}-arvo (M) [3]	Testin pit.alue (M)	VM7Luc EC_{50}-arvo (M) [4]	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) [5]		
14	Dietyylistilbestroli	56-53-1	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}04 \times 10^{-11}$	10^{-14}–10^{-8}	$3{,}34 \times 10^{-11}$	$3{,}73 \times 10^{-4}$	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet, eläinlääkkeet
12	17ß-estradioli	57-91-0	POS	$4{,}27 \times 10^{-11}$	$6{,}44 \times 10^{-10}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}40 \times 10^{-9}$	$3{,}67 \times 10^{-3}$	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääkkeet
15	*meso*-heksestroli	84-16-2	POS	$< 1{,}00 \times 10^{-11}$	$2{,}75 \times 10^{-11}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}65 \times 10^{-11}$	$3{,}70 \times 10^{-3}$	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääkkeet
11	4-*tert*-oktyylifenoli	140-66-9	POS	$1{,}85 \times 10^{-9}$	$7{,}37 \times 10^{-8}$	10^{-11}–10^{-5}	$3{,}19 \times 10^{-8}$	$4{,}85 \times 10^{-3}$	Fenoli	Välituote
9	Genisteiini	446-72-0	POS	$2{,}24 \times 10^{-9}$	$2{,}45 \times 10^{-8}$	10^{-11}–10^{-5}	$2{,}71 \times 10^{-7}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
6	Bisfenoli A	80-05-7	POS	$2{,}02 \times 10^{-8}$	$2{,}94 \times 10^{-7}$	10^{-11}–10^{-5}	$5{,}33 \times 10^{-7}$	$4{,}38 \times 10^{-3}$	Fenoli	Välituote

▼M8

Nro ([8])	Aine	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste ([2])	STTA-testi			VM7Luc ER TA -testi		MeSH-järjestelmän mukainen kemiallinen luokka ([6])	Tuoteluokka ([7])
				PC_{10}-arvo (M) ([3])	PC_{50}-arvo (M) ([3])	Testin pit.alue (M)	VM7Luc EC_{50}-arvo (M) ([4])	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) ([5])		
2	Kempferoli	520-18-3	POS	$1{,}36 \times 10^{-7}$	$1{,}21 \times 10^{-6}$	10^{-11}–10^{-5}	$3{,}99 \times 10^{-6}$	$3{,}49 \times 10^{-3}$	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote
3	Butyylibentsyyliftalaatti	85-68-7	POS	$1{,}14 \times 10^{-6}$	$4{,}11 \times 10^{-6}$	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}98 \times 10^{-6}$	$3{,}20 \times 10^{-4}$	Karboksyylihappo, esteri, ftaalihappo	Pehmennin, teollisuuskemikaali
4	*p,p*'-metoksikloori	72-43-5	POS	$1{,}23 \times 10^{-6}$	—	10^{-11}–10^{-5}	$1{,}92 \times 10^{-6}$	$2{,}89 \times 10^{-3}$	Hiilivety (halogenoitu)	Torjunta-aineet, eläinlääkkeet
1	Etyyliparabeeni	120-47-8	POS	$5{,}00 \times 10^{-6}$	—	10^{-11}–10^{-5}	$2{,}48 \times 10^{-5}$	$6{,}02 \times 10^{-3}$	Karboksyylihappo, fenoli	Lääkkeet, säilöntäaineet
17	Atratsiini	1912-24-9	NEG	—	—	10^{-10}–10^{-4}	—	$4{,}64 \times 10^{-4}$	Heterosyklinen yhdiste	Rikkakasvien torjunta-aine
20	Spironolaktoni	52-01-7	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$2{,}40 \times 10^{-3}$	Laktoni, steroidi	Lääkkeet
21	Ketokonatsoli	65277-42-1	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$9{,}41 \times 10^{-5}$	Heterosyklinen yhdiste	Lääkkeet

▼M8

Nro ([8])	Aine	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste ([2])	STTA-testi			VM7Luc ER TA -testi		MeSH-järjestelmän mukainen kemiallinen luokka ([6])	Tuoteluokka ([7])
				PC_{10}-arvo (M) ([3])	PC_{50}-arvo (M) ([3])	Testin pit.alue (M)	VM7Luc EC_{50}-arvo (M) ([4])	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) ([5])		
22	Reserpiini	50-55-5	NEG	—	—	10^{-11}–10^{-5}	—	$1{,}64 \times 10^{-3}$	Heterosyklinen yhdiste, indoli	Lääkkeet, eläinlääkkeet

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; EC_{50} = puolet testiaineen suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta; NEG = negatiivinen; POS = positiivinen; PC_{10} (ja PC_{50}) = testiaineen pitoisuus, jossa vaste on 10 prosenttia (tai 50 % PC_{50}-määrityksessä) positiivisen kontrollin aiheuttamasta vasteesta (E2, 1nM) kussakin maljassa.

([1]) Luokittelu estrogeenireseptorin agonistivaikutuksen kannalta positiiviseksi tai negatiiviseksi perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testejä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (31) sekä näiden tausta-asiakirjojen laatimisen jälkeen julkaistuista ja arvioiduista vertailututkimuksista saatuihin empiirisiin ja muihin tietoihin (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Arvot, jotka on ilmoitettu estrogeenisen vaikutuksen havaitsemiseen tarkoitetun, pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transkriptionaalinen aktivaatio -testin prevalidointia ja laboratorioiden välistä validointia koskevassa raporttiluonnoksessa (ihmisen estrogeenireseptorin alfavälitteinen reportterigeenitesti, jossa käytetään solulinjaa hER-HeLa-9903) (30).

([3]) EC_{50}-arvojen keskiarvot laskettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimukseen osallistuneiden laboratorioiden ilmoittamilla arvoilla (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) (3).

([4]) Tässä ilmoitetut pitoisuudet olivat suurimmat testatut pitoisuudet (annosalueen määritys) VM7Luc ER TA -testin validointitutkimuksessa. Jos pitoisuudet vaihtelivat laboratorioiden välillä, tässä on ilmoitettu suurin pitoisuus. Ks. ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportin taulukko 4-10; LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan kemialliseen luokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen lääketieteen asiasanaston (MeSH) mukaisesti. Se on kansainvälisesti hyväksytty standardoitu luokittelumalli (saatavana osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan tuoteluokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen vaarallisten aineiden tietokannan mukaisesti (saatavana osoitteessa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) Suoritusvaatimusten taulukosta 1 (luettelo vertailukemikaaleista (22) estrogeenireseptorin agonistin tarkkuuden arviointiin) (6)

([8]) Jos pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta ei ole enää kaupallisesti saatavilla, voidaan käyttää ainetta, jonka luokitus on sama ja voimakkuus, vaikutustapa ja kemiallinen luokka ovat vertailukelpoiset.

▼M8

Taulukko 4

Luettelo (10:stä) pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta (antagonistitesti)

	Aine ([a])	CAS-nro	ER STTA -testi ([1])			VM7Luc ER TA -testi ([2])			ER STTA ([1]) mahdolliset vaikutukset	ICCVAMin ([5]) yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän ([6]) Kemiallinen luokka	Tuoteluokka ([7])
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50} (M)	Testin pit.alue (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50} ([3]) (M)	Suurin pit. ann. määritystestissä-(M) ([4])				
1	4-hydroksitamoksifeeni	68047-06-3	POS	$3{,}97 \times 10^{-9}$	10^{-12}–10^{-7}	POS	$2{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}58 \times 10^{-4}$	kohtalaisesti POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
2	Raloksifeeni HCl	82640-04-8	POS	$7{,}86 \times 10^{-10}$	10^{-12}–10^{-7}	POS	$1{,}19 \times 10^{-9}$	$1{,}96 \times 10^{-4}$	kohtalaisesti POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
3	Tamoksifeeni	10540-29-1	POS	$4{,}91 \times 10^{-7}$	10^{-10}–10^{-5}	POS	$8{,}17 \times 10^{-7}$	$2{,}69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet
4	17ß-estradioli	50-28-2	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}67 \times 10^{-3}$	oletettavasti negatiivinen (*)	ON	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääkkeet
5	Apigeniini	520-36-5	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterosyklinen yhdiste	Väriaine, luonnontuote, farmaseuttinen välituote
6	Di-n-butyyliftalaatti	84-74-2	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$3{,}59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Esteri, ftaalihappo	Kosmetiikan ainesosa, teollisuuskemikaali, pehmennin

▼M8

	Aine ([a])	CAS-nro	ER STTA -testi ([1])			VM7Luc ER TA -testi ([2])			ER STTA ([1]) mahdolliset vaikutukset	ICCVAMin ([5]) yksimielinen luokitus	MeSH-järjestelmän ([6]) Kemiallinen luokka	Tuoteluokka ([7])
			ER TA -aktiivisuus	IC_{50} (M)	Testin pit.alue (M)	ER TA -aktiivisuus	IC_{50} ([3]) (M)	Suurin pit. ann. määritystestissä (M) ([4])				
7	Flavoni	525-82-6	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$4{,}50 \times 10^{-4}$	oletettavasti negatiivinen (*)	ON	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
8	Genisteiini	446-72-0	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$3{,}70 \times 10^{-4}$	oletettavasti negatiivinen (*)	NEG	Flavonoidi, heterosyklinen yhdiste	Luonnontuote, lääkkeet
9	p-n-nonyylifenoli	104-40-5	NEG	—	10^{-9}–10^{-4}	NEG	—	$4{,}54 \times 10^{-4}$	ei testattu	NEG	Fenoli	Välituote
10	Resveratroli	501-36-0	NEG	—	10^{-8}–10^{-3}	NEG	—	$4{,}38 \times 10^{-4}$	oletettavasti negatiivinen (*)	NEG	Hiilivety (syklinen)	Luonnontuote

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; M = molaarinen; IC_{50} = puolet testiaineen suurimmasta estävästä pitoisuudesta; NEG = negatiivinen; ON = oletettavasti negatiivinen; POS = positiivinen.

(*) Luokiteltu negatiiviseksi kirjallisuuskatsauksen perusteella (2).

([a]) Yleiset aineet, jotka testattiin STTA- ja VM7Luc ER TA -testeissä ja jotka määritettiin estrogeenireseptorin antagonisteiksi tai negatiivisiksi ja joita käytettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimuksessa tarkkuuden arviointiin (2) (3).

([1]) Estrogeenireseptorivälitteisten vaikutusten havaitsemiseen tarkoitetun, pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transkriptionaalinen aktivaatio -testin validointiraportti, osa B (2)

([2]) ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportti: LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: estrogeenireseptorin agonistien ja antagonistien määrittämiseen tarkoitettu *in vitro* -menetelmä (3).

([3]) IC_{50}-arvojen keskiarvot laskettiin VM7Luc ER TA -validointitutkimukseen osallistuneiden laboratorioiden ilmoittamilla arvoilla (XDS, ECVAM ja Hiyoshi) (3).

([4]) Tässä ilmoitetut pitoisuudet olivat suurimmat testatut pitoisuudet (annosalueen määritys) VM7Luc ER TA -testin validointitutkimuksessa. Jos pitoisuudet vaihtelivat laboratorioiden välillä, tässä on ilmoitettu suurin pitoisuus. Ks. ICCVAMin testimenetelmän arviointiraportin taulukko 4-11; LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) -testimenetelmä: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

([5]) Luokittelu estrogeenireseptorin antagonistiksi tai negatiiviseksi perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testimenetelmiä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (31) sekä näiden tausta-asiakirjojen laatimisen jälkeen julkaistuista ja arvioiduista julkaisuista saatuihin tietoihin (2) (3) (18) (31).

([6]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan kemialliseen luokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen lääketieteen asiasanaston (MeSH) mukaisesti. Se on kansainvälisesti hyväksytty standardoitu luokittelumalli (saatavana osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan tuoteluokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen vaarallisten aineiden tietokannan mukaisesti (saatavana osoitteessa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

Testiajon hyväksymisperusteet

16. Testiajon hyväksyminen tai hylkääminen perustuu vertailustandardeista ja jokaisessa kokeessa käytetyistä kontrolleista saatujen tulosten arviointiin. Vertailustandardien PC_{50}-, (EC_{50}) tai IC_{50}-arvojen on täytettävä valitun testin hyväksymisperusteet (STTA: ks. lisäys 2, VM7Luc ER TA: ks. lisäys 3), ja kaikkien positiivisten/negatiivisten kontrollien on oltava oikein luokiteltu jokaisessa hyväksytyssä kokeessa. Kyky tehdä testi johdonmukaisesti on osoitettava perustamalla aikaisemmat tiedot vertailustandardeista ja kontrolleista sisältävä tietokanta ja ylläpitämällä sitä (ks. 15 kohta). Keskihajontalukuja tai variaatiokertoimia voidaan käyttää vertailustandardien käyrän sovitusparametrien keskiarvoina useista kokeista laboratoriosisäisen uusittavuuden mittarina. Lisäksi on noudatettava seuraavia hyväksymisperusteisiin liittyviä periaatteita:

— Tietojen on oltava riittävät, jotta estrogeenireseptorin aktivoituminen (agonistitesti) tai suppressoituminen (antagonistitesti) voidaan arvioida kvantitatiivisesti (ts. teho ja voimakkuus).

— Reportterigeenin keskimääräinen vaikutus vertailuestrogeenin vertailupitoisuuteen on määritettävä testeissä vähintään minimissään ainakin kantaja-aine- tai liuotinkontrollin pitoisuuteen nähden, jotta varmistetaan, että testin herkkyys on riittävä. STTA- ja VM7Luc ER TA -testeissä se on neljä kertaa kunkin maljan kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

— Testattujen pitoisuuksien on pysyttävä testikemikaalien liukoisuusalueen rajoissa, eivätkä ne saa osoittautua sytotoksisiksi.

Aineiston analysointi

17. Positiiviset ja negatiiviset vasteet on luokiteltava kullekin testille määritetyn aineistontulkintamenettelyn mukaisesti.

18. Hyväksymisperusteiden täyttyminen (16 kohta) osoittaa, että testi toimii asianmukaisesti, mutta se ei takaa, että mikä tahansa testiajo tuottaa tarkkaa tietoa. Ensimmäisen testiajon tulosten toistuvuus on paras osoitus siitä, että testi tuottaa tarkkaa tietoa. Jos kahdesta testiajosta saadaan toistuvat tulokset (ts. kumpikin testiajo osoittaa, että testikemikaali on positiivinen), kolmatta testiajoa ei tarvitse tehdä.

19. Jos kahdesta testiajosta ei saada toistuvia tuloksia (ts. testikemikaali on yhdessä ajossa positiivinen ja toisessa negatiivinen) tai jos tämän testin tulos täytyy varmistaa, on tehtävä vähintään kolme itsenäistä ajoa. Tässä tapauksessa luokitus perustuu kahteen toistuvaan tulokseen kolmesta.

Yleiset aineiston tulkintaperusteet

20. Tällä hetkellä ER TA -aineiston tulkintaan ei ole yleisesti hyväksyttyä menetelmää. Estrogeenireseptorivälitteisen vaikutuksen laadullisten (ts. positiivinen/negatiivinen) ja/tai määrällisten (esimerkiksi EC_{50}, PC_{50}, IC_{50}) arviointien on perustuttava empiiriseen aineistoon ja vankkaan tieteelliseen näkemykseen. Mikäli mahdollista, positiivisia tuloksia on luonnehdittava sekä vaikutuksen suuruusluokalla kantaja-aine- tai liuotinkontrolliin tai vertailuestrogeeniin verrattuna että sillä pitoisuudella, jolla vaikutus ilmaantuu (esimerkiksi EC_{50}, PC_{50}, RPC_{Max}, IC_{50} jne.).

▼**M8**

Testiraportti

21. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi:

— käytetty testi

— kontrolli/vertailustandardi/testikemikaali

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— pH-arvon mittaus, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus kasvatusaineessa, johon testikemikaalia lisättiin, kun tätä tarvitaan.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin/kantaja-aine:

— luonnehdinta (luonne, toimittaja ja erä)

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Solut:

— solujen tyyppi ja lähde:

  • Ilmentyykö estrogeenireseptori endogeenisesti? Jos ei, mikä reseptori (mitkä reseptorit) transfektoitiin?

  • Käytetty reportterikonstruktio (käytetyt konstruktiot) (myös lähdelajit)

  • Transfektiomenetelmä

  • Valintamenetelmä pysyvän transfektion ylläpitämiseksi (tarvittaessa)

  • Onko transfektiomenetelmä oleellinen linjojen stabiiliuden kannalta?

— siirrostusten lukumäärä (sulatuksesta)

▼**M8**

— solujen siirrostusnumero sulatettaessa

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät.

Testiolosuhteet:

— liukoisuusrajoitukset

— kuvaus elinkykyisyyden arviointiin käytetyistä menetelmistä

— kasvatusliuosten koostumus, CO_2-pitoisuus

— testikemikaalin pitoisuudet

— kantaja-aineen ja lisätyn testikemikaalin määrä

— inkubaatiolämpötila ja kosteus

— altistuksen kesto

— solutiheys altistuksen alussa ja aikana

— positiiviset ja negatiiviset vertailustandardit

— reportterireagenssit (tuotenimi, toimittaja ja erä)

— kriteerit, joiden perusteella testiajot määritetään positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Hyväksyttävyystarkastus:

— induktiokertoimet jokaiselle testilevylle ja tieto siitä, täyttävätkö ne testin edellyttämät, aikaisempiin kontrolleihin perustuvat vähimmäisvaatimukset

— hyväksymisperusteiden todelliset arvot, kuten $\log_{10}EC_{50}$, $\log_{10}PC_{50}$, $\log IC_{50}$ ja Hillslope-arvot samanaikaisille positiivisille kontrolleille/vertailustandardeille.

Tulokset:

— raakatiedot ja normalisoidut tiedot

— suurin induktiokerroin

— sytotoksisuustiedot

— pienin vaikuttava pitoisuus (LEC), jos saatavana

— RPC_{Max}-, PC_{Max}-, PC_{50}-, IC_{50}- ja/tai EC_{50}-arvot tarvittaessa

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

▼M8

— mahdolliset tilastoanalyysit sekä virhe- ja luottamusvälitiedot (esimerkiksi rakenneyhtälömalli, keskihajonta, variaatiokerroin tai 95 prosentin luottamusväli) ja kuvaus siitä, miten nämä arvot saatiin.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): s. 5367–73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): s. 67–82.

(6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(8) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20–26.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): s. 1073–89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): s. 63–66.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): s. 179–189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): s. 173–187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): s. 91–98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): s. 81–118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol, 71(10): s. 1459–69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102–103, 677–680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): s. 379–383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): s. 122–126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(12): s. 4258–4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): s. 204–211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): s. 105–12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): s. 1703–1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): s. 558–568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): s. 1460–1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): s. 515–522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: s. 45–80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3): s. 547–569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785–94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530–1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550–1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280–288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649–654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072–2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67–82.

▼**M8**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT JA LYHENTEET

Hyväksymisperusteet: Kontrollikokeiden suorittamista ja vertailustandardeja koskevat vähimmäisvaatimukset. Kaikkien hyväksymisperusteiden on täytyttävä, jotta koe olisi validi.

Tarkkuus (vastaavuus): Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testin suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testin oikeiden tulosten osuutta (1).

Agonisti: Aine, joka tuottaa vasteen, esimerkiksi transkription, kun se sitoutuu tiettyyn reseptoriin.

Antagonisti: Sellainen reseptorin ligandi tai kemikaali, joka ei aiheuta biologista vastetta sitoutuessaan reseptoriin vaan estää tai heikentää agonistivälitteisiä vasteita.

Antiestrogeeninen vaikutus: Kemikaalin kyky estää estrogeenireseptoreiden välittämä 17β-estradiolin vaikutus.

Solumorfologia: Kudosviljelylevyn yhdessä kuopassa yhdessä kerroksessa kasvatettavien solujen muoto ja ulkonäkö. Kuolemassa olevien solujen solumorfologia on usein poikkeava.

TM: Hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva OECD:n toimintamalli.

Hiili-/dekstraanikäsittely: Soluviljelmässä käytettävän seerumin käsittely. Hiilellä/dekstraanilla käsittely (josta käytetään usein nimitystä ”strippaaminen”) poistaa endogeeniset hormonit ja hormoneja sitovat proteiinit.

Kemikaali: Aine tai seos.

Sytotoksisuus: Solun rakenteeseen tai toimintaan kohdistuvat haitalliset vaikutukset, jotka voivat aiheuttaa solukuoleman ja jotka havaitaan solujen määrän vähenemisenä kuopassa altistusjakson päättyessä tai solun toimintakyvyn vähenemisenä, kun sitä verrataan samanaikaiseen kantaja-ainekontrolliin.

CV: Variaatiokerroin

DCC-FBS: Dekstraanilla pinnoitetulla hiilellä käsitelty seerumi, joka on valmistettu naudan sikiön verestä.

DMEM: Dulbecco’s Modification of Eagle’s Medium

DMSO: Dimetyylisulfoksidi

E2: 17β-estradioli

EC50: Puolet testikemikaalin suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta.

HH: Hormonitoiminnan häiriöt

hERα: ihmisen estrogeenireseptori alfa

▼**M8**

hERß: ihmisen estrogeenireseptori beeta

EFM: Estrogeeniton kasvatusaine. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), johon lisätään 4,5-prosenttista hiili-/dekstraanikäsiteltyä FBS:ää, 1,9-prosenttista L-glutamiinia ja 0,9-prosenttista Pen-Strepiä.

ER: Estrogeenireseptori

ERE: Estrogeeniherkkä elementti

Estrogeeninen vaikutus: Kemikaalin kyky jäljitellä 17β-estradiolin kykyä sitoutua estrogeenireseptoreihin ja aktivoida niitä. Tällä testimenetelmällä voidaan havaita hERα-välitteinen estrogeeninen vaikutus.

ERTA: Estrogeenireseptorin transaktivaatio

FBS: Naudan sikiön verestä valmistettu seerumi

HeLa: Ihmisen kohdunkaulan syöpäsoluihin perustuva immortalisoitu solulinja

HeLa9903: HeLa-solun alaklooni, johon hERααja lusiferaasireportterigeeni on transfektoitu pysyvästi

IC_{50}: Puolet estävän testikemikaalin suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea).

Laboratorioidenvälinen toistettavuus: Se, missä määrin eri pätevät laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samoja tutkimussuunnitelmia ja testaamalla samoja aineita. Laboratorioidenvälinen toistettavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (1).

Laboratorionsisäinen toistettavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimussuunnitelmaa eri ajankohtina. (1).

LEC: Lowest effective concentration eli testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla saadaan vaste (ts. testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla induktiokerroin eroaa tilastollisesti samanaikaisesta kantaja-ainekontrollista).

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testille, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmä. Tarkoittaa samaa kuin samanlainen testimenetelmä.

MT: Metallotioneiini

MMTV: Hiiren rintasyöpävirus

OHT: 4-hydroksitamoksifeeni

TPTO: Tulosperusteinen testiohje

▼**M8**

PK (positiivinen kontrolli): Voimakkaasti vaikuttava aine, mieluiten 17ß-estradioli, joka sisältyy kaikkiin testeihin, jotta varmistetaan, että testi toimii asianmukaisesti.

PC_{10}: Se testikemikaalin pitoisuus, jossa agonistitestissä mitattu vaikutus on 10 prosenttia positiivisen kontrollin (STTA-testi: E2, 1 nM) aiheuttamasta enimmäisvaikutuksesta jokaisessa maljassa.

PC_{50}: Se testikemikaalin pitoisuus, jossa agonistitestissä mitattu vaikutus on 50 prosenttia positiivisen kontrollin (E2 testimenetelmässä määritettynä vertailupitoisuutena) aiheuttamasta enimmäisvaikutuksesta jokaisessa maljassa.

PC_{Max}: Testikemikaalin pitoisuus, joka aiheuttaa RPCMaxin.

Suoritusvaatimukset: Validoituun testiin perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testin vertailtavuutta. Vaatimuksiin sisältyy 1) testin oleelliset osat; 2) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä ja 3) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetulla testillä on osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (1).

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet: Joukko suoritusvaatimuksiin sisältyviä vertailuaineita, joita laboratoriot voivat käyttää ovat vakiotestimenetelmään liittyvän teknisen osaamisensa osoittamisessa. Näiden aineiden valintaperusteisiin kuuluu yleensä se, että niiden on edustettava erilaisia vasteita ja oltava kaupallisesti saatavilla. Lisäksi niistä on oltava käytettävissä laadukkaita vertailutietoja.

Pätevyys: Osoitettu kyky tehdä testi asianmukaisesti ennen tuntemattomien aineiden testaamista.

Vertailuestrogeeni (positiivinen kontrolli, PK): 17β-estradioli (E2, CAS 50-28-2).

Vertailustandardi: Vertailuaine, jota käytetään osoittamaan testin asianmukaisuus. STTA- ja VM7Luc ER TA -testien vertailustandardi on 17β-estradioli.

Vertailutestimenetelmät: Testit, joihin tulosperusteinen testiohje 455 perustuu.

Merkityksellisyys: Kuvaus testimenetelmän ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testimenetelmä tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyys määritetään laskemalla testin tarkkuus (vastaavuus) (1).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa.

RLU: Suhteellinen valoyksikkö (relative light unit)

RNA: Ribonukleiinihappo

RPC_{Max}: Testikemikaalin aiheuttama suurin vaste, joka ilmaistaan prosenttiosuutena E2:n (1 nM) aiheuttamasta vasteesta samassa maljassa.

▼M8

RPMI: RPMI 1640 -kasvatusliuos, jota on täydennetty 0,9-prosenttisella Pen-Strepillä ja 8,0-prosenttisella FBS-seerumilla

Testiajo: Yksittäinen koe, jossa arvioidaan kemiallisen vaikutusta testin biologiseen tulokseen. Jokainen testiajo on kattava koe, joka tehdään rinnakkaisilla kuopissa olevilla soluilla, jotka on maljattu yhteisestä soluvarannosta samaan aikaan.

Riippumaton testiajo: Erillinen, riippumaton koe, jossa arvioidaan kemiallista vaikutusta testin biologiseen tulokseen ja jossa käytetään eri varannosta peräisin olevia soluja, tuoreita laimennettuja kemikaaleja ja jotka eri työntekijät tekevät eri päivinä tai samana päivänä.

SD: Keskihajonta

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten aineiden osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (1).

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten aineiden osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (1).

Pysyvä transfektio: DNA:n transfektoiminen viljeltyihin soluihin siten, että se integroituu solujen genomeihin pysyvästi, jolloin transfektoitujen geenien ilmeneminen on pysyvää. Pysyvästi transfektoitujen solujen klooneja valitaan stabiileilla merkkiaineilla (esimerkiksi resistenssi G418:lle).

STTA-testi: Stably Transfected Transactivation Assay (transaktivaatiotesti, jossa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja); ERα:n transkiptionaalinen aktivaatiotesti, jossa käytetään HeLa 9903 -solulinjaa.

Tutkimus: Kokonaisvaltainen kokeellinen työ, joka on tehty tietyn yksittäisen aineen arvioimiseksi tietyllä testillä. Tutkimus sisältää kaikki asianmukaiset vaiheet (testiaineen laimentaminen kasvatusaineessa, testiajot alustavaa annoksenmääritystä varten, kaikki tarvittavat laajat testiajot, aineiston analyysit, laadunvarmistus, sytotoksisuuden arvioinnit jne.). Tutkimuksen valmistuttua voidaan luokitella testikemikaalin vaikutus tutkittavana olevaan toksisuuteen nähden (ts. aktiivinen, inaktiivinen vai epäselvä), ja sitä arvioidaan käytetyllä testillä. Lisäksi laaditaan arvio voimakkuudesta positiiviseen vertailukemikaaliin nähden.

Aine: REACH-asetuksessa ([1]) aineella tarkoitetaan alkuainetta ja sen yhdisteitä sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai millä tahansa valmistusmenetelmällä tuotettuina, mukaan luettuna aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja valmistusprosessista johtuvat epäpuhtaudet, mutta lukuun ottamatta liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta. YK:n GHS-järjestelmässä (1) käytetään hyvin samankaltaista menetelmää.

TA (transaktivaatio): Lähetti-RNA:n (mRNA:n) synteesin käynnistyminen reaktiona tiettyyn kemialliseen signaaliin, esimerkiksi estrogeenin sitoutuminen estrogeenireseptoriin

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta (EUVL L 304, 22.11.2007, s. 1).

▼**M8**

Testi: Tämän testimenetelmän yhteydessä testi on yksi validiksi hyväksytyistä menetelmistä, joka täyttää määrätyt suoritusvaatimukset. Testin osia ovat esimerkiksi tietty solulinja ja siihen liittyvät kasvuolosuhteet, tietty kasvatusaine, jossa testi tehdään, maljausolosuhteet, testikemikaalien järjestely ja laimennokset sekä muut vaaditut laadunvalvontatoimet ja asiaankuuluvat aineiston arviointivaiheet.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Transkriptio: Lähetti-RNA:n (mRNA) synteesi.

UVCB-aine: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali

Validoitu testimenetelmä: Testi, josta on tehty validointitutkimukset testin merkityksellisyyden (ja tarkkuuden) ja luotettavuuden määrittämiseksi tiettyyn tarkoitukseen. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (1).

Validointi: Prosessi, jossa tietyn lähestymistavan, menetelmän, testin, prosessin tai arvioinnin luotettavuus ja merkityksellisyys vahvistetaan määrättyyn tarkoitukseen (1).

KK (kantaja-ainekontrolli): Liuotin, jota käytetään testi- ja kontrollikemikaalien liuottamiseen, testataan pelkästään kantaja-aineena ilman liuotettua kemikaalia.

VM7: Immortalisoitu adenokarsinoomasolu, joka ilmentää estrogeenireseptoria endogeenisesti.

VM7Luc4E2: VM7Luc4E2-solulinja on peräisin ihmiseltä saaduista immortalisoiduista VM7-adenokarsinoomasoluista, jotka ilmentävät endogeenisesti estrogeenireseptorin kumpaakin muotoa (ERα ja ERβ) ja jotka on transfektoitu pysyvästi pGudLuc7.ERE-plasmidilla. Tämä plasmidi sisältää neljä kopiota synteettisestä oligonukleotidistä, joka sisältää estrogeeniherkän elementin hiiren rintasyöpäviruksen (MMTV:n) promoottoria ja tulikärpäsen lusiferaasigeeniä edeltävässä sekvenssikohdassa.

Heikko positiivinen kontrolli: Vertailukemikaalien luettelosta valittu heikosti vaikuttava aine, joka sisältyy kaikkiin testeihin, jotta varmistetaan, että testi toimii asianmukaisesti.

▼**M8**

Lisäys 2

ESTROGEENI-A:N TRANSAKTIVAATIOTESTI, JOSSA KÄYTETÄÄN PYSYVÄSTI TRANSFEKTOITUJA SOLUJA, KEMIKAALIEN ESTROGEENIRESEPTORIIN KOHDISTUVAN AGONISTISEN JA ANTAGONISTISEN VAIKUTUKSEN HAVAITSEMISEKSI HERA-HELA-9903-SOLULINJAA KÄYTTÄEN

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. Tässä transaktivaatiotestissä käytetään hERα-HeLa-9903-solulinjaa havaitsemaan ihmisen estrogeenireseptori alfan (hERα) välittämä estrogeenin kaltainen (agonistinen) vaikutus. Pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan transaktivaatiotestin validointitutkimuksen teki japanilainen kemikaalien arviointi- ja tutkimuslaitos (CERI). Ihmisen estrogeenireseptori alfan (hERα) kautta välittyvän estrogeeni-agonistisen ja -antagonistisen vaikutuksen havaitsemiseksi tutkimuksessa käytettiin hERα-HeLa-9903-solulinjaa, ja validointitutkimuksessa osoitettiin, että testi on merkityksellinen ja luotettava aiotussa käyttötarkoituksessa (1).

2. Tämä testi on kehitetty nimenomaan hERα-välitteisen transaktivaation havaitsemiseen; päätetapahtumana mitataan kemiluminesenssia. Yli 1 μM:n suuruisista fytoestrogeenipitoisuuksista on kuitenkin ilmoitettu muun kuin reseptorin välittämiä luminesenssisignaaleja, jotka johtuvat lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta (2) (3). Vaikka annos-vastekäyrä osoittaa, että estrogeenireseptorijärjestelmän varsinainen aktivoituminen tapahtuu pienemmillä pitoisuuksilla, fytoestrogeenien tai samankaltaisten yhdisteiden, joiden epäillään tuottavan fytoestrogeenien kaltaista lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumista, aiheuttamaa lusiferaasin ilmentymistä on tutkittava huolellisesti ER TA -testijärjestelmissä, joissa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja (lisäys 1).

3. Kohdat ”YLEISJOHDANTO” JA ”ER TA -TESTIN OSAT” on luettava, ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testiohjeessa käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 2.1.

TESTIN PERIAATE (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

4. Testiä käytetään signaloimaan ligandin sitoutumista estrogeenireseptoriin. Ligandin sitoutumisen jälkeen reseptori-ligandikompleksi kulkeutuu tumaan, jossa se sitoutuu tiettyihin DNA:n responssielementteihin ja transaktivoi tulikärpäsen lusiferaasigeenin, jolloin lusiferaasientsyymin solunsisäinen ilmentyminen lisääntyy. Lusiferiini on substraatti, jonka lusiferaasientsyymi muuttaa bioluminesenssituotteeksi, jota voidaan mitata kvantitatiivisesti luminometrillä. Lusiferaasin aktiviteettia voidaan arvioida nopeasti ja edullisesti monilla kaupallisesti saatavilla olevilla testisarjoilla.

5. Testijärjestelmässä käytetään ihmisen kohdunkaulakasvaimesta peräisin olevaa hERα-HeLa-9903-solulinjaa, jossa on kaksi pysyvästi insertoitua konstruktia: i) hERαα:aa ilmentävä konstrukti (joka koodaa täysipituista ihmisen reseptoria) ii) ja tulikärpäsen lusiferaasireportterikonstrukti, jossa on viisi peräkkäin toistuvaa vitellogeniinin estrogeeniherkkää elementtiä. Ne toimivat hiiren metallotioneiinipromoottorin TATA-sekvenssin avulla. Hiiren metallotioneiinin TATA-geenikonstruktin on osoitettu olevan suorituskyvyltään paras, ja siksi sitä käytetään yleisesti. Siksi tällä hERα-HeLa-9903-solulinjalla voidaan mitata testikemikaalin kykyä aiheuttaa hERα:n kautta välittyvää lusiferaasigeenin ilmentymisen transaktivaatiota.

▼M8

6. Estrogeenireseptorin agonisti -testissä aineiston tulkinta perustuu siihen, onko testikemikaalin aiheuttama suurin vaste yhtä suuri vai suurempi kuin agonistivaste, joka vastaa 10:tä prosenttia positiivisen kontrollin (17β-estradioli (E2)) aiheuttamasta suurimmasta vasteesta (1 nM) (ts. PC10). Estrogeenireseptorin antagonisti -testissä aineiston tulkinta perustuu puolestaan siihen, onko vaste vähintään 30 prosenttia pienempi kuin lisäyskontrollinäytteen (25 pM E:2:ta) aiheuttama vaste ilman sytotoksisuutta. Aineiston analyysia ja tulkintaa käsitellään tarkemmin 34–48 kohdassa.

MENETTELY

Solulinjat

7. Testissä on käytettävä hERα-HeLa-9903-solulinjaa, jossa on pysyvästi transfektoituja soluja. Solulinjan voi hankkia japanilaisesta tutkimusbioresurssien kokoelman solupankista (Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank ([1])), jolloin pitää tehdä materiaalinsiirtosopimus (material transfer agreement, MTA).

8. Testauksessa tulee käyttää vain mykoplasmattomiksi luonnehdittuja soluja. Suositeltava menetelmä on RT-PCR (reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio), koska sillä mykoplasmainfektio havaitaan herkästi (4) (5) (6).

Solulinjan stabiilisuus

9. Jotta voidaan seurata, että solulinja pysyy stabiilina, agonistitestissä on käytettävä vertailuaineina E2:ta, 17α-estradiolia, 17α-metyylitestosteronia ja kortikosteronia. Myös taulukossa 1 esitetyn testipitoisuuden vaihteluvälin koko pitoisuus-vastekäyrä on mitattava vähintään kerran jokaisen testin aikana, ja tulosten on oltava taulukossa 1 esitettyjen tulosten mukaisia.

10. Antagonistitestissä on mitattava kahden vertailuaineen, tamoksifeenin ja flutamidin, koko pitoisuuskäyrät samaan aikaan kunkin testiajon kanssa. On seurattava, että nämä kaksi kemikaalia luokitellaan laadullisesti oikein positiiviseksi tai negatiiviseksi.

Soluviljelmä ja maljausolot

11. Solut on pidettävä Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) -kasvatusliuoksessa (ilman fenolipunaista), jota on täydennettävä kanamysiiniantibiootilla (60 mg/l) ja 10-prosenttisella dekstraanilla pinnoitetulla hiilikäsitellyllä naudan sikiön verestä valmistetulla seerumilla, (DCC-FBS) hiilidioksidi-inkubaattorissa (hiilidioksidipitoisuus 5 %) 37±1 °C:n lämpötilassa. Kun konfluenssi on 75–90 prosenttia, soluista voidaan tehdä 10 ml:n jatkoviljelmä (0,4 x 105 – 1 x 105 solua/ml /100 mm:n soluviljelymalja). Solut on suspendoitava 10-prosenttisella FBS-EMEM-liuoksella (joka on sama kuin EMEM, johon on lisätty DCC-FBS:ää) ja laitettava sen jälkeen mikrolevyn kuoppiin tiheydellä 1 x 104 solua/(100 µl x kuoppa). Sen jälkeen solujen on annettava esi-inkuboitua 5 prosentin hiilidioksidi-inkubaattorissa 37±1 °C:n lämpötilassa kolmen tunnin ajan ennen kemikaalille altistamista. Muoviesineiden on oltava estrogeenittomia.

12. Jotta vasteen integriteetti säilyy, soluja on kasvatettava useampi kuin yksi siirrostus pakastetusta varastosta käsitellyssä kasvatusliuoksessa, mutta yli 40:ää siirrostusta ei tule kuitenkaan kasvattaa. Tämä kestää hERα-HeLa-9903-solulinjaa käytettäessä alle kolme kuukautta. Solujen toimintakyky voi kuitenkin heiketä, jos niitä kasvatetaan epäasianmukaisissa viljelyoloissa.

([1]) JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan Faksi: +81 72 641 9812

▼M8

13. DCC-FBS-liuos voidaan valmistaa lisäyksessä 2.2 kuvatun mukaisesti tai hankkia kaupallisista lähteistä.

Hyväksymisperusteet

Estrogeenireseptorin agonistitestin positiiviset ja negatiiviset vertailustandardit

14. Ennen tutkimusta ja sen aikana testijärjestelmän responsiivisuus on todennettava käyttämällä asianmukaisia pitoisuuksia voimakasta estrogeenia: (E2), heikkoa estrogeenia (17α-estradioli), erittäin heikkoa agonistia (17α-metyylitestosteroni) ja negatiivista ainetta (kortikosteronia). Validointitutkimuksesta (1) johdetut hyväksyttävyysalueen arvot on esitetty taulukossa 1. Nämä neljä samanaikaista vertailustandardia on sisällytettävä jokaiseen kokeeseen, ja tulosten on oltava annettujen hyväksymisrajojen mukaiset. Jos näin ei ole, on selvitettävä, miksi hyväksymisperusteet eivät täyttyneet (esimerkiksi solujen käsittelyn tai seerumin ja antibiootin laadun ja pitoisuuden vuoksi), ja testion toistettava. Kun kaikki hyväksymisperusteet ovat täyttyneet, on erittäin tärkeää, että materiaalien käyttö on soluviljelyssä johdonmukaista. Näin varmistetaan, että EC_{50}-, PC_{50}-ja PC_{10}-arvojen vaihtelu olisi mahdollisimman vähäistä. Testin herkkyys voidaan varmistaa neljällä samanaikaisella vertailustandardilla, jotka tulee sisällyttää jokaiseen kokeeseen (jotka tehdään samoissa oloissa, samoilla materiaaleilla, samoilla siirrostuksilla ja joiden tekijät ovat samat laboratorioteknikot), koska kolmen positiivisen vertailustandardin PC_{10}-arvojen on oltava hyväksyttävyysalueella, kuten myös PC_{50}-arvojen ja EC_{50}-arvojen, mikäli ne voidaan laskea (ks. taulukko 1).

Taulukko 1

Estrogeenireseptorin agonistitestin neljän vertailustandardin hyväksyttävyysalueen arvot

Nimi	$logPC_{50}$	$logPC_{10}$	$logEC_{50}$	Hillslope	Testipitoisuus
17ß-estradioli CAS-numero: 50-28-2	-11,4~-10,1	<-11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10^{-14}~10^{-8}M
17α-estradioli CAS-numero: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10^{-12}~10^{-6}M
Kortikosteroni CAS-numero: 50-22-6	—	—	—	—	10^{-10}~10^{-4}M
17α-metyylitestosteroni CAS-numero: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10^{-11}~10^{-5}M

Estrogeenireseptorin antagonistitestin positiiviset ja negatiiviset vertailustandardit

15. Ennen tutkimusta ja sen aikana testijärjestelmän responsiivisuus on todennettava käyttämällä asianmukaisia pitoisuuksia positiivisesta aineesta (tamoksifeeni) ja negatiivisesta aineesta (flutamidi). Validointitutkimuksesta (1) johdetut hyväksyttävyysalueen arvot on esitetty taulukossa 2. Nämä kaksi samanaikaista vertailustandardia on sisällytettävä jokaiseen kokeeseen, ja tulosten on oltava perusteissa osoitetun mukaisia. Jos näin ei ole, on selvitettävä, miksi perusteet eivät täyttyneet (esimerkiksi solujen käsittelyn tai seerumin ja antibiootin laadun ja pitoisuuden vuoksi), ja testi on toistettava. Lisäksi on laskettava positiivisen aineen (tamoksifeenin) IC_{50} -arvot, ja tulosten on oltava määrättyjen hyväksymisrajojen mukaiset. Kun kaikki hyväksymisperusteet ovat täyttyneet, on erittäin tärkeää, että materiaalien käyttö on soluviljelyssä johdonmukaista. Näin varmistetaan, että IC50-arvojen vaihtelu olisi mahdollisimman vähäistä. Kahdella samanaikaisella vertailustandardilla, jotka on sisällytettävä jokaiseen kokeeseen (jotka tehdään samoissa oloissa, samoilla materiaaleilla, samoilla siirrostuksilla ja joiden tekijät ovat samat laboratorioteknikot), voidaan varmistaa testin herkkyys (ks. taulukko 2).

▼M8

Taulukko 2

Estrogeenin antagonistitestin kahden vertailustandardin perusteet ja hyväksyttävyysalue

Nimi	Perusteet	$LogIC_{50}$	Testipitoisuus
Tamoksifeeni CAS-numero: 10540-29-1	Positiivinen: IC50 on laskettava	-5,942-7,596	10-1010-5M
Flutamidi CAS-numero: 13311-84-7	Negatiivinen: IC30-arvoa ei tarvitse laskea	—	10-10 10-5M

Positiiviset ja kantaja-ainekontrollit

16. Estrogeenireseptorin agonistitutkimuksessa (1 nM E2:ta) ja antagonistitutkimuksessa (10μM tamoksifeenia) positiivinen kontrolli on testattava vähintään kolmella näytteellä jokaisesta levystä. Kantaja-aine, jota on käytetty testikemikaalin liuottamiseen, on testattava kantaja-ainekontrollina vähintään kolmella näytteellä jokaisesta levystä. Jos positiivisessa kontrollissa käytetään toista kantaja-ainetta kuin testikemikaalia, tämän kantaja-ainekontrollin lisäksi on testattava toinen kantaja-ainekontrolli vähintään kolmella näytteellä samalta levyltä kuin positiivinen kontrolli.

Estrogeenireseptorin agonistitestin laatuvaatimukset

17. Positiivisen kontrollin (1 nM E2:ta) keskimääräisen lusiferaasiaktiivisuuden on oltava vähintään nelinkertainen kantaja-ainekontrolliin nähden jokaisella levyllä. Tämä vaatimus määritetään validointitutkimuksen päätetapahtuma-arvojen luotettavuuden perusteella (aiemmat arvot 4–30-kertaisia).

18. Testin laatukontrollin osalta samanaikaisen positiivisen kontrollin (1 nM E2:ta) PC10-arvoa vastaavan induktiokertoimen on oltava suurempi kuin 1+2 SD samanaikaisen kantaja-ainekontrollin induktiokertoimesta (= 1). Priorisointitarkoituksiin PC10-arvoa voidaan käyttää vaadittavan aineistoanalyysin yksinkertaistamiseksi tilastoanalyysiin verrattuna. Vaikka tilastoanalyysista saadaan tietoa merkityksellisyydestä, sellainen analyysi ei kuitenkaan ole kvantitatiivinen parametri pitoisuuteen perustuvan potentiaalin osalta, joten se ei ole kovin käyttökelpoinen priorisointitarkoitusten kannalta.

Estrogeenin antagonistitestin laatuvaatimukset

19. Lisäyskontrollin (25 pM E2:ta) keskimääräisen lusiferaasiaktiivisuuden on oltava vähintään nelinkertainen kantaja-ainekontrolliin nähden jokaisella levyllä. Tämä vaatimus määritetään validointitutkimuksen päätetapahtuma-arvojen luotettavuuden perusteella.

20. Testin laatukontrollin osalta suhteellinen transkriptionaalinen aktivaatio (RTA) 1 nM:n määrällä E2:ta on oltava suurempi kuin 100 prosenttia, 1 μM:llä 4-hydroksitamoksifeenia (OHT) sen tulee olla vähemmän kuin 40,6 prosenttia, ja 100 μM:llä digitoniinia (dig) sen on oltava vähemmän kuin 0 prosenttia.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen (ks. 14 kohta sekä taulukot 3 ja 4 tämän testimenetelmän kohdassa ER TA -testin osat).

Kantaja-aine

21. Samanaikaisena kantaja-ainekontrollina on käytettävä dimetyylisulfoksidia (DMSO:ta) tai asianmukaista liuotinta samana pitoisuutena kuin eri positiivisia ja negatiivisia kontrolleja ja testikemikaaleja. Testikemikaalit on liuotettava liuottimeen, joka liuottaa kyseisen kemikaalin ja jonka voi sekoittaa soluviljelyaineeseen. Sopivia kantaja-aineita ovat vesi, etanoli (puhtaus 95–100 prosenttia) ja DMSO. Jos käytetään DMSO:ta, sen pitoisuus saa olla enintään 0,1 tilavuusprosenttia (v/v). Kaikkien kantaja-aineiden osalta on osoitettava, ettei käytetty enimmäistilavuus ole sytotoksinen ja ettei se vaikuta testin suorittamiseen.

▼M8

Testikemikaalien valmistelu

22. Testikemikaalit on yleensä liuotettava DMSO:hon tai muuhun sopivaan liuottimeen. Ne on sarjalaimennettava samalla liuottimella yleisessä suhteessa 1:10, jotta saadaan kasvatusliuoksella laimennettavia liuoksia.

Liukoisuus ja sytotoksisuus: annoksenmääritystä koskevat näkökohdat

23. On tehtävä esitesti, jotta voidaan määrittää testattavan kemikaalin asianmukainen pitoisuusalue ja selvittää, liittyykö testikemikaaliin mahdollisesti liukoisuuteen ja sytotoksisuuteen liittyviä ongelmia. Aluksi kemikaalit testataan enimmäispitoisuudella 1 µl/ml, 1 mg/ml tai 1 mM sen mukaan, mikä niistä on pienin. Esitestissä havaitun sytotoksisuuden määrän tai liukoisuuden puutteen perusteella ensimmäisessä varsinaisessa testiajossa on testattava kemikaalia logaritmisina sarjalaimennoksina alkaen hyväksyttävästä enimmäispitoisuudesta (esimerkiksi 1 mM, 100µM, 10µM jne.), ja sameus tai saostuminen tai sytotoksisuus on merkittävä muistiin. Toisessa ja tarvittaessa kolmannessa ajossa pitoisuuksia on muutettava, mikäli tarpeen, jotta voidaan luonnehtia pitoisuus-vastekäyrää paremmin ja jotta vältetään sellaiset pitoisuudet, joiden todetaan olevan liukenemattomia tai aiheuttavan liiallista sytotoksisuutta.

24. Estrogeenireseptorin agonistien ja antagonistien yhteydessä kasvava sytotoksisuus voi muuttaa merkittävästi logistista vastetta tai eliminoida sen, mikä on otettava huomioon aineiston analysoinnissa. Sellaisia sytotoksisuuden testausmenetelmiä, joista voidaan saada tietoa solujen 80-prosenttisesta elinkyvystä, on käytettävä, ja niissä on hyödynnettävä asianmukaista laboratorion kokemukseen perustuvaa testiä.

25. Jos sytotoksisuustestin tulokset osoittavat, että testikemikaalin pitoisuus on vähentänyt solujen määrää 20 prosentilla tai enemmän, tämä pitoisuus on katsottava sytotoksiseksi, ja kaikki sytotoksisen pitoisuuden kanssa yhtä suuret tai suuremmat pitoisuudet on suljettava pois arvioinnista.

Kemiallinen altistus ja testilevyn järjestäminen

26. Kemikaalien laimennukset (vaiheet 1 ja 2) ja solujen altistaminen (vaihe 3) voidaan tehdä näin:

Vaihe 1: Jokainen kemikaali on laimennettava sarjassa DMSO:ssa tai asianmukaisessa liuottimessa. Sen jälkeen kemikaalit on laitettava mikrotiitterilevyille, jotta saadaan lopulliset sarjapitoisuudet alustavassa annoksenmääritystestissä määritetyn mukaisesti (sarjat ovat yleensä 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM ja 10 pM (10^{-3}-10^{-11} M)) kolminkertaiseen testaukseen.

Vaihe 2: Kemikaalin laimennus: Laimenna ensin 1,5 µl testikemikaalia liuottimessa 500 µl:ksi kasvatusliuosta.

Vaihe 3: Solujen altistus kemikaalille: Lisää 50 µl nestelaimennosta (valmistettu vaiheessa 2) testilevyn kuoppaan, joka sisältää 10^4 solua / 100 µl / kuoppa

Nesteen suositeltava lopullinen määrä jokaisessa kuopassa on 150 µl. Testinäytteet ja vertailustandardit voidaan sijoittaa taulukossa 3 ja taulukossa 4 näytetyn mukaisesti.

▼**M8**

Taulukko 3

Esimerkki levyllä olevan vertailustandardien pitoisuuden sijoittamisesta estrogeenireseptorin agonistitestin testilevyllä

Rivi	17α-metyylitestosteroni			Kortikosteroni			17α-estradioli			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pit. 1 (10 μM)	→	→	100 μM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	pit. 2 (1 μM)	→	→	10 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	pit. 3 (100 nM)	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	pit. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	pit. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	pit. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	pit. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	KK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

KK: Kantaja-ainekontrolli (0,1-prosenttinen DMSO); PK: positiivinen kontrolli (1 nM E2).

27. Vertailustandardit (E2, 17α-estradioli, 17 α- metyylitestosteroni ja kortikosteroni on testattava jokaisessa kokeessa (taulukko 3). Jokaiseen testilevyyn on sisällytettävä positiivisen kontrollin kuopat, joissa on 1 nM E2:sta ja jotka voivat tuottaa E2- ja kantaja-ainekontrollin kuopista suurimman induktion vain DMSO:lla (tai asianmukaisella liuottimella) käsiteltynä (taulukko 4). Jos samassa kokeessa käytetään eri lähteistä peräisin olevia soluja (esimerkiksi eri siirrostusnumero, eri erä jne.), vertailustandardit on testattava jokaisen solulähteen osalta.

Taulukko 4

Esimerkki levyllä olevan testi- ja kontrollikemikaalien pitoisuuden sijoittamisesta estrogeenireseptorin agonistitestin testilevyllä

Rivi	Testikemikaali 1			Testikemikaali 2			Testikemikaali 3			Testikemikaali 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pit. 1 (10 μM)	→	→	1 mM	→	→	1 μM	→	→	10 nM	→	→
B	pit. 2 (1 μM)	→	→	100 μM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	pit. 3 (100 nM)	→	→	10 μM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→

▼**M8**

Rivi	Testikemikaali 1			Testikemikaali 2			Testikemikaali 3			Testikemikaali 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	pit. 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	pit. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	pit. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	pit. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	KK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

KK: Kantaja-ainekontrolli (0,1-prosenttinen DMSO); PK: positiivinen kontrolli (1 nM E2).

Taulukko 5

Esimerkki levyllä olevan vertailustandardien pitoisuuden sijoittamisesta estrogeenireseptorin antagonistitestin testilevyllä

Rivi	Tamoksifeeni			Flutamidi			Testikemikaali 1			Testikemikaali 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pit. 1 (10 µM)	↓	↓	10 µM	↓	↓	10 µM	↓	↓	10 µM	↓	↓
B	pit. 2 (1 µM)	↓	↓	1 µM	↓	↓	1 µM	↓	↓	1 µM	↓	↓
C	pit. 3 (100 nM)	↓	↓	100 nM	↓	↓	100 nM	↓	↓	100 nM	↓	↓
D	pit. 4 (10 nM)	↓	↓	10 nM	↓	↓	10 nM	↓	↓	10 nM	↓	↓
E	pit. 5 (1 nM)	↓	↓	1 nM	↓	↓	1 nM	↓	↓	1 nM	↓	↓
F	pit. 6 (100 pM)	↓	↓	100 pM	↓	↓	100 pM	↓	↓	100 pM	↓	↓
G	0,1 % DMSO	↓	↓	↓	↓	↓	1 µM OHT	↓	↓	100 µM dig	↓	↓
H	KK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

KK: Kantaja-ainekontrolli (0,1-prosenttinen DMSO), PK: positiivinen kontrolli (1 nM E2), OHT :4-hydroksitamoksifeeni, dig: digitoniini.

= lisätty E2:ta 25pM.

28. Jotta voidaan arvioida kemikaalien antagonistista vaikutusta, riveillä A–G oleviin kuoppiin on lisättävä 25 pM E2:ta. Vertailustandardit (tamoksifeeni ja flutamidi) on testattava jokaisessa ajossa. Jokaiseen testin levyyn on sisällytettävä positiivisen kontrollin kuoppia, joissa on 1 nM E2:ta, jota voidaan käyttää hERα-HeLa-9903-solulinjan kontrollina), kantaja-ainekuoppia, joissa on DMSO:ta (tai asianmukaista liuotinta), 0,1-prosenttista DMSO:ta sisältäviä kuoppia, jotka on käsitelty lisäämällä DMSO:ta lisäyskontrollia vastaavaan täydennettyyn E2:een, lopullisella pitoisuudella eli 1 µM:llä OHT:ta käsiteltyjä kuoppia sekä 100 µM:lla digitoniinia käsiteltyjä kuoppia (taulukko 5). Seuraavan testilevyn on oltava järjestykseltään sama ilman vertailustandardikuoppia (taulukko 6). Jos samassa kokeessa käytetään eri lähteistä peräisin olevia soluja (esimerkiksi eri siirrostusnumero, eri erä jne.), vertailustandardit on testattava jokaisen solulähteen osalta.

▼M8

Taulukko 6

Esimerkki levyllä olevan testi- ja kontrollikemikaalien pitoisuuden sijoittamisesta estrogeenireseptorin antagonistitestin testilevyllä

Rivi	Testikemikaali 1			Testikemikaali 2			Testikemikaali 3			Testikemikaali 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pit. 1 (10 µM)	″	″	10 µM	″	″	10 µM	″	″	10 µM	″	″
B	pit. 2 (1 µM)	″	″	1 µM	″	″	1 µM	″	″	1 µM	″	″
C	pit. 3 (100 nM)	″	″	100 nM	″	″	100 nM	″	″	100 nM	″	″
D	pit. 4 (10 nM)	″	″	10 nM	″	″	10 nM	″	″	10 nM	″	″
E	pit. 5 (1 nM)	″	″	1 nM	″	″	1 nM	″	″	1 nM	″	″
F	pit. 6 (100 pM)	″	″	100 pM	″	″	100 pM	″	″	100 pM	″	″
G	0,1 % DMSO	″	″	″	″	″	1 µM OHT	″	″	100 µM dig	″	″
H	KK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

KK: Kantaja-ainekontrolli (0,1-prosenttinen DMSO), PK: positiivinen kontrolli (1 nM E2), OHT: 4-hydroksitamoksifeeni, dig: digitoniini.

: lisätty E2:ta 25 pM.

29. Reunavaikutusten puuttuminen on vahvistettava tarvittaessa, ja jos niitä on aihetta epäillä, levyn järjestystä on muutettava tällaisten vaikutusten välttämiseksi. Esimerkiksi voidaan käyttää sellaista levyn järjestystä, jossa reunakuoppia ei käytetä.

30. Kemikaalien lisäämisen jälkeen testilevyjä on inkuboitava 5-prosenttisessa CO2-inkubaattorissa 37±1 °C:ssa 20–24 tunnin ajan reportterigeenituotteiden indusoimiseksi.

31. Erittäin haihtuvien yhdisteiden kanssa on noudatettava erityistä varovaisuutta. Näissä tapauksissa lähellä olevat kontrollikuopat voivat tuottaa vääriä positiivisia, ja niitä on arvioitava odotuksenmukaisten ja aikaisempien kontrolliarvojen perusteella. Niissä harvoissa tapauksissa, joissa haihtuvuudesta voi olla huolta, sulkijakalvojen käyttö voi auttaa eristämään yksittäiset kuopat tehokkaasti testauksen aikana, joten niiden käyttö on näissä tapauksissa suositeltavaa.

32. Lopullisten testien toistot samasta kemikaalista on tehtävä eri päivinä, jotta varmistetaan testien riippumattomuus.

Lusiferaasitesti

33. Testissä voidaan käyttää kaupallista lusiferaasitestireagenssia [esimerkiksi Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 tai vastaava] tai tavanomaista lusiferaasitestijärjestelmää (esimerkiksi Promega, E1500 tai vastaava), kunhan hyväksymisperusteet täyttyvät. Testin reagenssit on valittava käytettävän luminometrin herkkyyden perusteella. Tavanomaisen lusiferaasitestijärjestelmän yhteydessä on käytettävä soluviljelmän lyysireagenssia (esimerkiksi Promega, E1531 tai vastaava) ennen substraatin lisäämistä. Lusiferaasireagenssi on lisättävä valmistajan ohjeiden mukaisesti.

AINEISTON ANALYSOINTI

Estrogeenireseptorin agonistitesti

34. Jotta estrogeenireseptorin agonistitestin yhteydessä saadaan suhteellisen transkriptionaalisen aktiivisuuden arvo positiivisesta kontrollista (1 nM E2:ta), saman levyn luminesenssisignaalit voidaan analysoida seuraavien vaiheiden mukaisesti (myös muut vastaavat matemaattiset prosessit ovat hyväksyttäviä):

Vaihe 1. Laske kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

▼M8

Vaihe 2. Vähennä kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3. Laske normalisoidun positiivisen kontrollin keskiarvo.

Vaihe 4. Jaa levyn jokaisen kuopan normalisoitu arvo normalisoidun positiivisen kontrollin keskiarvolla (PK=100 %).

Jokaisen kuopan lopullinen arvo on kyseisen kuopan suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus verrattuna positiivisen kontrollin vasteeseen.

Vaihe 5. Laske suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus testikemikaalin jokaisesta pitoisuusryhmästä. Vasteeseen liittyy kaksi ulottuvuutta: keskimääräinen transkriptionaalinen aktiivisuus (vaste) ja pitoisuus, jossa vaste ilmaantuu (ks. seuraava kohta).

EC_{50}-, PC_{50}- ja PC_{10}-arvojen indusoitumiseen liittyvät näkökohdat

35. EC50-arvon laskemiseen tarvitaan täydellinen pitoisuus-vastekäyrä, mutta se ei ole aina mahdollista tai käytännöllistä testipitoisuuden vaihteluvälin rajoitusten vuoksi (esimerkiksi sytotoksisuuden tai liukoisuusongelmien vuoksi). Koska EC50 ja suurin induktio (vastaa Hillin yhtälön ylintä lukua) ovat informatiivisia parametreja, ne on mahdollisuuksien mukaan ilmoitettava. EC50:n ja suurimman induktion laskemisessa on käytettävä asianmukaisia tilasto-ohjelmia (esimerkiksi Graphpad Prism -tilasto-ohjelmaa). Jos Hillin logistinen yhtälö on sovellettavissa pitoisuus-vastetietoihin, EC50 on laskettava tällä yhtälöllä (7):

Y=Bottom + (Top-Bottom) / (1+10 exp ((log EC50 -X) x Hill slope)), jossa:

X on pitoisuuden logaritmi ja

Y on vaste, ja Y alkaa pienimmästä vasteesta (bottom) ja kulkee suurimpaan vasteeseen (top) logistisella käyrällä. Hillin logistisessa yhtälössä pienimmäksi vasteeksi on määritetty nolla.

36. Jokaisesta testikemikaalista on esitettävä nämä tiedot:

RPCMax, joka on suurin testikemikaalin indusoima vaste, ja se ilmaistaan prosenttiosuutena E2:n (1 nM) indusoimasta vasteesta samalla levyllä, sekä PC_{Max} (RPCMax-arvoon liittyvä pitoisuus); ja

positiivisten kemikaalien osalta pitoisuudet, jotka indusoivat PC10-arvon ja tarvittaessa PC50-arvon.

37. PCx-arvo voidaan laskea interpoloimalla kahden pisteen välillä X-Y-koordinaatilla; toinen piste on heti PCx-arvon yläpuolella ja toinen heti sen alapuolella. Kun PCx-arvon ylä- ja alapuolella olevien datapisteiden arvoina ovat koordinaatit (a, b) ja (c, d), PCx-arvo voidaan laskea tällä yhtälöllä:

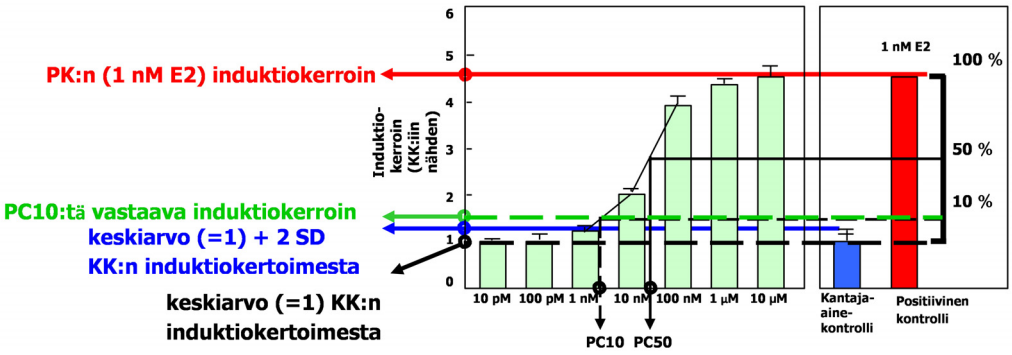
log[PCx] = log[c]+(x-d)/(d-b)

▼M8

38. PC-arvojen kuvaukset ovat seuraavassa kuvassa 1.

Kuva 1

Esimerkki PC-arvojen johtamisesta. PK (1 nM E2:ta) sisältyy jokaiselle testilevylle



Estrogeenin antagonistitesti

39. Jotta estrogeenin antagonistitestin yhteydessä saadaan suhteellisen transkriptionaalisen aktiivisuuden arvo (RTA) lisäyskontrollista (25 pM E2:ta), saman levyn luminesenssisignaalit voidaan analysoida seuraavien vaiheiden mukaisesti (myös muut vastaavat matemaattiset prosessit ovat hyväksyttäviä):

Vaihe 1. Laske kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2. Vähennä kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi. Vaihe 3. Laske normalisoidun lisäyskontrollin keskiarvo.

Vaihe 4. Jaa levyn jokaisen kuopan normalisoitu arvo normalisoidun lisäyskontrollin keskiarvolla (lisäyskontrolli=100 %).

Jokaisen kuopan lopullinen arvo on kyseisen kuopan suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus verrattuna lisäyskontrollin vasteeseen.

Vaihe 5. Laske suhteellisen transkriptionaalisen aktiivisuuden keskiarvo jokaisesta käsittelystä.

IC_{30}- ja IC_{50}-arvojen indusoitumista koskevat näkökohdat

40. Positiivisten kemikaalien osalta on ilmoitettava pitoisuudet, jotka indusoivat IC30-arvon ja tarvittaessa IC50-arvon.

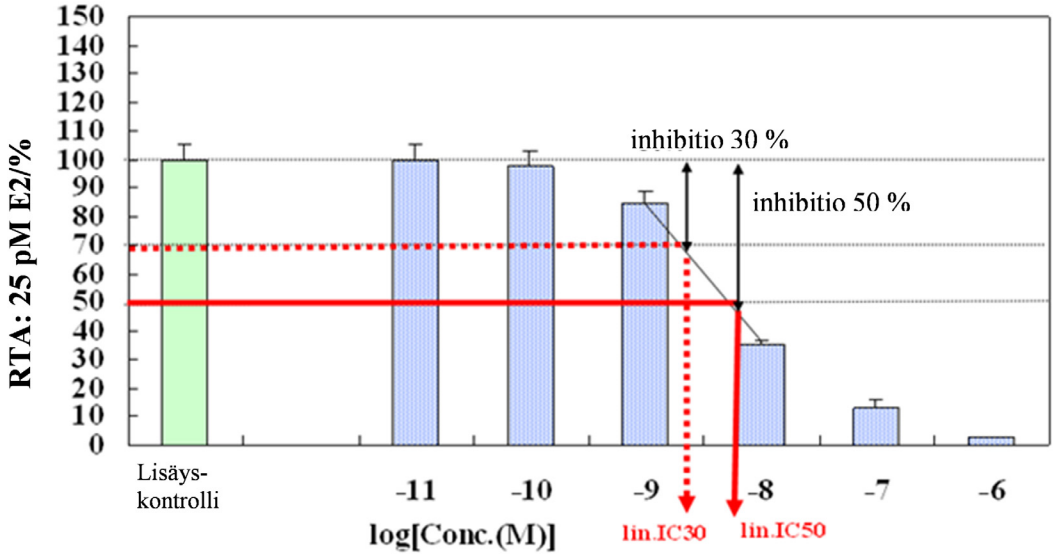
41. ICx-arvo voidaan laskea interpoloimalla kahden pisteen välillä X-Y-koordinaatilla; toinen piste on heti ICx-arvon yläpuolella ja toinen heti sen alapuolella. Kun ICx-arvon ylä- ja alapuolella olevien datapisteiden arvoina ovat koordinaatit (c, d) ja (a, b), ICx-arvo voidaan laskea tällä yhtälöllä:

lin ICx = a-(b-(100-x)) (a-c) /(b-d)

▼M8

Kuva 2

Esimerkki IC-arvojen johtamisesta. Lisäyskontrolli (25 pM E2:ta) sisältyy jokaiselle testilevylle



RTA: Suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus

42. Tulosten tulee perustua kahteen (tai kolmeen) riippumattomaan testiajoon. Jos kahdesta ajosta saadaan vertailukelpoiset ja siten toistettavat tulokset, kolmatta ajoa ei tarvitse tehdä. Jotta tulokset olisivat hyväksyttäviä, niiden on

— täytettävä hyväksymisperusteet (ks. hyväksymisperusteet 14–20 kohdasta)

— oltava toistettavissa.

Aineiston tulkintaperusteet

Taulukko 7

Estrogeenireseptorin agonistitestin positiiviset ja negatiiviset päätöksentekoperusteet

Positiivinen	Jos saatu RPCMax on yhtä suuri kuin tai suurempi kuin 10 prosenttia positiivisen kontrollin vasteesta vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta.
Negatiivinen	Jos saatu RPCMax ei ole vähintään 10 prosenttia positiivisen kontrollin vasteesta vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta.

Taulukko 8

Estrogeenireseptorin antagonistitestin positiiviset ja negatiiviset päätöksentekoperusteet

Positiivinen	Jos vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta voidaan laskea IC30-arvo.
Negatiivinen	Jos vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta ei voida laskea IC30-arvoa.

▼**M8**

43. Aineiston tulkintaperusteet on esitetty taulukoissa 7 ja 8. Positiivisia tuloksia luonnehditaan sekä vaikutuksen suuruusluokalla että sillä pitoisuudella, jolla vaikutus ilmaantuu. Kumpikin näistä tavoitteista täyttyy, kun tulokset ilmoitetaan pitoisuutena, jolla agonistitestissä saadaan 50 prosenttia (PC50) tai 10 prosenttia (PC10) positiivisen kontrollin tuloksista ja jolla antagonistitestissä estyy 50 prosenttia (IC50) tai 30 prosenttia (IC30) lisäyskontrollin arvosta. Testikemikaali määritetään kuitenkin positiiviseksi, jos testikemikaalin indusoima suurin vaste (RPCMax) on yhtä suuri tai suurempi kuin 10 prosenttia positiivisen kontrollin vasteesta vähintään kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta. Negatiiviseksi testikemikaali määritetään silloin, jos RPCMax ei ole vähintään 10:tä prosenttia positiivisen kontrollin vasteesta kahdessa kahdesta tai kolmesta ajosta.

44. Agonistitestissä arvot PC10, PC50 ja PCMax sekä antagonistitestissä arvot IC30 ja IC50 voidaan laskea laskentataulukolla, joka on saatavana testiohjeen yhteydessä OECD:n julkisella verkkosivulla ([1]).

45. Yleensä riittää, että PC10- tai PC50- sekä IC30- tai IC50-arvot lasketaan vähintään kahdesti. Jos aineiston perusjoukossa samalla pitoisuusalueella on kuitenkin vaihtelua siten, että variaatiokerroin (CV; %) on liian suuri, aineisto ei välttämättä ole luotettava, ja suuren vaihtelun syy on selvitettävä. PC10-arvon laskemisessa käytettävien datapisteiden raakatietotriplikaattien (luminesenssin intensiteettitietojen) variaatiokertoimen olisi oltava alle 20 prosenttia.

46. Hyväksymisperusteiden täyttyminen tarkoittaa, että testijärjestelmä toimii asianmukaisesti, mutta se ei takaa, että tietty testiajo tuottaisi tarkkaa tietoa. Ensimmäisen testiajon tulosten toistuvuus on paras osoitus siitä, että testi tuottaa tarkkaa tietoa.

47. Estrogeenireseptorin agonistitestissä, kun tarvitaan tämän testiohjeen mukaisten seulonta- ja priorisointitarkoitusten ohella lisää tietoa positiivisista testikemikaaleista, etenkin PC10–PC49-kemikaaleista ja niistä kemikaaleista, joiden oletetaan ylistimuloivan lusiferaasia, voidaan vahvistaa, että havaittu lusiferaasiaktiivisuus on yksinomaan ERα-spesifi vaste, käyttämällä ERα-antagonistia (ks. lisäys 2.1).

TESTIRAPORTTI

48. Katso ”ER TA -TESTIN OSAT” -luvun 20 kohta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459–1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252–4263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89–94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769–771.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953–959.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97–El02.

▼**M8**

Lisäys 2.1

VÄÄRÄT POSITIIVISET: MUIDEN KUIN RESEPTORIVÄLITTEISTEN LUMINESENSSISIGNAALIEN ARVIOIMINEN

1. Estrogeenireseptorin agonistitestissä väärät positiiviset voivat johtua muusta kuin estrogeenivälitteisestä lusiferaasigeenin aktivoitumisesta tai geenituotteen suorasta aktivoitumisesta tai tähän liittymättömästä fluoresenssista. Tällaiset vaikutukset näkyvät epätäydellisenä tai epätavallisena annos-vastekäyränä. Jos tällaisia vaikutuksia on aihetta epäillä, estrogeenireseptorin antagonistin (esimerkiksi 4-hydroksitamoksifeeni (OHT) myrkyttömänä pitoisuutena) vaikutus vasteeseen on tutkittava. Puhdas antagonisti ICI 182780 ei välttämättä sovi tähän tarkoitukseen, koska riittävä pitoisuus sitä voi pienentää kantaja-ainekontrollin arvoa, mikä puolestaan vaikuttaa aineiston analyysiin.

2. Jotta varmistetaan tämän lähestymistavan validiteetti, samalla levyllä on testattava seuraavat seikat:

   — tuntemattoman kemikaalin agonistinen vaikutus 10 μM:lla tamoksifeenia ja ilman sitä

   — KK (kolmena näytteenä)

   — tamoksifeeni (kolmena näytteenä)

   — 1 nM E2:ta (kolmena näytteenä) agonistin positiivisena kontrollina

   — 1 nM E2:ta + tamoksifeenia (kolmena näytteenä).

Aineiston tulkintaperusteet

Huomautus: Kaikki kuopat on käsiteltävä samalla pitoisuudella kantaja-ainetta.

— Jos käsittely estrogeenireseptorin antagonistilla ei vaikuta tuntemattoman kemikaalin agonistiseen vaikutukseen, kemikaali luokitellaan negatiiviseksi.

— Jos tuntemattoman kemikaalin agonistinen vaikutus estyy kokonaan, on sovellettava päätöksentekoperusteita.

— Jos agonistinen vaikutus pienimmällä pitoisuudella on yhtä suuri tai suurempi kuin PC-10-vaste, tuntematon kemikaali estyy yhtä paljon tai enemmän kuin PC10-vaste. Estrogeenireseptorin antagonistilla käsittelemättömien ja käsiteltyjen kuoppien välisten vasteiden ero lasketaan. Tätä eroa on pidettävä todellisena vasteena, ja sitä on käytettävä laskettaessa asianmukaisia parametreja, jotta luokittelupäätös voidaan tehdä.

Tietojen analysointi

Tarkista suoritusvaatimukset.

Tarkista samoissa oloissa käsiteltyjen kuoppien variaatiokerroin.

1. Laske kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

2. Vähennä kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisen sellaisen kuopan arvosta, jota **ei** ole käsitelty tamoksifeenilla.

3. Laske tamoksifeenin keskiarvo.

4. Vähennä kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisen sellaisen kuopan arvosta, joka on käsitelty tamoksifeenilla.

5. Laske positiivisen kontrollin keskiarvo.

6. Laske kaikkien muiden kuoppien suhteellinen transkriptionaalinen aktiivisuus positiiviseen kontrolliin nähden.

▼**M8**

Lisäys 2.2

DEKSTRAANILLA PINNOITETULLA HIILELLÄ (DCC) KÄSITELLYN SEERUMIN VALMISTAMINEN

1. Dekstraanilla pinnoitettua hiiltä sisältävällä seerumilla käsittely on yleinen menetelmä, jolla poistetaan estrogeenisia yhdisteitä solujen kasvatusliuokseen lisättävästä seerumista. Näin vältetään seerumissa oleviin estrogeenijäämiin liittyvä vastausharha. Tällä menettelyllä voidaan käsitellä 500 ml naudan sikiön verestä valmistettua seerumia.

Osat

2. Seerumin valmistamisessa tarvitaan seuraavat materiaalit ja laitteet:

Materiaalit

Aktiivihiili

Dekstraani

Magnesiumkloridiheksahydraatti (MgCl2·6H2O)

Sakkaroosi

1 M HEPES-puskuriliuos (pH 7,4)

Suodatinjärjestelmällä tuotettu ultrapuhdas vesi

Laitteet

Autoklaavattu lasiastia (koko määritettävä asianmukaisesti), yleinen laboratoriosentrifugi (jonka lämpötilaksi voidaan asettaa 4 °C)

Menettely

3. Seuraava menettely koskee 50 ml:n sentrifugiputkien käyttöä:

[Päivä 1] Valmista dekstraanilla pinnoitettu hiilisuspensio 1 litrasta ultrapuhdasta vettä, joka sisältää 1,5 mM magnesiumkloridia, 0,25 M sakkaroosia, 2,5 g hiiltä, 0,25 g dekstraania ja 5 mM HEPES-liuosta. Sekoita suspensio 4 °C:ssa ja anna sen olla yön yli.

[Päivä 2] Jaa suspensio 50 ml:n sentrifugiputkiin ja sentrifugoi ne kierrosluvulla 10 000 rpm 4 °C:ssa 10 minuutin ajan. Poista supernatantti ja varastoi puolet hiilisedimentistä 4 °C:seen käytettäväksi päivänä 3. Suspendoi toinen puoli hiilestä FBS:n kanssa, joka on sulatettu varovasti saostumisen välttämiseksi ja lämpöinaktivoitu 56 °C:ssa 30 minuutin ajan, ja siirrä seos autoklaavattuun lasiastiaan, esimerkiksi Erlenmeyer-pulloon. Sekoita tämä suspensio varovasti 4 °C:ssa ja anna sen olla yön yli.

[Päivä 3] Jaa suspensio ja FBS sentrifugiputkiin ja sentrifugoi ne kierrosluvulla 10 000 rpm 4 °C:ssa 10 minuutin ajan. Kerää FBS ja siirrä se uuteen hiilikerrokseen, joka on valmistettu ja varastoitu päivänä 2. Suspendoi hiilisedimentti ja sekoita tämä suspensio autoklaavatussa lasiastiassa 4 °C:ssa ja anna sen olla yön yli.

[Päivä 4] Jaa suspensio putkiin ja sentrifugoi ne kierrosluvulla 10 000 (lämpötila 4 °C) 10 minuutin ajan. Steriloi supernatantti suodattamalla se 0,2 µm:n steriilin suodattimen läpi. Tämä dekstraanilla ja hiilellä käsitelty FBS on säilytettävä -20 °C:ssa, ja se pitää käyttää vuoden kuluessa.

▼**M8**

Lisäys 3

VM7LUC-SOLULINJAAN PERUSTUVA ESTROGEENIRESEPTORIN TRANSAKTIVAATIOTESTI ESTROGEENIRESEPTORIN AGONISTIEN JA ANTAGONISTIEN MÄÄRITTÄMISEKSI

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. Tässä testissä käytetään VM7Luc4E2-solulinjaa ([1]). Sen ovat validoineet NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) ja vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea ICCVAM (1). VM7Luc-solulinja ilmentää pääasiassa endogeenista ERα-reseptoria ja vähemmässä määrin myös ERβ-reseptoria (2) (3) (4).

2. Tätä testiä voidaan käyttää hyvin monenlaisiin aineisiin, kunhan ne liukenevat dimetyylisulfoksidiin (DMSO; CAS-nro 67-68-5), eivät reagoi siihen tai soluviljelyaineeseen eivätkä ole sytotoksisia testattavina pitoisuuksina. Jos DMSO:n käyttö ei ole mahdollista, voidaan käyttää toista kantaja-ainetta, kuten etanolia tai vettä (ks. 12 kohta). VM7Luc ER TA -(ant)agonistitestin osoitettu suorituskyky viittaa siihen, että tämän testin tuloksista voidaan saada tietoa estrogeenivälitteisistä vaikutustavoista, ja sitä voidaan harkita määritettäessä niiden aineiden tärkeysjärjestystä, joista on syytä tehdä lisätestejä.

3. Tämä testi on kehitetty nimenomaan hERα- ja hERß-välitteisen transaktivaation havaitsemiseen; päätetapahtumana mitataan kemiluminesenssia. Biotesteissä kemiluminesenssia käytetään laajalti, koska luminesenssin signaali-taustasuhde on suuri. Solupohjaisissa testeissä tulikärpäsen lusiferaasientsyymin aktiivisuutta voivat kuitenkin häiritä aineet, jotka estävät lusiferaasientsyymiä, mikä aiheuttaa joko selvää inhibiota tai luminesenssin voimakkuuden kasvamista proteiinien stabilisoitumisen vuoksi. Lisäksi joistakin lusiferaasipohjaisista estrogeenireseptorin reportterigeenitesteistä on myös ilmoitettu yli 1 µM:n suuruisten fytoestrogeenipitoisuuksien yhteydessä muun kuin reseptorin välittämiä luminesenssisignaaleja, jotka johtuvat lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta. Vaikka annos-vastekäyrä osoittaa, että estrogeenireseptorijärjestelmän varsinainen aktivoituminen tapahtuu pienemmillä pitoisuuksilla, fytoestrogeenien tai samankaltaisten yhdisteiden, joiden epäillään tuottavan fytoestrogeenien kaltaista lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumista, aiheuttamaa lusiferaasin ilmentymistä on tutkittava huolellisesti ER TA -testijärjestelmillä, joissa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja.

4. Kohdat ”YLEISJOHDANTO” JA ”ER TA -TESTIN OSAT” on luettava, ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

([1]) Ennen kesäkuuta 2016 tämän solulinjan nimi oli BG1Luc. BG-1-soluja kuvasivat ensimmäisen kerran Geisinger ja muut (1998) (12), ja myöhemmin niitä luonnehtivat National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) -tutkimuslaitoksen tutkijat (13). Melko hiljattain havaittiin, että tutkijoiden käyttämistä BG-1-soluista on kaksi erilaista varianttia, BG-1 Fr ja BG-1 NIEHS. Lin työtovereineen toteuttama tarkempi analyysi ja DNA-testi (2014) (14) näiden kahden BG-1-variantin solulinjoista osoitti, että BG-1 Fr oli ainutkertainen ja että BG-1 NIEHS, testin kehittämisessä käytetty alkuperäinen solulinja, ei ollutkaan ihmisen munasarjakarsinooman BG1-solulinja, vaan ihmisen rintasyövän MCF7-solulinjan variantti. Testissä käytetty solulinja, jonka nimi oli aikaisemmin BG1Luc4E2 (15), on nyt nimeltään VM7Luc4E2 (”V” = variantti; ”M7” = MCF7-solut). Niinpä testin nimi on nyt VM7Luc ER TA. Vaikka tämä muuttaa sen solulinjan alkuperää, johon testi perustuu, se ei kuitenkaan vaikuta julkaistuihin validointitutkimuksiin eikä tämän testin käyttökelpoisuuteen ja soveltamiseen niiden kemikaalien seulonnassa, joilla voi olla estrogeenisia tai antiestrogeenisia vaikutuksia.

▼M8

TESTIN PERIAATE (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

5. Testiä käytetään osoittamaan ligandin sitoutuminen estrogeenireseptoriin, minkä jälkeen reseptori-ligandikompleksi siirtyy tumaan. Tumassa reseptori-ligandikompleksi sitoutuu tiettyihin DNA:n responssielementteihin ja transaktivoi reportterigeenin (*luc*). Tämä käynnistää lusiferaasin tuotannon ja sen myötä valoemission, joka voidaan kvantifioida luminometrillä. Lusiferaasin aktiivisuutta voidaan arvioida nopeasti ja edullisesti monilla kaupallisesti saatavilla olevilla testisarjoilla. VM7Luc ER TA -testissä käytetään estrogeenille herkkää ihmisen rintasyövän adenokarsinoomasta peräisin olevaa solulinjaa (VM7), johon on pysyvästi transfektoitu tulikärpäsen *luc*-reportterikonstrukti neljän estrogeeniherkän elementin säätelemänä hiiren rintasyöpäviruksen promoottoria edeltävään sekvenssikohtaan,jotta havaittaisiin estrogeenireseptoriin agonistisesti tai antagonistisesti vaikuttavat aineet *in vitro*. Tämä hiiren rintasyöpäviruksen promoottori ilmentää vain vähän ristireaktiivisuutta muiden steroidien ja muiden hormonien kuin steroidien kanssa (8). Aineiston tulkintaperusteet on kuvattu yksityiskohtaisesti 41 kohdassa. Positiivisena vasteena pidetään pitoisuus-vastekäyrää, jossa on vähintään kolmessa pisteessä ei-päällekkäiset virhepalkit (keskiarvo ± SD) ja vähintään 20 prosentin muutos amplitudissa (normalisoitu suhteellinen valoyksikkö [RLU]) vertailustandardin enimmäisarvosta (agonistitestissä 17β-estradioli [E2; CAS-nro 50-28-2], antagonistitestissä raloksifeeni HCl [Ral; CAS-nro 84449-90-1] / E2).

MENETTELY

Solulinja

6. Testissä on käytettävä VM7Luc4E2-solulinjaa, jossa on pysyvästi transfektoituja soluja. Tällä hetkellä solulinjaa on saatavana vain teknisen lisenssisopimuksen nojalla Kalifornian yliopistosta (University of California, Davis, Kalifornia, Yhdysvallat) ([1]) ja Xenobiotic Detection Systems Inc. -yritykseltä (Durham, Pohjois-Carolina, Yhdysvallat) ([2]).

Solulinjan stabiilisuus

7. Jotta solulinjan stabiilisuus ja eheys säilyy, soluja on kasvatettava useampi kuin yksi siirrostus pakastetusta varastosta solujen kasvatusliuoksessa (ks. 9 kohta). Soluja ei kuitenkaan tule kasvattaa yli 30:tä siirrostusta. VM7Luc4E2-solulinjan osalta 30 siirrostuksen tekeminen kestää noin kolme kuukautta.

Soluviljelmä ja maljausolot

8. Kaikkien materiaalien ja menetelmien laadun varmistamiseksi on noudatettava menettelyjä, jotka on esitetty hyviä soluviljelykäytäntöjä koskevassa oppaassa Guidance on Good Cell Culture Practice (5) (6). Näin taataan kaikkien töiden integriteetti, validiteetti ja toistettavuus.

9. VM7Luc4E2-soluja säilytetään RPMI 1640 -kasvatusaineessa, jota täydennetään 0,9-prosenttisella Pen-Strepillä ja 8,0-prosenttisella FBS-seerumilla asianmukaisessa kudosviljelyinkubaattorissa. Lämpötilan on oltava 37 °C ± 1 °C, ilmankosteuden 90 % ± 5 % ja ilman hiilidioksidipitoisuuden 5,0 % ± 1 %.

10. Kun saavutetaan ~80 prosentin konfluenssi, VM7Luc4E2-soluista tehdään jatkoviljely, ja ne asetetaan estrogeenittomaan ympäristöön 48 tunnin ajaksi ennen kuin solut laitetaan 96-kuoppaisille levyille altistettavaksi testikemikaaleille. Sen jälkeen analysoidaan estrogeenin aiheuttama lusiferaasin aktiivisuus. Estrogeeniton kasvatusaine (EFM) sisältää Dulbecco's Modification

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, USA, sähköpostiosoite: msdenison@ucdavis.edu, +1 530 754 8649.

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, sähköpostiosoite: info@dioxins.com, puhelin: +1 919 688 4804, faksi: +1 919 688 4404.

▼M8

of Eagle's Medium (DMEM) -ainetta ilman fenolipunaista. Siihen lisätään 4,5-prosenttista hiili-/dekstraanikäsiteltyä FBS:ää, 1,9-prosenttista L-glutamiinia ja 0,9-prosenttista Pen-Strepiä. Missään muoviesineissä ei saa olla estrogeenista vaikutusta [ks. tarkka tutkimusprotokolla (7)].

Hyväksymisperusteet

11. Testin hyväksyminen tai hylkääminen perustuu vertailustandardin ja kontrollitulosten arviointiin jokaisen 96-kuoppaisella levyllä tehdyn kokeen osalta. Jokainen vertailustandardi testataan useampana pitoisuutena, ja jokaisesta vertailu- ja kontrollipitoisuudesta on useita näytteitä. Tuloksia verrataan näiden parametrien laatukontrolleihin,jotka on saatu kunkin laboratorion pätevyyden osoittamisen aikana tuottamista aikaisemmista agonisti- ja antagonistitietokannoista. Aikaisempia tietokantoja päivitetään vertailustandardien ja kontrollien arvoilla jatkuvasti. Jos laitteita tai laboratorio-oloja muutetaan, aikaisemmat tietokannat voidaan joutua päivittämään.

Agonistitesti

Annoksenmääritystesti

- Induktio: Levyn induktio on mitattava jakamalla keskimäärin suurin E2-vertailustandardin suhteellisen valoyksikön (RLU) arvo keskimääräisellä DMSO-kontrollin RLU-arvolla. Yleensä saavutetaan viisinkertainen induktio, mutta hyväksynnän kannalta riittää, että se on suurempi tai yhtä suuri kuin nelinkertainen.

- DMSO-kontrollin tulokset: Liuotinkontrollin RLU-arvot saavat olla enintään 2,5 kertaa aikaisemman liuotinkontrollin keskimääräinen RLU-arvon keskihajonta.

- Jos kumpikaan hyväksymisperuste ei täyty, koe on hylättävä ja tehtävä uudestaan.

Laaja testi

Testissä sovelletaan agonistin annoksenmääritystestin hyväksymisperusteita ja seuraavia tietoja:

- Vertailustandarditulokset: E2-vertailustandardin pitoisuus-vastekäyrän on oltava S-kirjaimen muotoinen, ja vähintään kolmen arvon on oltava pitoisuus-vastekäyrän lineaarisella osuudella.

- Positiivisen kontrollin tulokset: Metoksikloorikontrollin RLU-arvojen on oltava suuremmat kuin DMSO:n keskiarvo plus kolme kertaa sen keskihajonta.

- Jos mikään yksittäinen hyväksymisperuste ei täyty, koe on hylättävä ja tehtävä uudestaan.

Antagonistitesti

Annoksenmääritystesti

- Pelkistyminen: Levyn pelkistyminen mitataan jakamalla keskimäärin suurin Ral-/E2-vertailustandardin RLU-arvo DMSO-kontrollin keskimääräisellä RLU-arvolla. Yleensä saavutetaan viisinkertainen pelkistyminen, mutta hyväksynnän kannalta riittää, että se on suurempi tai yhtä suuri kuin kolminkertainen.

- E2-kontrollin tulokset: E2-kontrollin RLU-arvot saavat olla enintään 2,5 kertaa aikaisemman E2-kontrollin keskimääräinen RLU-arvon keskihajonta.

▼M8

- DMSO-kontrollin tulokset: DMSO-kontrollin RLU-arvot saavat olla enintään 2,5 kertaa aikaisemman liuotinkontrollin keskimääräinen RLU-arvon keskihajonta.

- Jos mikään yksittäinen hyväksymisperuste ei täyty, koe on hylättävä ja tehtävä uudestaan.

Laaja testi

Testissä sovelletaan antagonistin annoksenmääritystestin hyväksymisperusteita ja seuraavia tietoja:

- Vertailustandarditulokset: Ral-/E2-vertailustandardin pitoisuus-vastekäyrän on oltava S-kirjaimen muotoinen, ja vähintään kolmen arvon on oltava pitoisuus-vastekäyrän lineaarisella osuudella.

- Positiivisen kontrollin tulokset: Tamoksifeeni-/E2-kontrollin RLU-arvojen on oltava pienemmät kuin E2-kontrollin keskiarvo miinus kolme kertaa sen keskihajonta.

- Jos mikään yksittäinen hyväksymisperuste ei täyty, koe on hylättävä ja tehtävä uudestaan.

Vertailustandardit, positiiviset ja kantaja-ainekontrollit

Kantaja-ainekontrolli (agonisti- ja antagonistitestit)

12. Kantaja-aine, jota on käytetty testikemikaalien liuottamiseen, on testattava kantaja-ainekontrollina. VM7Luc ER TA -testin validoinnissa käytetty kantaja-aine oli 1-prosenttinen (v/v) dimetyylisulfoksidi (DMSO, CAS-nro 67-68-5) (ks. 24 kohta). Jos käytetään muuta kantaja-ainetta kuin DMSO:ta, kaikki vertailustandardit, kontrollit ja testikemikaalit on testattava samassa kantaja-aineessa tarvittaessa.

Vertailustandardi (agonistin annoksenmääritys)

13. Vertailustandardi on E2 (CAS-nro 50-28-2). Annoksenmääritystestissä vertailustandardi koostuu E2:n neljän pitoisuuden sarjalaimennoksesta (1,84 x 10^{-10}, 4,59 x 10^{-11}, 1,15 x 10^{-11} ja 2,87 x 10^{-12} M), ja jokainen pitoisuus testataan rinnakkaisessa kuopassa.

Vertailustandardi (laaja agonistitesti)

14. Laajassa testissä E2 koostuu 1:2-sarjalaimennoksesta, joka puolestaan koostuu 11 pitoisuudesta (vaihdellen välillä 3,67 x 10^{-10} – 3,59 x 10^{-13} M) E2:ta rinnakkaisissa kuopissa.

Vertailustandardi (antagonistin annoksenmääritys)

15. Vertailustandardi on tämä yhdistelmä: Ral (CAS-nro 84449-90-1) ja E2 (CAS-nro 50-28-2). Annoksenmääritystestissä Ral/E2 koostuu Ral:n sarjalaimennoksesta (3,06 x 10^{-9}, 7,67 x 10^{-10} ja 1,92 x 10^{-10}M) ja kiinteästä pitoisuudesta (9,18 × 10^{-11} M) E2:ta rinnakkaisissa kuopissa.

Vertailustandardi (laaja antagonistitesti)

16. Laajassa testissä Ral/E2 koostuu Ral:n sarjalaimennoksesta suhteessa 1:2 (vaihdellen välillä 2,45x 10^{-8} – 9,57 x 10^{-11}M) ja kiinteästä pitoisuudesta (9,18 × 10^{-11} M) E2, ja Ral:ia/E2:ta laitetaan yhdeksän pitoisuutta rinnakkaisiin kuoppiin.

Heikko positiivinen kontrolli (agonisti)

17. Heikko positiivinen kontrolli on 9,06 x 10^{-6} M *p,p'*-metoksikloori (metoksikloori; CAS-nro 72-43-5) estrogeenittomassa kasvatusaineessa.

▼**M8**

Heikko positiivinen kontrolli (antagonisti)

18. Heikko positiivinen kontrolli sisältää tamoksifeenia (CAS-nro 10540-29-1) 3,36 x 10^{-6} M ja 9,18 × 10^{-11} M E2:ta estrogeenittomassa kasvatusaineessa.

E2-kontrolli (vain antagonistitesti)

19. E2-kontrolli on 9,18 × 10^{-11} M E2:ta estrogeenittomassa kasvatusaineessa, ja sitä käytetään lähtötason negatiivisena kontrollina.

Induktiokerroin (agonisti)

20. Vertailustandardin (E2) lusiferaasiaktiivisuuden induktio mitataan jakamalla keskimäärin suurin E2-vertailustandardin RLU-arvo DMSO-kontrollin keskimääräisellä RLU-arvolla. Tuloksen pitää olla suurempi kuin nelinkertainen.

Induktiokerroin (antagonisti)

21. Vertailustandardin (Ral/E2) keskimääräinen lusiferaasiaktiivisuus mitataan jakamalla keskimäärin suurin Ral/E2-vertailustandardin RLU-arvo DMSO-kontrollin keskimääräisellä RLU-arvolla. Tuloksen pitää olla suurempi kuin kolminkertainen.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen (ks. 14 kohta sekä taulukot 3 ja 4 tämän testimenetelmän kohdassa ER TA -TESTIN OSAT).

Kantaja-aine

22. Testikemikaalit on liuotettava liuottimeen, johon testikemikaali liukenee ja jonka voi sekoittaa solujen kasvatusliuokseen. Sopivia kantaja-aineita ovat vesi, etanoli (puhtaus 95–100 prosenttia) ja DMSO. Jos käytetään DMSO:ta, sen pitoisuus saa olla enintään 1 tilavuusprosentti (v/v). Kaikkien kantaja-aineiden osalta on osoitettava, ettei käytetty enimmäistilavuus ole sytotoksinen ja ettei se vaikuta testin suorittamiseen. Vertailustandardit ja kontrollit liuotetaan 100-prosenttiseen liuottimeen ja laimennetaan sen jälkeen asianmukaisiksi pitoisuuksiksi estrogeenittomassa kasvatusaineessa.

Testikemikaalien valmistelu

23. Testikemikaalit liuotetaan 100-prosenttiseen DMSO:hon (tai asianmukaiseen liuottimeen) ja laimennetaan sen jälkeen asianmukaisiksi pitoisuuksiksi estrogeenittomassa kasvatusaineessa. Kaikkien testikemikaalien on annettava tasapainottua huoneenlämpötilassa, ennen kuin ne liuotetaan ja laimennetaan. Jokaiseen kokeeseen on valmistettava tuoreet testikemikaaliliuokset. Liuoksissa ei saa olla huomattavaa saostumista tai sameutta. Vertailustandardien ja kontrollien kantaliuokset voidaan valmistaa bulkkiliuoksina; lopullinen vertailustandardi, kontrollilaimennokset ja testikemikaalit on kuitenkin valmistettava tuoreena kuhunkin kokeeseen ja käytettävä 24 tunnin kuluessa valmistamisesta.

Liukoisuus ja sytotoksisuus: annoksenmääritystä koskevat näkökohdat

24. Annoksenmääritystesti koostuu seitsemästä kohdasta – 1:10-laimennoksista, jotka ajetaan rinnakkaisnäytteinä. Aluksi testikemikaalit testataan enimmäispitoisuudella 1 mg/ml (~1 mM) (agonistitesti) ja 20 μg/ml (~10 μM) (antagonistitesti). Annoksenmäärityskokeilla määritetään seuraavat seikat:

— testikemikaalin aloituspitoisuudet, joita käytetään laajassa testissä

— testikemikaalin laimennukset (1:2 tai 1:5), joita käytetään laajassa testissä.

▼M8

25. Solujen elinkyvyn / sytotoksisuuden arviointi sisältyy agonisti- ja antagonistitestien protokollaan (7), ja se kuuluu myös annoksenmääritykseen ja laajaan testiin. Sytotoksisuusmenetelmä, jolla arvioitiin solujen elinkykyä VM7Luc ER TA -testin validoinnin aikana (1), oli skaalattu laadullinen visuaalinen tarkkailumenetelmä, mutta sytotoksisuuden määrittämisessä voidaan käyttää myös kvantitatiivista menetelmää (ks. protokolla (7)). Sellaisia tietoja testikemikaalipitoisuuksista, jotka aiheuttavat yli 20 prosentin vähenemisen elinkyvyssä, ei voida käyttää.

Testikemikaalille altistus ja testilevyn järjestäminen

26. Solut lasketaan ja laitetaan 96-kuoppaisille kudosviljelylevyille (2×10^5 solua yhteen kuoppaan) estrogeenittomaan kasvatusaineeseen, ja niitä inkuboidaan 24 tunnin ajan, jotta solut kiinnittyvät levyyn. Estrogeeniton kasvatusaine poistetaan ja korvataan niin ikään estrogeenittomassa kasvatusaineessa olevilla testi- ja vertailukemikaaleilla, joita inkuboidaan 19–24 tuntia. Erityistä varovaisuutta on noudatettava erittäin haihtuvien aineiden kanssa, koska lähellä olevat kontrollikuopat voivat tuottaa niiden vuoksi vääriä positiivisia tuloksia. Näissä tapauksissa sulkijakalvoista voi olla apua yksittäisten kuoppien eristämisessä testauksen aikana, joten niiden käyttö on suositeltavaa.

Annoksenmääritystestit

27. Annoksenmääritystesteissä käytetään kaikkia 96-kuoppaisen levyn kuoppia testattaessa enintään kuusi testikemikaalia seitsenvaiheisina 1:10-sarjalaimennoksina rinnakkaisnäyttein (ks. kuvat 1 ja 2).

— *Agonistin* annoksenmääritystestissä käytetään neljää E2-pitoisuutta rinnakkaisnäytteinä vertailustandardina ja neljää rinnakkaiskuoppaa DMSO-kontrollille.

— *Antagonistin* annoksenmääritystestissä käytetään kolmea Ral/E2-pitoisuutta ja $9{,}18 \times 10^{-11}$ M:ta E2:ta rinnakkaisnäytteinä vertailustandardina, ja E2-kontrollille ja DMSO-kontrollille on kolme rinnakkaista kuoppaa.

Kuva 1

Agonistin annoksenmääritystesti, 96-kuoppaisen levyn järjestys

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	KK	KK	KK	KK	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Lyhenteet: E2-1–E2-4 = E2-vertailustandardin pitoisuudet (suurimmasta pienempään); TC1-1–TC1-7 = testikemikaalin 1 pitoisuudet (TC1) (suurimmasta pienimpään); TC2-1– TC2-7 = testikemikaalin 2 pitoisuudet (TC2) (suurimmasta pienimpään); TC3-1– TC3-7 = testikemikaalin 3 pitoisuudet (TC3) (suurimmasta pienimpään); TC4-1– TC4-7 = testikemikaalin 4 pitoisuudet (TC4) (suurimmasta pienimpään); TC5-1– TC5-7 = testikemikaalin 5 pitoisuudet (TC5) (suurimmasta pienimpään); TC6-1– TC6-7 = testikemikaalin 6 pitoisuudet (TC6) (suurimmasta pienimpään); KK = kantaja-ainekontrolli (DMSO [1 % v/v EFM.]).

▼M8

Kuva 2

Antagonistin annoksenmääritystesti, 96-kuoppaisen levyn järjestys

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	KK	KK	KK	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Lyhenteet: E2 = E2-kontrolli; Ral-1–Ral-3 = raloksifeeni-/E2-vertailustandardin pitoisuudet (suurimmasta pienimpään); TC1-1–TC1-7 = testikemikaalin 1 pitoisuudet (TC1) (suurimmasta pienimpään); TC2-1– TC2-7 = testikemikaalin 2 pitoisuudet (TC2) (suurimmasta pienimpään); TC3-1– TC3-7 = testikemikaalin 3 pitoisuudet (TC3) (suurimmasta pienimpään); TC4-1– TC4-7 = testikemikaalin 4 pitoisuudet (TC4) (suurimmasta pienimpään); TC5-1– TC5-7 = testikemikaalin 5 pitoisuudet (TC5) (suurimmasta pienimpään); TC6-1– TC6-7 = testikemikaalin 6 pitoisuudet (TC6) (suurimmasta pienimpään); KK = kantaja-ainekontrolli (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Huomautus: Kaikki testikemikaalit testataan tässä määrässä E2:ta: 9,18 × 10-11 M.

28. Nesteen suositeltava lopullinen määrä jokaisessa kuopassa on 200 µl. Käytä vain sellaisia testilevyjä, joissa solujen elinkyky kaikissa kuopissa on vähintään 80 prosenttia.

29. Laajan ***agonistitestin*** aloituspitoisuuksien määritys kuvataan perusteellisesti agonistitestin protokollassa (7). Määritysperusteet ovat lyhyesti seuraavat:

— Jos testikemikaalin pitoisuuskäyrässä ei ole pisteitä, jotka ovat suurempia kuin keskiarvo plus kolme kertaa DMSO-kontrollin keskihajonta, tehdään laaja testi käyttämällä 11-kohtaista 1:2-sarjalaimennosta alkaen suurimmasta liukenevasta pitoisuudesta.

— Jos testikemikaalin pitoisuuskäyrässä on pisteitä, jotka ovat suurempia kuin keskiarvo plus kolme kertaa DMSO-kontrollin keskihajonta, laajan testin 11-kohtaisessa laimennusmallissa käytettävän aloituspitoisuuden on oltava yhden login korkeampi kuin pitoisuus, jolla annoksenmääritystestissä saatiin suurin mukautettu RLU-arvo. Yksitoistakohtainen laimennusmalli perustuu joko laimennussuhteisiin 1:2 tai 1:5 seuraavien perusteiden mukaisesti:

On käytettävä 11-kohtaista sarjalaimennosta suhteessa 1:2, jos näin saatava pitoisuusalue kattaa vasteiden koko vaihteluvälin annoksenmääritystestissä laaditun pitoisuus-vastekäyrän perusteella. Muussa tapauksessa pitää käyttää laimennussuhdetta 1:5.

▼M8

— Jos testikemikaalin pitoisuus-vastekäyrä annoksenmääritystestissä on kaksifaasinen, kumpikin faasi on tutkittava laajassa testissä.

30. Laajan ***antagonistitestin*** aloituspitoisuuksien määritys kuvataan perusteellisesti antagonistitestin protokollassa (7). Määritysperusteet ovat lyhyesti seuraavat:

— Jos testikemikaalin pitoisuuskäyrässä ei ole pisteitä, jotka ovat pienempiä kuin keskiarvo miinus kolme kertaa E2:n keskihajonta, tehdään laaja kontrollitesti käyttämällä 11-kohtaista 1:2-sarjalaimennosta alkaen suurimmasta liukenevasta pitoisuudesta.

— Jos testikemikaalin pitoisuuskäyrässä on pisteitä, jotka ovat pienempiä kuin keskiarvo miinus kolme kertaa E2-kontrollin keskihajonta, laajan testin 11-kohtaisessa laimennusmallissa käytettävän aloituspitoisuuden on oltava jokin seuraavista:

• pitoisuus, jolla saatiin pienin mukautettu RLU-arvo annoksenmääritystestissä

• suurin liukeneva pitoisuus (ks. antagonistitestin protokolla (7), kuva 14-2)

• pienin sytotoksinen pitoisuus (ks. antagonistitestin protokolla (7), esimerkki kuvassa 14-3).

— Yksitoistavaiheinen laimennusmalli perustuu joko suhteessa 1:2 tai 1:5 tehtävään sarjaan tai laimennukseen seuraavien perusteiden mukaisesti:

On käytettävä 11-kohtaista sarjalaimennosta suhteessa 1:2, jos näin saatava pitoisuusalue kattaa vasteiden koko vaihteluvälin annoksenmääritystestissä laaditun pitoisuus-vastekäyrän perusteella. Muussa tapauksessa pitää käyttää laimennussuhdetta 1:5.

Laajat testit

31. Laaja testi koostuu 11-kohtaisista sarjalaimennoksista (joko suhteessa 1:2 tai suhteessa 1:5 laajan testin kriteerien mukaisen aloituspitoisuuden perusteella), ja jokainen pitoisuus testataan kolmessa kuopassa 96-kuoppaisella levyllä (ks. kuvat 3 ja 4).

— Laajassa *agonistitestissä* käytetään E2:sta 11:tä pitoisuutta rinnakkaisnäytteinä vertailustandardina. Jokaiselle levylle sisällytetään neljä rinnakkaisnäytekuoppaa DMSO-kontrollille ja neljä rinnakkaisnäytekuoppaa metoksikloorikontrollille ($9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— Laajassa antagonistitestissä käytetään yhdeksää pitoisuutta Ral:ia/E2:ta sekä $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2:ta vertailustandardina (kaksi rinnakkaisnäytettä). Neljään rinnakkaisnäytekuoppaan laitetaan $9{,}18 \times 10^{-11}$ M E2-kontrollia, neljään rinnakkaisnäytekuoppaan DMSO-kontrollit ja neljään rinnakkaisnäytekuoppaan $3{,}36 \times 10^{-6}$M tamoksifeenia.

▼M8

Kuva 3

Laaja agonistitesti, 96-kuoppaisen levyn järjestys

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	KK
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meto
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meto
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meto
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meto

Lyhenteet: TC1-1–TC1-11 = testikemikaalin 1 pitoisuudet (suurimmasta pienimpään); TC2-1–TC2-11 = testikemikaalin 2 pitoisuudet (suurimmasta pienimpään); E2-1–E2-11 = E2-vertailustandardin pitoisuudet (suurimmasta pienempään); meto = p,p' metoksikloori, heikko positiivinen kontrolli; KK = DMSO (1 % v/v) EFM -kantaja-ainekontrolli

Kuva 4

Laaja antagonistitesti, 96-kuoppaisen levyn järjestys

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	KK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	KK
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Lyhenteet: E2 = E2-kontrolli; Ral-1–Ral-9 = raloksifeeni-/E2-vertailustandardin pitoisuudet (suurimmasta pienimpään); tam = tamoksifeeni/E2, heikko positiivinen kontrolli; TC1-1–TC1-11 = testikemikaalin 1 pitoisuudet (TC1) (suurimmasta pienimpään); TC2-1– TC2-11 = testikemikaalin 2 pitoisuudet (TC2) (suurimmasta pienimpään); KK = kantaja-ainekontrolli (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Huomautus: Kuten edellä on mainittu, kaikki vertailu- ja testikuopat sisältävät kiinteän pitoisuuden E2:ta (9,18 x 10–11 M).

32. Laajojen testien toistot samasta kemikaalista on tehtävä eri päivinä, jotta varmistetaan testien riippumattomuus. Laajoja testejä on tehtävä vähintään kaksi. Jos testien tulokset ovat ristiriitaiset (ts. toinen on positiivinen, toinen negatiivinen) tai jos jokin testeistä on puutteellinen, on tehtävä kolmas testi.

Luminesenssin mittaaminen

33. Luminesenssia mitataan 300–650 nm:n alueella käyttäen injektoivaa luminometriä ja ohjelmaa, joka säätelee injektiotilavuutta ja mittausväliä (7). Jokaisen kuopan valoemissio ilmoitetaan myös RLU:na kuoppaa kohti.

▼M8

AINEISTON ANALYSOINTI

EC_{50}-/IC_{50}-arvojen määritys

34. EC_{50}-arvo (puolet testikemikaalin suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta [agonistit]) ja IC_{50}-arvo (puolet testikemikaalin suurimmasta estävästä pitoisuudesta [antagonistit]) määritetään pitoisuus-vastetiedoista. Jos testikemikaali on positiivinen yhtenä tai useampana pitoisuutena, testikemikaalin se pitoisuus, joka aiheuttaa puolet suurimmasta vasteesta (IC_{50} tai EC_{50}), lasketaan käyttämällä Hillin funktioanalyysia tai sopivaa vaihtoehtoa. Hillin funktio on neljään parametriin perustuva logistinen matemaattinen malli, jolla testikemikaalin pitoisuus liitetään vasteeseen (yleensä S-kirjaimen muotoisella käyrällä) alla olevalla yhtälöllä:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)HillSlope}$$

Jossa:

Y = vaste (ts. RLU-arvot)

X = pitoisuuden logaritmi

Bottom = minimivaste

Top = maksimivaste

lg EC_{50} (tai lg IC_{50}) = X:n logaritmi vasteen keskikohtana ylimmän ja alimman välissä

Hillslope = käyrän kaltevuus.

Mallilla lasketaan paras sovitus parametreille top, bottom, hillslope sekä IC_{50} ja EC_{50}. EC_{50}- ja IC_{50}-arvojen laskemisessa on käytettävä asianmukaista tilasto-ohjelmaa (esimerkiksi Graphpad Prism® -tilasto-ohjelmaa).

Poikkeamien määritys

35. Tilastollisen analyysin laatua voidaan parantaa sisällyttämällä siihen (esimerkiksi) Q-testi (ks. agonisti- ja antagonistitestien protokollat (7)). Sillä voidaan määrittää ”käyttämättömät” kuopat, jotka suljetaan pois aineiston analyysista.

36. E2-vertailustandardin rinnakkaisnäytteiden (otoksen koko on kaksi) osalta rinnakkaisnäytteen mukautettu RLU-arvo E2:n tietyn pitoisuuden yhteydessä katsotaan poikkeamaksi, jos sen arvo on yli 20 prosenttia suurempi tai pienempi kuin kyseisen pitoisuuden mukautettu RLU-arvo aikaisemmassa tietokannassa.

Luminometritietojen kerääminen ja mukauttaminen annoksenmääritystestissä

37. Luminometrin raakatiedot on siirrettävä testiä varten laadittuun taulukkolaskentamalliin. Lisäksi on selvitettävä, onko sellaisia poikkeavia datapisteitä, jotka on poistettava. (Ks. testin hyväksymisperusteista parametrit, jotka määritetään analyyseissa.) Seuraavat laskelmat on tehtävä:

Agonisti

Vaihe 1 Laske DMSO-kantaja-ainekontrollin (KK) keskiarvo.

Vaihe 2 Vähennä DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

▼**M8**

Vaihe 3 Laske vertailustandardin (E2) keskimääräinen induktiokerroin.

Vaihe 4 Laske testikemikaalien keskimääräinen EC_{50}-arvo.

Antagonisti

Vaihe 1 Laske DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2 Vähennä DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3 Laske vertailustandardin (Ral/E2) keskimääräinen pelkistyskerroin.

Vaihe 4 Laske E2-vertailustandardin keskiarvo.

Vaihe 5 Laske testikemikaalien keskimääräinen IC50-arvo.

Luminometritietojen kerääminen ja mukauttaminen laajassa testissä

38. Luminometrin raakatiedot on siirrettävä testiä varten laadittuun taulukkolaskentamalliin. Lisäksi on selvitettävä, onko sellaisia poikkeavia datapisteitä, jotka on poistettava. (Ks. testin hyväksymisperusteista parametrit, jotka määritetään analyyseissa.) Seuraavat laskelmat on tehtävä:

Agonisti

Vaihe 1 Laske DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2 Vähennä DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3 Laske vertailustandardin (E2) keskimääräinen induktiokerroin.

Vaihe 4 Laske E2:n ja testikemikaalien keskimääräinen EC_{50}-arvo.

Vaihe 5 Laske metoksikloorin keskimääräinen mukautettu RLU-arvo.

Antagonisti

Vaihe 1 Laske DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo.

Vaihe 2 Vähennä DMSO-kantaja-ainekontrollin keskiarvo jokaisesta kuopasta tietojen normalisoimiseksi.

Vaihe 3 Laske vertailustandardin (Ral/E2) keskimääräinen induktiokerroin.

Vaihe 4 Laske Ral:n/E2:n ja testikemikaalien keskimääräinen IC_{50}-arvo.

Vaihe 5 Laske tamoksifeenin keskimääräinen mukautettu RLU-arvo.

Vaihe 6 Laske E2-vertailustandardin keskiarvo.

▼M8

Aineiston tulkintaperusteet

39. VM7Luc ER TA -testi on tarkoitettu näyttöön perustuvan toimintatavan osaksi, kun tavoitteena on auttaa asettamaan aineita tärkeysjärjestykseen hormonaalisten haitta-aineiden *in vivo* -testausta varten. Yksi tämän priorisointimenettelyn osa on testikemikaalin luokittelu positiiviseksi tai negatiiviseksi joko estrogeenireseptorin agonistisen tai antagonistisen vaikutuksen osalta. VM7Luc ER TA -testin validointitutkimuksessa käytetyt positiiviset ja negatiiviset päätöksentekoperusteet on kuvattu taulukossa 1.

Taulukko 1

Positiiviset ja negatiiviset päätöksentekoperusteet

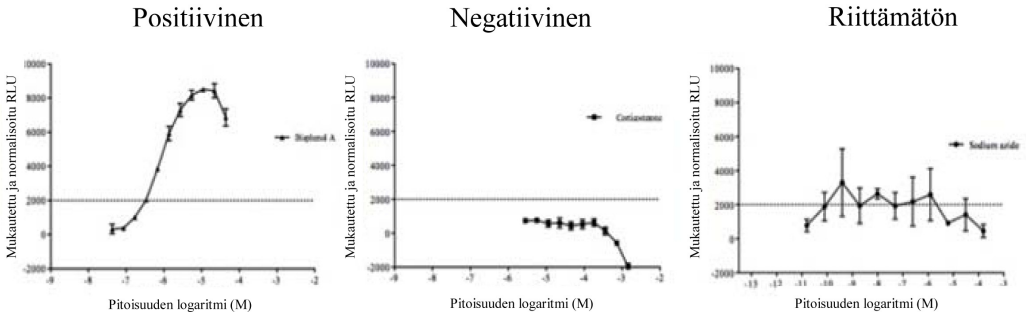
AGONISTINEN VAIKUTUS	
Positiivinen	— Kaikilla testikemikaaleilla, jotka luokitellaan positiivisiksi estrogeenireseptorin agonistisen vaikutuksen osalta, on oltava pitoisuus-vastekäyrä, jossa on peruslinja ja nouseva suora ja joka päättyy tasanteeseen tai huippuun. Joissakin tapauksissa vain kaksi näistä ominaisuuksista (peruslinja-nouseva suora tai nouseva suora-huippu) voidaan määrittää. — Nousevan suoran määrittävällä viivalla pitää olla vähintään kolmessa pisteessä ei-päällekkäiset virhepalkit (keskiarvo ± SD). Peruslinjan muodostavat pisteet suljetaan pois, mutta käyrän lineaariseen osuuteen voi sisältyä huippu tai tasanteen ensimmäinen piste. — Positiivinen luokitus edellyttää, että vasteen amplitudi (peruslinjan ja huipun välinen ero) on vähintään 20 prosenttia vertailustandardin (E2:n) enimmäisarvosta (ts. vähintään 2 000 RLU:ta, kun vertailustandardin [E2] suurin vastearvo mukautetaan 10 000 RLU:hun). — Mikäli mahdollista, jokaisesta positiivisesta testikemikaalista tulisi laskea EC_{50}-arvo.
Negatiivinen	Keskimääräinen mukautettu RLU on tietyn pitoisuuden osalta yhtä suuri tai pienempi kuin DMSO-kontrollin keskimääräinen RLU-arvo plus kolme kertaa DMSO:n RLU-arvon keskihajonta.
Puutteellinen	Aineistoa, jota ei voida pitää validina osoittamaan sen paremmin vaikutusta kuin sen puuttumistakaan huomattavien laadullisten tai määrällisten rajoitusten vuoksi, pidetään puutteellisena, eikä sitä voida käyttää määritettäessä, onko testikemikaali positiivinen vai negatiivinen. Kemikaalit on testattava uudelleen.
ANTAGONISTINEN VAIKUTUS	
Positiivinen	— Testikemikaalin tiedot tuottavat pitoisuus-vastekäyrän, jossa on peruslinjan jälkeen laskeva suora. — Laskevan suoran määrittävällä viivalla pitää olla vähintään kolmessa pisteessä ei-päällekkäiset virhepalkit; peruslinjan muodostavat pisteet suljetaan pois, mutta käyrän lineaariseen osuuteen voi sisältyä tasanteen ensimmäinen piste. — Vaikutuksen on oltava vähintään 20 prosenttia pienempi kuin vertailustandardin (Ral/E2) enimmäisarvo (ts. 8 000 RLU:ta tai vähemmän, kun vertailustandardin [Ral/E2] suurin vastearvo mukautetaan 10 000 RLU:hun). — Testikemikaalin suurimpien ei-sytotoksisten pitoisuuksien on oltava enintään $1x10^{-5}$ M. — Mikäli mahdollista, jokaisesta positiivisesta testikemikaalista tulisi laskea IC_{50}-arvo.
Negatiivinen	Kaikki datapisteet ovat EC_{80}-arvon yläpuolella (80 prosenttia E2-vasteesta tai 8 000 RLU:ta) pitoisuuksina, jotka ovat alle $1,0 \times 10^{-5}$ M.
Puutteellinen	Aineistoa, jota ei voida pitää validina osoittamaan sen paremmin vaikutusta kuin sen puuttumistakaan huomattavien laadullisten tai määrällisten rajoitusten vuoksi, pidetään puutteellisena, eikä sitä voida käyttää määritettäessä, onko testikemikaali positiivinen vai negatiivinen. Kemikaali on testattava uudelleen.

▼M8

40. Positiivisia tuloksia luonnehditaan sekä vaikutuksen suuruusluokalla että sillä pitoisuudella, jolla vaikutus ilmaantuu, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista, negatiivisista ja puutteellisista tiedoista on kuvissa 5 ja 6.

Kuva 5

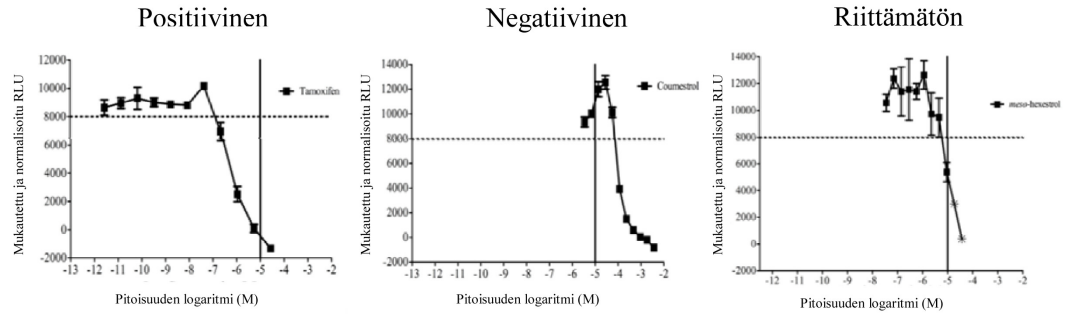
Esimerkkejä agonisteista: positiivisia, negatiivisia ja puutteellisia tietoja



Katkoviivan merkitys: 20 prosenttia E2-vasteesta, 2 000 mukautettua ja normalisoitua RLU:ta.

Kuva 6

Esimerkkejä antagonisteista: positiivisia, negatiivisia ja puutteellisia tietoja



Katkoviivan merkitys: 80 prosenttia Ral/E2-vasteesta, 8 000 mukautettua ja normalisoitua RLU:ta.

Kiinteä viiva tarkoittaa arvoa 1,00 x 10-5 M. Jotta vaste katsottaisiin positiiviseksi, sen on oltava 8 000 RLU:n viivan alapuolella ja pitoisuuksien on oltava alle 1,00 x 10-5M.

Tähdellä merkityt pitoisuudet meso-heksestrolikaaviossa tarkoittavat elinkykypisteitä ”2” tai enemmän.

Meso-heksestrolin testituloksia pidetään puutteellisina, koska ainoa vaste, joka on alle 8 000 RLU:ta, ilmaantui pitoisuudella 1,00 x 10-5M.

41. EC_{50}- ja IC_{50}-arvot voidaan laskea käyttämällä neljään parametriin perustuvaa Hillin funktiota (ks. tarkempia tietoja agonistitestin ja antagonistitestin protokollista (7)). Hyväksymisperusteiden täyttyminen tarkoittaa, että järjestelmä toimii asianmukaisesti, mutta se ei takaa, että tietty testiajo tuottaisi tarkkaa tietoa. Ensimmäisen testiajon tulosten toistuvuus on paras osoitus siitä, että testi tuottaa tarkkaa tietoa (ks. ER TA -TESTIN OSAT -luvun 19 kohta).

▼**M8**

TESTIRAPORTTI

42. Katso ”ER TA -TESTIN OSAT” -luvun 20 kohta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): s. 270–273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: s. 261–287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67–82.

(9) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol 71(10), s. 1459–69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology, 17(6):646–57.

(11) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology, 139(10):4252–63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280–288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649–654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072–2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors:development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67–82.

▼**M8**

Lisäys 4

ESTROGEENI-A:N TRANSAKTIVAATIOTESTI, JOSSA KÄYTETÄÄN PYSYVÄSTI TRANSFEKTOITUJA SOLUJA, KEMIKAALIEN ESTROGEENIRESEPTORIIN KOHDISTUVAN AGONISTISEN JA ANTAGONISTISEN VAIKUTUKSEN HAVAITSEMISEKSI ERA CALUX -SOLULINJAA KÄYTTÄEN

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. ERα CALUX -transaktivaatiotestissä käytetään ihmisen U2OS-solulinjaa ihmisen estrogeenireseptori alfan (hERα) välittämän agonistisen ja antagonistisen vaikutuksen havaitsemiseksi. Pysyvästi transfektoituihin soluihin perustuvan ERα CALUX -biotestin validointitutkimus, jonka teki BioDetection Systems BV (Amsterdam, Alankomaat), osoitti, että testi on merkityksellinen ja luotettava aiotussa käyttötarkoituksessaan (1). ERα CALUX -solulinja ilmentää vain pysyvästi transfektoitua ERα-reseptoria (2) (3).

2. Tämä testi on kehitetty nimenomaan hERα-välitteisen transaktivaation havaitsemiseen; päätetapahtumana mitataan bioluminesenssia. Bioluminesenssia käytetään biotesteissä yleisesti sen erittäin hyvän signaali-kohinasuhteen vuoksi (4).

3. Yli 1 µM:n suuruisten fytoestrogeenipitoisuuksien on ilmoitettu yliaktivoivan lusiferaasireportterigeenin, mistä seuraa ei-reseptorivälitteinen luminesenssi (5) (6) (7). Näin ollen suuremmat pitoisuudet fytoestrogeeneja tai muita samanlaisia yhdisteitä, jotka voivat yliaktivoida lusiferaasin ilmentymisen, on tutkittava huolellisesti pysyvästi estrogeenireseptorin transaktivaatiotesteissä, joissa käytetään pysyvästi transfektoituja soluja (ks. lisäys 2).

4. Kohdat ”YLEISJOHDANTO” JA ”ER TA -TESTIN OSAT” on luettava, ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

5. Biotestiä käytetään arvioitaessa ligandin sitoutumista estrogeenireseptoriin ja sitä seuraavaa reseptori-ligandikompleksin siirtymistä tumaan. Tumassa reseptori-ligandikompleksi sitoutuu tiettyihin DNA:n responssielementteihin ja transaktivoi tulikärpäsen lusiferaasigeenin, jolloin lusiferaasientsyymin solunsisäinen ilmentyminen lisääntyy. Lusiferiini-nimisen lusiferaasisubstraatin lisäämisen jälkeen lusiferiini muuntuu bioluminesoivaksi tuotteeksi. Tuotettu valo voidaan havaita ja kvantifioida helposti luminometrillä.

6. Testijärjestelmässä käytetään pysyvästi transfektoituja ERα CALUX -soluja. ERα CALUX -solut ovat peräisin ihmisen osteoblastisen osteosarkooman U2OS-solulinjasta. Ihmisen U2OS-soluja transfektoitiin pysyvästi 3xHRE-TATA-Luc:n ja pSG5-neo-hERα:n kanssa kalsiumfosfaatin yhteissaostus -menetelmää käyttäen. U2OS-solulinjan katsottiin olevan paras vaihtoehto estrogeenille (ja muille steroidihormoneille) herkäksi reportterisolulinjaksi, sillä U2OS-solulinjassa todettiin olevan vain vähän endogeenista reseptoriaktiivisuutta tai sitä ei ollut lainkaan. Endogeenisten reseptoreiden puuttumista selvitettiin käyttämällä ainoastaan lusiferaasireportteriplasmideja, joissa ei havaittu aktiivisuutta reseptorin ligandien lisäämisen jälkeen. Lisäksi tämä solulinja tuki voimakkaita hormonivälitteisiä vasteita, kun siihen lisättiin sukulaisreseptoreita tilapäisesti (2) (3) (8).

7. Kemikaalien estrogeenisen tai antiestrogeenisen vaikutuksen testaaminen ERα CALUX -solulinjalla sisältää esiseulonta-ajon ja laajoja ajoja. Esiseulonta-ajossa määritetään testikemikaalien liukoisuus, sytotoksisuus ja

▼M8

tarkempi pitoisuusalue laajaa testiä varten. Laajojen ajojen aikana testikemikaalien tarkennettuja pitoisuusalueita testataan ERα CALUX -biotesteillä, ja sen jälkeen testikemikaalit luokitellaan joko agonistisesti tai antagonisesti vaikuttaviksi.

8. Aineiston tulkintaperusteet on kuvattu yksityiskohtaisesti 59 kohdassa. Testikemikaalia pidetään agonismin kannalta positiivisena, jos vähintään kaksi testikemikaalin peräkkäistä pitoisuutta antaa vasteen, joka on yhtä suuri tai suurempi kuin 10 prosenttia vertailustandardi 17â-estradiolin suurimmasta vasteesta (PC_{10}). Testikemikaalia pidetään antagonismin kannalta positiivisena, jos vähintään kaksi testikemikaalin peräkkäistä pitoisuutta antaa vasteen, joka on yhtä suuri tai pienempi kuin 80 prosenttia vertailustandardi tamoksifeenin suurimmasta vasteesta (PC_{80}).

MENETTELY

Solulinjat

9. Testissä on käytettävä U2OS ERα CALUX -solulinjaa, jossa on pysyvästi transfektoituja soluja. Solulinjan voi hankkia BioDetection Systems BV:ltä (Amsterdam, Alankomaat) teknisellä lisenssisopimuksella.

10. Vain mykoplasmattomia soluviljelmiä tulisi käyttää. Käytettävissä soluerissä on joko oltava todistus siitä, että ne ovat mykoplasmakontaminaation osalta negatiivisia, tai niille on tehtävä mykoplasmatesti ennen käyttöä. Suositeltava menetelmä on RT-PCR (reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio), koska sillä mykoplasmainfektio havaitaan herkästi (9).

Solulinjan stabiilisuus

11. Jotta CALUX-solut säilyvät stabiileina ja ehyinä, niitä on säilytettävä nestemäisessä typessä (-80 °C). Kun solut on sulatettu uutta viljelmää varten, niitä on jatkoviljeltävä vähintään kahdesti, ennen kuin niitä käytetään kemikaalien estrogeeniagonistisen ja -antagonistisen vaikutuksen arvioinnissa. Soluja ei kuitenkaan tule kasvattaa yli 30:tä siirrostusta.

12. Jotta solulinjan stabiilisuutta voidaan valvoa pidemmällä aikavälillä, agonistisen ja antagonistisen testijärjestelmän herkkyys on varmennettava tarkistamalla vertailustandardin EC_{50}- tai IC_{50}-arvot. Lisäksi on seurattava positiivisen kontrollinäytteen ja negatiivisen kontrollinäytteen suhteellista induktiota. Tulosten on oltava ERα CALUX -biotestin agonistiosaa (taulukko 3C) tai antagonistiosaa (taulukko 4 C) koskevien hyväksymisperusteiden mukaiset. Agonistivaikutuksen osalta vertailustandardit sekä positiiviset ja negatiiviset kontrollit on esitetty taulukossa 1 ja antagonistivaikutuksen osalta taulukossa 2.

Soluviljelmä ja maljausolot

13. U2OS-solut on viljeltävä kasvatusaineessa (DMEM/F12 (1:1) -aine, jossa pH-indikaattorina on fenolipunainen, täydennettynä naudan sikiön verestä valmistetulla seerumilla (7,5 %), ei-välttämättömillä aminohapoilla (1 %) sekä penisilliinillä, streptomysiinillä ja genetisiinillä (G-418) valintamarkkerina (10 yksikköä/ml). Solut on laitettava hiilidioksidi-inkubaattoriin (5 % CO_2), ja lämpötilan pitää olla 37 °C ja ilmankosteuden 100 %. Kun solut saavuttavat 85–95 prosentin konfluenssin, ne on joko jatkoviljeltävä tai valmisteltava istutettaviksi 96-kuoppaisiin mikrotiitterilevyihin. Viime mainittujen osalta solut on uudelleensuspendoitava (1×10^5 solua/ml) estrogeenittomaan kasvatusaineeseen (DMEM/F12 (1:1) -aine ilman fenolipunaista, täydennettynä dekstraanilla päällystetyllä hiilellä käsitellyllä naudan sikiön verestä valmistetulla seerumilla (5 % v/v), ei-välttämättömillä aminohapoilla (1 % v/v) sekä penisilliinillä ja streptomysiinillä (10 yksikköä/ml) ja laitettava 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn kuoppiin (100 µl homogenisoitua solususpensiota). Soluja on esi-inkuboitava hiilidioksidi-inkubaattorissa (5 % CO_2, 37^0C, ilmankosteus 100 %) 24 tunnin ajan ennen altistusta. Muoviesineiden pitää olla estrogeenittomia.

▼M8

Hyväksymisperusteet

14. Testikemikaali(e)n agonistiset ja antagonistiset vaikutukset testataan testisarjoissa. Yksi testisarja koostuu enintään kuudesta mikrotiitterilevystä. Kukin testisarja sisältää vähintään yhden täyden sarjan laimennoksia vertailustandardista, positiivisen kontrollinäytteen, negatiivisen kontrollinäytteen ja liuotinkontrollit. Kuvissa 1 ja 2 näytetään levyn järjestys agonisti- ja antagonistitestisarjoissa.

15. Jokainen vertailustandardin laimennos, testikemikaalit, kaikki liuotinkontrollit sekä positiiviset ja negatiiviset kontrollit on analysoitava kolmena rinnakkaisnäytteenä. Kunkin kolmesta analyysista on täytettävä taulukossa 3A ja taulukossa 4A esitetyt vaatimukset.

16. Kokonainen sarja laimennoksia vertailustandardista (agonistitestissä 17β-estradioli; antagonistitestissä tamoksifeeni) mitataan kunkin testisarjan ensimmäiseltä levyltä. Jotta voidaan vertailla viiden muun mikrotiitterilevyn analyysituloksia ensimmäiseen mikrotiitterilevyyn, joka sisältää vertailustandardin koko pitoisuus-vastekäyrän, kaikilla levyillä on oltava kolme kontrollinäytettä: liuotinkontrolli, vertailustandardin suurin testattu pitoisuus ja vertailustandardin likimääräinen EC_{50}-pitoisuus (agonismi) tai IC_{50}-pitoisuus (antagonismi). Ensimmäisen levyn ja viiden muun levyn kontrollinäytteiden keskiarvon välisen suhteen on täytettävä taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti) esitetyt vaatimukset.

17. Jokaisesta testisarjan mikrotiitterilevystä lasketaan z-kerroin (10). Z-kerroin on laskettava käyttämällä vertailustandardin suurimpaan ja pienimpään pitoisuuteen liittyviä vasteita. Mikrotiitterilevyä pidetään validina, jos se täyttää taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti) esitetyt vaatimukset.

18. Vertailustandardin annos-vastekäyrän on oltava S-kirjaimen muotoinen. Vertailustandardin sarjalaimennoksiin aiheutuneesta vasteesta johdettujen EC_{50}- tai IC_{50}-arvon on täytettävä taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti) esitetyt vaatimukset.

19. Jokaisessa testisarjassa on oltava positiivinen ja negatiivinen kontrollinäyte. Sekä positiivisen että negatiivisen kontrollinäytteen lasketun suhteellisen induktion on täytettävä taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti) esitetyt vaatimukset.

20. Kaikissa mittauksissa vertailustandardin suurimman pitoisuuden induktiokerroin on mitattava jakamalla keskimäärin suurin 17β-estradioli-vertailustandardin suhteellinen valoyksikkö (RLU) -vaste vertailuliuotinkontrollin RLU-vasteen keskiarvolla. Tämän induktiokertoimen on täytettävä sitä koskevat vähimmäisvaatimukset, jotka on esitetty taulukossa 3C (agonistitesti) tai taulukossa 4C (antagonistitesti).

21. Vain edellä mainitut hyväksymisperusteet täyttävät mikrotiitterilevyt katsotaan valideiksi, ja niitä voidaan käyttää testikemikaalien vasteen arvioimisessa.

22. Hyväksymisperusteita sovelletaan sekä esiseulonta-ajoihin että laajoihin ajoihin.

▼M8

Taulukko 1

Vertailustandardin, positiivisen kontrollin ja negatiivisen kontrollin pitoisuudet agonistisessa CALUX-biotestissä

	Aine	CAS-nro	Testipitoisuusalue (M)
Vertailustandardi	17ß-estradioli	50-28-2	$1*10^{-13}$ – $1*10^{-10}$
Positiivinen kontrolli (PK)	17α-metyylitestosteroni	58-18-4	$3*10^{-6}$
Negatiivinen kontrolli (NK)	Kortikosteroni	50-22-6	$1*10^{-8}$

Taulukko 2

Vertailustandardin, positiivisen kontrollin ja negatiivisen kontrollin pitoisuudet antagonistisessa CALUX-biotestissä

	Aine	CAS-nro	Testipitoisuusalue (M)
Vertailustandardi	Tamoksifeeni	10540-29-1	$3*10^{-9}$ – $1*10^{-05}$
Positiivinen kontrolli (PK)	4-hydroksitamoksifeeni	68047-06-3	$1*10^{-9}$
Negatiivinen kontrolli (NK)	Resveratroli	501-36-0	$1*10^{-5}$

Taulukko 3

Agonistisen ERα CALUX -biotestin hyväksymisperusteet

A – yksittäiset näytteet levyllä		**Peruste**
1	Kolmen rinnakkaisnäytekuopan suurin %SD (NK, PK, testikemikaalin ja vertailustandardin kukin laimennos paitsi C0)	< 15 %
2	Kolmen rinnakkaisnäytekuopan suurin %SD (vertailustandardi ja testikemikaalin liuotinkontrollit (C0, LK))	< 30 %
3	LDH:n enimmäisvuoto sytotoksisuuden mittarina.	< 120 %
B – yhdellä mikrotiitterilevyllä		
4	Vertailustandardin liuotinkontrollin (C0; levy 1) ja testikemikaalin liuotinkontrollin (LK; levyt 2–x) suhde	0,5–2,0
5	Likim. EC50-arvon ja levyn 1 suurimpien vertailustandardipitoisuuksien sekä likim. EC50-arvon ja levyjen 2–x suurimpien vertailustandardipitoisuuksien (C4, C8) suhde	0,70–1,30
6	Z-kerroin kullekin levylle	> 0,6
C – yhdessä analyysisarjassa (kaikki levyt yhdessä sarjassa)		
7	Vertailustandardin S-käyrä	Kyllä (17ß-estradioli)
8	EC50-alue, vertailustandardi 17ß-estradioli	$4*10^{-12}$ – $4*10^{-11}$ M
9	Suurimman 17ß-estradiolipitoisuuden pienin induktiokerroin vertailustandardin liuotinkontrolliin nähden.	5
10	Suhteellinen induktio (%), PK	> 30 %
11	Suhteellinen induktio (%), NK	< 10 %

▼M8

Likim.: likimääräinen; PK: positiivinen kontrolli; NK: negatiivinen kontrolli; LK: testikemikaalin liuotinkontrolli; C0: vertailustandardin liuotinkontrolli; SD: keskihajonta; LDH: laktaattidehydrogenaasi.

Taulukko 4

Antagonistisen ERα CALUX -biotestin hyväksymisperusteet

A – yksittäiset näytteet levyllä		**Peruste**
1	Kolmen rinnakkaisnäytekuopan suurin %SD (NK, PK, testikemikaalin ja vertailustandardin kukin laimennos, liuotinkontrolli (C0))	< 15 %
2	Kolmen rinnakkaisnäytekuopan suurin %SD (kantaja-ainekontrollista (KK) ja suurimmasta vertailustandardipitoisuudesta (C8))	< 30 %
3	LDH:n enimmäisvuoto sytotoksisuuden mittarina.	< 120 %
B – yhdellä mikrotiitterilevyllä		
4	Vertailustandardin liuotinkontrollin (C0; levy 1) ja testikemikaalin liuotinkontrollin (LK; levyt 2–x) suhde	0,70–1,30
5	Levyn 1 likim. IC50-vertailustandardipitoisuuksien sekä levyjen 2–x likim. IC50-vertailustandardipitoisuuksien (C4) suhde	0,70–1,30
6	Levyn 1 suurimpien vertailustandardipitoisuuksien ja levyjen 2–x suurimpien vertailustandardipitoisuuksien (C8) suhde	0,50–2,0
7	Z-kerroin kullekin levylle	> 0,6
C – yhdessä analyysisarjassa (kaikki levyt yhdessä sarjassa)		
8	Vertailustandardin S-käyrä	Kyllä (tamoksifeeni)
9	IC50-alue, vertailustandardi (tamoksifeeni)	$1*10^{-8}$ - $1*10^{-7}$ M
10	Vertailustandardin liuotinkontrollin pienin induktiokerroin suurimpaan tamoksifeenipitoisuuteen nähden.	2,5
11	Suhteellinen induktio (%), PK	< 70 %
12	Suhteellinen induktio (%), NK	> 85 %

Likim.: likimääräinen; PK: positiivinen kontrolli; NK: negatiivinen kontrolli; KK: kantaja-ainekontrolli (liuotinkontrolli ilman kiinteää pitoisuutta agonistista vertailustandardia); LK: testikemikaalin liuotinkontrolli; C0: vertailustandardin liuotinkontrolli; SD: keskihajonta; LDH: laktaattidehydrogenaasi.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli, vertailustandardit, positiiviset kontrollit, negatiiviset kontrollit

23. Esiseulonta-ajossa ja laajassa ajoissa on käytettävä samaa liuotin-/kantaja-ainekontrollia, vertailustandardeja, positiivisia kontrolleja ja negatiivisia kontrolleja. Lisäksi vertailustandardien sekä positiivisten ja negatiivisten kontrollien pitoisuus tulee olla sama.

▼**M8**

Liuotinkontrolli

24. Liuotin, jota on käytetty testikemikaalien liuottamiseen, on testattava liuotinkontrollina. ERα CALUX -biotestin validoinnissa käytettiin kantaja-aineena dimetyylisulfoksidia (DMSO, 1 % (v/v); CAS-nro 67-68-5). Jos käytetään muuta liuotinta kuin DMSO:ta, kaikki vertailustandardit, kontrollit ja testikemikaalit on testattava samassa kantaja-aineessa. On huomattava, että antagonistitutkimuksen liuotinkontrolli sisältää kiinteän pitoisuuden agonistivertailustandardia (17β-estradioli) (suurin piirtein EC_{50}-pitoisuus). Antagonistitutkimuksessa käytettävän liuottimen testaamiseksi on valmistettava ja testattava kantaja-ainekontrolli.

Kantaja-ainekontrolli (antagonistitesti)

25. Antagonistitutkimuksen testiliuosta täydennetään kiinteällä pitoisuudella agonistivertailustandardia (17β-estradioli) (suurin piirtein EC_{50}-pitoisuus). Kun halutaan testata antagonistitutkimuksessa testikemikaalien liuottamiseksi käytettävää liuotinta, on valmistettava testiliuos, joka ei sisällä kiinteää pitoisuutta agonistivertailustandardia (17β-estradioli). Tämä kontrollinäyte on tarkoitettu kantaja-ainekontrolliksi. ERα CALUX -biotestin validoinnissa käytettiin kantaja-aineena dimetyylisulfoksidia (DMSO, 1 % (v/v); CAS-nro 67-68-5). Jos käytetään muuta liuotinta kuin DMSO:ta, kaikki vertailustandardit, kontrollit ja testikemikaalit on testattava samassa kantaja-aineessa.

Vertailustandardit

26. Agonistivertailustandardi on 17β-estradioli (taulukko 1). Vertailustandardit koostuvat sarjasta 17β-estradiolin kahdeksan pitoisuuden laimennoksia ($1*10^{-13}$, $3*10^{-13}$, $1*10^{-12}$, $3*10^{-12}$, $6*10^{-12}$, $1*10^{-11}$, $3*10^{-11}$, $1*10^{-10}$ M).

27. Antagonistivertailustandardi on tamoksifeeni (taulukko 2). Vertailustandardit koostuvat sarjasta tamoksifeenin kahdeksan pitoisuuden laimennoksia ($3*10^{-09}$, $1*10^{-08}$, $3*10^{-08}$, $1*10^{-07}$, $3*10^{-07}$, $1*10^{-06}$, $3*10^{-06}$, $1*10^{-05}$ M). Jokainen antagonistivertailustandardin pitoisuus inkuboidaan yhdessä agonistivertailustandardin, 17β-estradiolin, kiinteän pitoisuuden kanssa ($3*10^{-12}$ M).

Positiivinen kontrolli

28. Agonistitutkimuksessa positiivisena kontrollina on 17α-metyylitestosteroni (taulukko 1).

29. Antagonistitutkimuksessa positiivisena kontrollina on 4-hydroksitamoksifeeni (taulukko 2). Antagonistinen positiivinen kontrolli inkuboidaan yhdessä agonistivertailustandardin, 17β-estradiolin, kiinteän pitoisuuden kanssa ($3*10^{-12}$ M).

Negatiivinen kontrolli

30. Agonistitutkimuksessa negatiivisena kontrollina on kortikosteroni (taulukko 1).

31. Antagonistitutkimuksessa negatiivisena kontrollina on resveratroli (taulukko 2). Antagonistinen negatiivinen kontrolli inkuboidaan yhdessä agonistivertailustandardin, 17β-estradiolin, kiinteän pitoisuuden kanssa ($3*10^{-12}$ M).

▼M8

Laboratorion pätevyyden osoittaminen (ks. 14 kohta sekä taulukot 3 ja 4 tämän testimenetelmän kohdassa ER TA -TESTIN OSAT).

Kantaja-aine

32. Testikemikaalien liuottamisessa käytetyn liuottimen pitäisi liuottaa testikemikaali kokonaan, ja sen täytyy olla sekoitettavissa solujen kasvatusaineeseen. Sopivia liuottimia ovat DMSO, vesi ja etanoli (puhtaus 95–100 %). Jos liuottimena käytetään DMSO:ta, sen enimmäispitoisuus inkuboinnin aikana saa olla 1 % (v/v). Ennen liuottimen käyttöä on varmistettava testaamalla, ettei se ole sytotoksinen ja ettei se häiritse testin tekemistä.

Vertailustandardien, positiivisten ja negatiivisten kontrollien sekä testikemikaalien valmistelu

33. Vertailustandardit, positiiviset ja negatiiviset kontrollit sekä testikemikaalit liuotetaan 100-prosenttiseen DMSO:hon (tai muuhun asianmukaiseen liuottimeen). Asianmukaiset (sarja)laimennokset on valmistettava samalla liuottimella. Ennen liuottamista kaikkien aineiden on annettava tasapainottua huoneenlämpötilassa. Tuoreissa vertailustandardien, positiivisten ja negatiivisten kontrollien sekä testikemikaalien kantaliuoksissa ei saa olla huomattavaa saostumista tai sameutta. Vertailustandardien ja kontrollien kantaliuokset voidaan valmistaa bulkkiliuoksina. Testikemikaaleista on valmistettava tuoreet kantaliuokset ennen kutakin koetta. Vertailustandardien, positiivisten ja negatiivisten kontrollien sekä testikemikaalien lopulliset laimennokset on valmistettava tuoreeltaan jokaiseen kokeeseen ja käytettävä 24 tunnin kuluessa valmistamisesta.

Liukoisuus, sytotoksisuus ja annoksenmääritys

34. Esiseulonta-ajossa määritetään testikemikaalien liukoisuus valitussa liuottimessa. Sitä varten valmistetaan kantaliuos, jonka enimmäiskonsentraatio on 0,1 M. Jos tämän pitoisuuden yhteydessä esiintyy liukoisuusongelmia, on valmistettava laimeampia kantaliuoksia, kunnes testikemikaalit liukenevat täysin. Esiseulonta-ajossa testataan 1:10-sarjalaimennoksia testikemikaalista. Agonisti- tai antagonistitestissä testin enimmäiskonsentraatio on 1 mM. Esiseulonnan perusteella testikemikaaleille johdetaan asianmukainen tarkennettu pitoisuusalue, joka on testattava laajojen ajojen aikana. Laajassa testauksessa käytettävien laimennosten tulee olla 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x ja 3000x.

35. Agonisti- ja antagonistitestiprotokollaan sisältyy sytotoksisuuden testaus (11). Se sisältyy myös sekä esiseulonta-ajoon että laajoihin ajoihin. ERα CALUX -biotestin validoinnin aikana sytotoksisuuden arvioimisessa käytetty menetelmä oli laktaattidehydrogenaasin (LDH:n) vuototesti yhdistettynä solujen laadulliseen silmämääräiseen tarkastukseen (ks. lisäys 4.1) testikemikaaleille altistamisen jälkeen. Myös muita sytotoksisuuden määrittämiseen tarkoitettuja kvantitatiivisia menetelmiä (esimerkiksi tetratsoliumpohjainen (MTT) kolorimetrinen menetelmä tai sytotoksisuuden CALUX-biotesti) voidaan käyttää. Yleensä testikemikaalipitoisuuksia, joiden yhteydessä solujen elinkyky pienenee yli 20 prosenttia, pidetään sytotoksisina, eikä niitä voida siksi käyttää aineiston analysoinnissa. LDH-vuototestin osalta testikemikaalin pitoisuutta pidetään sytotoksisena, jos LDH-vuoto on yli 120 prosenttia.

▼M8

Testikemikaalille altistus ja testilevyn järjestäminen

36. Sen jälkeen, kun viljellyt solut on trypsinoitu konfluentista pullosta, ne uudelleensuspendoidaan tiheyteen 1×10^5 solua/ml estrogeenittomaan kasvatusliuokseen. 100 µl uudelleensuspendoituja soluja maljataan 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn sisempiin kuoppiin. Ulompiin kuoppiin laitetaan 200 µl fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS:ää) (ks. kuvat 1 ja 2). Maljattuja soluja esi-inkuboidaan hiilidioksidi-inkubaattorissa (5 % CO_2, 37°C, ilmankosteus 100 %) 24 tunnin ajan.

37. Esi-inkuboinnin jälkeen levyistä tutkitaan silminnähtävä sytotoksisuus (ks. lisäys 4.1), kontaminaatio ja konfluenssi. Testauksessa käytetään vain levyjä, joissa ei ole silminnähtävää sytotoksisuutta eikä kontaminaatiota ja joiden konfluenssi on vähintään 85 prosenttia. Sisempien kuoppien aine poistetaan varovasti ja sen tilalle laitetaan 200 µl estrogeenitonta testiliuosta, joka sisältää asianmukaiset laimennossarjat vertailustandardeista, testikemikaaleista, positiivisista ja negatiivisista kontrolleista sekä liuotinkontrolleista (taulukko 5: agonistitutkimukset; taulukko 6: antagonistitutkimukset). Kaikki vertailustandardit, testikemikaalit, positiiviset ja negatiiviset kontrollit sekäliuotinkontrollit testataan kolmena rinnakkaisnäytteenä. Kuvassa 1 esitetään levyn järjestys agonistitestissä. Kuvassa 2 esitetään levyn järjestys antagonistitestissä. Levyn järjestys esiseulontatestissä ja laajassa testissä on sama. Antagonistitestissä kaikki sisemmät kuopat (paitsi kantaja-ainekontrollin kuopat) sisältävät myös kiinteän pitoisuuden agonistivertailustandardia, 17β-estradiolia ($3*10^{-12}$ M). Jokaiselle testikemikaalilevylle on lisättävä vertailustandardit C8 ja C4.

38. Kun solut on altistettu kaikille kemikaaleille, 96-kuoppaisia mikrotiitterilevyjä on inkuboitava toiset 24 tuntia hiilidioksidi-inkubaattorissa (5 % CO_2, 37°C, ilmankosteus 100 %).

Kuva 1

96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen järjestys esiseulonnassa ja agonistisen vaikutuksen arvioinnissa.

Levy 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
E		LK	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
F		LK	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
G		LK	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK	
H												

Seuraavat levyt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
C		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
D		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8	
E		LK	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
F		LK	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
G		LK	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC50)	
H												

C0 = vertailustandardiliuotin.

C(1–8) = vertailustandardin sarjalaimennokset (1–8, pitoisuudet pienimmästä suurimpaan).

▼M8

PK = positiivinen kontrolli.

NK = negatiivinen kontrolli.

TCx-(1–8) = testikemikaalin laimennokset (1–8, pitoisuudet pienimmästä suurimpaan) esiseulonta-ajossa ja testikemikaalin x agonistisen vaikutuksen arvioinnissa.

LK = testikemikaalin liuotinkontrolli (mieluiten sama liuotin kuin C0:ssa mutta mahdollisesti toisesta erästä).

Harmaat solut: = ulommat kuopat, joihin on laitettu 200 µl PBS:ää.

Kuva 2

96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen järjestys antagonistitestin esiseulonnassa ja antagonistisen vaikutuksen arvioinnissa.

Levy 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	KK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	KK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	KK	
E		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
F		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
G		NK	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
H												

Seuraavat levyt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
C		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
D		LK	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (maks.)	
E		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
F		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
G		C4 (IC50)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (maks.)	
H												

C0 = vertailustandardiliuotin.

C(1–8) = vertailustandardin sarjalaimennokset (1–8, pitoisuudet pienimmästä suurimpaan).

NK = negatiivinen kontrolli.

PK = positiivinen kontrolli.

TCx-(1–8) = testikemikaalin laimennokset (1–8, pitoisuudet pienimmästä suurimpaan) esiseulonta-ajossa ja testikemikaalin x agonistisen vaikutuksen arvioinnissa.

LK = testikemikaalin liuotinkontrolli (mieluiten sama liuotin kuin C0:ssa mutta mahdollisesti toisesta erästä).

KK = kantaja-ainekontrolli (liuotinkontrolli ilman kiinteää pitoisuutta agonistista vertailustandardia, 17β-estradiolia).

Harmaat solut: = ulommat kuopat, joihin on laitettu 200 µl PBS:ää.

Huom.: Kaikki sisemmät kuopat (paitsi kantaja-ainekontrollin kuopat) sisältävät myös kiinteän pitoisuuden agonistivertailustandardia, 17β-estradiolia ($3*10^{-12}$ M).

Luminesenssin mittaaminen

39. Luminesenssin mittaaminen kuvataan yksityiskohtaisesti agonisti- ja antagonistitestin protokollassa (10). Kuopissa oleva aine pitää poistaa, ja soluja on lyysattava inkubaation jälkeen 24 tunnin ajan, jotta solukalvo avautuu ja lusiferaasin aktiivisuus voidaan mitata.

▼**M8**

40. Tässä menettelyssä luminesenssin mittaamiseen tarvitaan luminometri, jossa on kaksi injektoria. Lusiferaasireaktio aloitetaan injektoimalla lusiferiinisubstraatti. Reaktio pysäytetään lisäämällä 0,2 M NaOH:ta. Reaktio pysäytetään, jotta estetään luminesenssin siirtyminen yhdestä kuopasta toiseen.

41. Jokaisen kuopan valoemissio ilmoitetaan myös suhteellisina valoyksikköinä kuoppaa kohti.

Esiseulonta-ajo

42. Esiseulonnan analyysitulosten avulla määritetään testikemikaalien tarkennettu pitoisuusalue laajaan testiin. Esiseulonnan analyysitulosten arviointi ja testikemikaalien tarkennetun pitoisuusalueen määrittäminen laajaan testiin kuvataan perusteellisesti agonisti- ja antagonistitestin protokollassa (10). Tässä esitetään vain lyhyt yhteenveto menettelyistä, joilla määritetään testikemikaalien pitoisuusalue agonisti- ja antagonistitesteihin. Katso taulukoista 5 ja 6 ohjeet sarjalaimennuksesta.

Pitoisuuksien valinta agonististen vaikutusten arviointiin

43. Esiseulonta-ajossa on tarkoitus testata testikemikaalit käyttämällä sarjalaimennuksia taulukossa 5 (agonistitesti) ja taulukossa 6 (antagonistitesti) esitetyn mukaisesti. Kaikki pitoisuudet on testattava kolmessa kuopassa kuvassa 1 (agonistitesti) tai kuvassa 2 (antagonistitesti) esitetyn järjestyksen mukaisesti.

44. Vain analyysitulokset, jotka täyttävät hyväksymisperusteet (taulukko 3), katsotaan valideiksi, ja niitä voidaan käyttää testikemikaalien vasteen arvioimisessa. Jos yksi tai useampi analyysisarjan mikrotiitterilevyistä ei täytä hyväksymisperusteita, kyseiset levyt on analysoitava uudelleen. Jos ensimmäinen levy, joka sisältää koko laimennossarjan vertailustandardista, ei täytä hyväksymisperusteita, koko testisarja (kuusi levyä) on analysoitava uudelleen.

45. Testikemikaalien alustavia pitoisuusalueita on mukautettava ja esiseulonta-ajo on toistettava, jos

— sytotoksisuutta havaitaan. Esiseulontamenettely on toistettava testikemikaalin pienemmillä pitoisuuksilla, jotka eivät ole sytotoksisia.

— testikemikaalin esiseulonnasta ei saada täydellistä annos-vastekäyrää, koska testatut pitoisuudet tuottavat maksimi-induktion. Esiseulonta-ajo on toistettava käyttämällä pienempiä pitoisuuksia testikemikaalista.

46. Kun havaitaan validi annokseen liittyvä vaste, on valittava (pienin) pitoisuus, jolla havaitaan maksimi-induktio ja jolla sytotoksisuutta ei ilmene. Laajoissa ajoissa testattavan testikemikaalin suurimman pitoisuuden tulee olla kolme kertaa tämä valittu pitoisuus.

47. Testikemikaalista on tehtävä täydellinen tarkennettu laimennussarja taulukossa 5 esitettyjen laimennusvaiheiden mukaisesti aloittaen suurimmalla pitoisuudella, kuten edellä on määritetty.

▼M8

48. Testikemikaali, joka ei aiheuta agonistista vaikutusta, on testattava laajoissa ajoissa aloittamalla esiseulonnan aikana määritetystä suurimmasta ei-sytotoksisesta pitoisuudesta.

Pitoisuuksien valinta antagonististen vaikutusten arviointiin

49. Vain analyysitulokset, jotka täyttävät hyväksymisperusteet (taulukko 4), katsotaan valideiksi, ja niitä voidaan käyttää testikemikaalien vasteen arvioimisessa. Jos yksi tai useampi analyysisarjan mikrotiitterilevyistä ei täytä hyväksymisperusteita, kyseiset levyt on analysoitava uudelleen. Jos ensimmäinen levy, joka sisältää koko laimennossarjan vertailustandardista, ei täytä hyväksymisperusteita, koko testisarja (kuusi levyä) on analysoitava uudelleen.

50. Testikemikaalien alustavia pitoisuusalueita on mukautettava ja esiseulonta-ajo on toistettava, jos

— sytotoksisuutta havaitaan. Esiseulontamenettely on toistettava testikemikaalin pienemmillä pitoisuuksilla, jotka eivät ole sytotoksisia.

— testikemikaalin esiseulonnasta ei saada täydellistä annos-vastekäyrää, koska testatut pitoisuudet tuottavat maksimi-inhibition. Esiseulonta on toistettava käyttämällä pienempiä pitoisuuksia testikemikaalista.

51. Kun todetaan validi annokseen liittyvä vaste, on valittava (pienin) pitoisuus, jolla havaitaan maksimi-inhibitio ja jolla sytotoksisuutta ei ilmene. Laajoissa ajoissa testattavan testikemikaalin suurimman pitoisuuden tulee olla kolme kertaa tämä valittu pitoisuus.

52. Testikemikaalista on tehtävä täydellinen tarkennettu laimennussarja taulukossa 6 esitettyjen laimennusvaiheiden mukaisesti aloittaen suurimmalla pitoisuudella, kuten edellä on määritetty.

53. Testikemikaalit, jotka eivät aiheuta antagonistista vaikutusta, on testattava laajoissa ajoissa aloittamalla esiseulonnan aikana testatusta suurimmasta ei-sytotoksisesta pitoisuudesta.

Laajat ajot

54. Kun tarkennetut pitoisuusalueet on valittu, testikemikaalit on testattava perusteellisesti käyttämällä sarjalaimennuksia taulukossa 5 (agonistitesti) ja taulukossa 6 (antagonistitesti) esitetyn mukaisesti. Kaikki pitoisuudet on testattava kolmessa kuopassa kuvassa 1 (agonistitesti) tai kuvassa 2 (antagonistitesti) esitetyn järjestyksen mukaisesti.

55. Vain analyysitulokset, jotka täyttävät hyväksymisperusteet (taulukot 3 ja 4), katsotaan valideiksi, ja niitä voidaan käyttää testikemikaalien vasteen arvioimisessa. Jos yksi tai useampi analyysisarjan mikrotiitterilevyistä ei täytä hyväksymisperusteita, kyseiset levyt on analysoitava uudelleen. Jos ensimmäinen levy, joka sisältää koko laimennossarjan vertailustandardista, ei täytä hyväksymisperusteita, koko testisarja (kuusi levyä) on analysoitava uudelleen.

▼**M8**

Taulukko 5

Agonistitestissä käytettyjen vertailustandardien, kontrollien ja testikemikaalien pitoisuus ja laimennokset

Vertailus. 17β-estradioli		TCx - esiseulonta-ajo		TCx - laaja ajo		Kontrollit	
conc. (M)		Laimennus		Laimennus		conc. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PK	$3*10^{-06}$
C1	$1*10^{-13}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NK	$1*10^{-08}$
C2	$3*10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1*10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	LK	0
C4	$3*10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6*10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1*10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3*10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1*10^{-10}$						

TCx – testikemikaali x
PK – positiivinen kontrolli (17α-metyylitestosteroni)
NK – negatiivinen kontrolli (kortikosteroni)
C0 – vertailustandardin liuotinkontrolli
LK – testikemikaalin liuotinkontrolli

▼**M8**

Taulukko 6

Antagonistitestissä käytettyjen vertailustandardien, kontrollien ja testikemikaalien pitoisuus ja laimennokset

Vertailus. tamoksifeeni		TCx - esiseulonta-ajo		TCx - laaja ajo		Kontrollit	
pit. (M)		Laimennus		Laimennus		pit. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PK	$1*10^{-09}$
C1	$3*10^{-09}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NK	$1*10^{-05}$
C2	$1*10^{-08}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3*10^{-08}$	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	LK	0
C4	$1*10^{-07}$	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3*10^{-07}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	**Täydennetty agonisti**	
C6	$1*10^{-06}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	**pit. (M)**	
C7	$3*10^{-06}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17ß-estradioli	$3*10^{-12}$
C8	$1*10^{-05}$						

TCx – testikemikaali x

PK – positiivinen kontrolli (4-hydroksitamoksifeeni)

NK – negatiivinen kontrolli (resveratroli)

C0 – vertailustandardin liuotinkontrolli

LK – testikemikaalin liuotinkontrolliKK – kantaja-ainekontrolli (ei sisällä kiinteää pitoisuutta agonistista vertailustandardia 17β-estradiolia ($3*10^{-12}$ M)

▼M8

Tietojen keruu ja analysointi

56. Esiseulonta-ajon ja laajan ajon jälkeen on määritettävä testikemikaalin EC_{10}-, EC_{50}-, PC_{10}- ja PC_{50}-arvot ja maksimi-induktio (TCx_{max}) agonistitestin osalta. Antagonistitestissä on laskettava IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50} ja minimi-induktio (TCx_{min}). Kuvassa 3 (agonistitesti) ja kuvassa 4 (antagonistitesti) nämä parametrit on esitetty graafisesti. Tarvittavat parametrit lasketaan jokaisen testikemikaalin suhteellisen induktion perusteella (suhteessa vertailustandardin maksimi-induktioon (= 100 %)). Tietojen arvioinnissa on käytettävä epälineaarista regressiota (vaihteleva kerroin, 4 parametria) seuraavan yhtälön mukaan:

$$Y = Ylin + \frac{(\mathrm{Ylin} - \mathrm{Alin})}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) \times Hill\ Slope})}$$

Jossa:

X = annoksen tai pitoisuuden logaritmi

Y = vaste (suhteellinen induktio (%))

Ylin = maksimi-induktio (%)

Alin = minimi-induktio (%)

$LogEC_{50}$ = sen pitoisuuden logaritmi, jolla havaitaan 50 prosenttia maksimivasteesta

HillSlope = Hillslope tai kulmakerroin

57. Luminometrin raakatiedot, jotka ilmoitetaan suhteellisina valoyksikköinä (RLU), on siirrettävä taulukkolaskentamalliin, joka on laadittu esiseulontaa ja laajaa ajoa varten. Raakatietojen on täytettävä hyväksymisperusteet, jotka on esitetty taulukossa 3A ja 3B (agonistitesti) tai 4A ja 4B (antagonistitesti). Jos raakatiedot täyttävät hyväksymisperusteet, tarvittavat parametrit määritetään seuraavilla laskutoimituksilla:

Agonistitesti

— Vähennä vertailustandardin liuotinkontrollin keskimääräinen RLU vertailustandardien kaikista raaka-analyysitiedoista.

— Vähennä testikemikaalin liuotinkontrollin keskimääräinen RLU testikemikaalien kaikista raaka-analyysitiedoista.

— Laske suhteellinen induktio vertailustandardin jokaisesta pitoisuudesta. Aseta vertailustandardin suurimman pitoisuuden induktion arvoksi 100 %.

— Laske testikemikaalin jokaisen pitoisuuden suhteellinen induktio verrattuna vertailustandardin suurimpaan pitoisuuteen, joka on 100 %.

— Arvioi analyysin tulokset epälineaarisen regression (vaihteleva kulmakerroin, 4 parametria) kannalta.

▼**M8**

— Määritä vertailustandardin EC_{50}- ja EC_{10}-arvo.

— Määritä testikemikaalien EC_{50}- ja EC_{10}-arvot.

— Määritä testikemikaalin suurin suhteellinen induktio (TC_{max}).

— Määritä testikemikaalien PC_{10}- ja PC_{50}-arvot.

Testikemikaalien osalta täydellistä annos-vastekäyrää ei aina saavuteta esimerkiksi sytotoksisuuteen tai liukoisuuteen liittyvien ongelmien vuoksi. Tällöin EC_{50}-, EC_{10}- ja PC_{50}-arvoja ei voida määrittää. Näissä tapauksissa voidaan määrittää vain PC_{10} ja TC_{max}.

Antagonistitesti

— Vähennä vertailustandardin suurimman pitoisuuden keskimääräinen RLU vertailustandardien kaikista raaka-analyysitiedoista.

— Vähennä vertailustandardin suurimman pitoisuuden keskimääräinen RLU testikemikaalien kaikista raaka-analyysitiedoista.

— Laske suhteellinen induktio vertailustandardin jokaisesta pitoisuudesta. Aseta vertailustandardin pienimmän pitoisuuden induktion arvoksi 100 %.

— Laske testikemikaalin jokaisen pitoisuuden suhteellinen induktio verrattuna vertailustandardin pienimpään pitoisuuteen, joka on 100 %.

— Arvioi analyysin tulokset epälineaarisen regression (vaihteleva kulmakerroin, 4 parametria) kannalta.

— Määritä vertailustandardin IC_{50}- ja IC_{20}-arvo.

— Määritä testikemikaalien IC_{50}- ja IC_{20}-arvot.

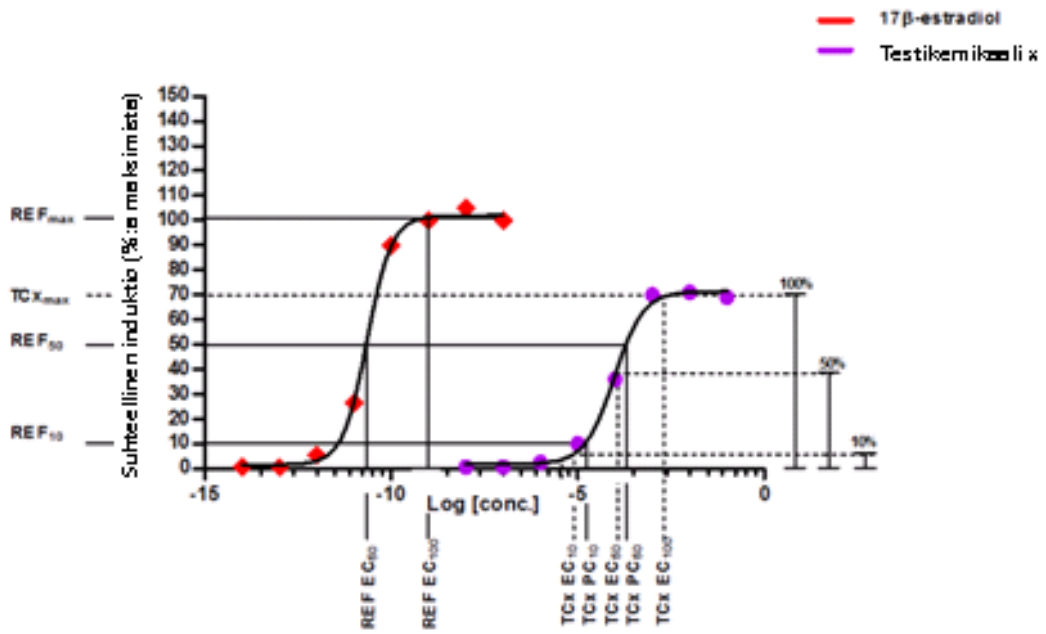
— Määritä testikemikaalin pienin suhteellinen induktio (TC_{min}).

— Määritä testikemikaalien PC_{80}- ja PC_{50}-arvot.

▼M8

Kuva 3

Yhteenveto agonistitestissä määritetyistä parametreista



EC_{10} = aineen pitoisuus, jolla havaitaan 10 prosenttia sen maksimivasteesta.

EC_{50} = aineen pitoisuus, jolla havaitaan 50 prosenttia sen maksimivasteesta.

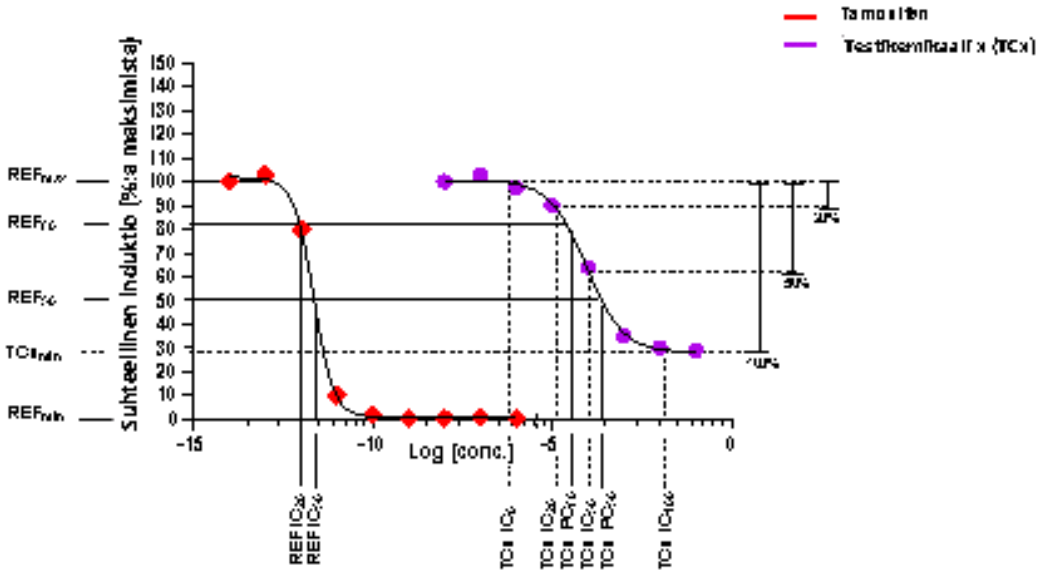
PC_{10} = testikemikaalin pitoisuus, jolla sen vaste on yhtä kuin vertailustandardin EC_{10}-arvo.

PC_{50} = testikemikaalin pitoisuus, jolla sen vaste on yhtä kuin vertailustandardin EC_{50}-arvo.

TCx_{max} = testikemikaalin suurin suhteellinen induktio.

Kuva 4

Yhteenveto antagonistitestissä määritetyistä parametreista



IC20 = aineen pitoisuus, jolla havaitaan 80 prosenttia sen maksimivasteesta (20 prosentin inhibitio).

▼**M8**

IC50 = aineen pitoisuus, jolla havaitaan 50 prosenttia sen maksimivasteesta (50 prosentin inhibitio).

PC80 = testikemikaalin pitoisuus, jolla sen vaste on yhtä kuin vertailustandardin IC20-arvo.

PC50 = testikemikaalin pitoisuus, jolla sen vaste on yhtä kuin vertailustandardin IC50-arvo.

TCxmin = testikemikaalin pienin suhteellinen induktio.

Testikemikaalien osalta täydellistä annos-vastekäyrää ei aina saavuteta esimerkiksi sytotoksisuuteen tai liukoisuuteen liittyvien ongelmien vuoksi. Tällöin IC_{50}-, IC_{20}- ja PC_{50}-arvoja ei voida määrittää. Näissä tapauksissa voidaan määrittää vain PC_{20} ja TC_{min}.

58. Tulosten tulee perustua kahteen (tai kolmeen) riippumattomaan testiajoon. Jos kahdesta ajosta saadaan vertailukelpoiset ja siten toistettavat tulokset, kolmatta ajoa ei tarvitse tehdä. Jotta tulokset olisivat hyväksyttäviä, niiden on

— täytettävä hyväksymisperusteet (ks. hyväksymisperusteet 14–22 kohdasta)

— oltava toistettavissa.

Aineiston tulkintaperusteet

59. Aineiston tulkinnassa ja päätettäessä, katsotaanko testikemikaali positiiviseksi vai negatiiviseksi, tulee käyttää seuraavia perusteita:

Agonistitesti

Jokaisessa laajassa ajossa testikemikaali katsotaan **positiiviseksi**, jos

1 TC_{max} on yhtä suuri tai 10 prosenttia suurempi kuin vertailustandardin maksimivaste (REF_{10}).

2 Vähintään kaksi testikemikaalin peräkkäistä pitoisuutta ovat yhtä suuria tai suurempia kuin REF_{10}.

Jokaisessa laajassa ajossa testikemikaali katsotaan **negatiiviseksi**, jos

1 TC_{max} on korkeintaan 10 prosenttia suurempi kuin vertailustandardin maksimivaste (REF_{10}).

2 Vähemmän kuin kaksi testikemikaalin pitoisuutta ovat yhtä suuria tai suurempia kuin REF_{10}.

Antagonistitesti

Jokaisessa laajassa ajossa testikemikaali katsotaan **positiiviseksi**, jos

1 TC_{min} on yhtä suuri tai pienempi kuin 80 prosenttia vertailustandardin maksimivasteesta (REF_{80} = 20 prosentin inhibitio).

2 Vähintään kaksi testikemikaalin peräkkäistä pitoisuutta ovat yhtä suuria tai pienempiä kuin kuin REF_{80}.

▼**M8**

Jokaisessa laajassa ajossa testikemikaali katsotaan **negatiiviseksi**, jos

1 TC_{min} on suurempi kuin 80 prosenttia vertailustandardin maksimivasteesta (REF_{80} = 20 prosentin inhibitio).

2 Vähemmän kuin kaksi testikemikaalin pitoisuutta ovat yhtä suuria tai pienempiä kuin REF_{80}.

60. Testikemikaalin positiivisen vasteen voimakkuuden luonnehtimiseksi on ilmoitettava vaikutuksen suuruusluokka (agonistitesti: TC_{max}; antagonistitesti: TC_{min}) ja pitoisuus, jolla vaikutus ilmaantuu (agonistitesti: EC_{10}, EC_{50}, PC_{10}, PC_{50}; antagonistitesti: IC_{20}, IC_{50}, PC_{80}, PC_{50}).

TESTIRAPORTTI

61. Katso ”ER TA -TESTIN OSAT” -luvun 20 kohta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136–148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156–1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646–57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P.(2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459–1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252–4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769–771.

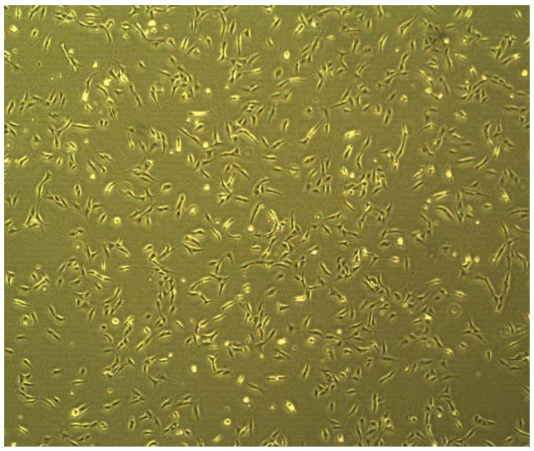
(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67–73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

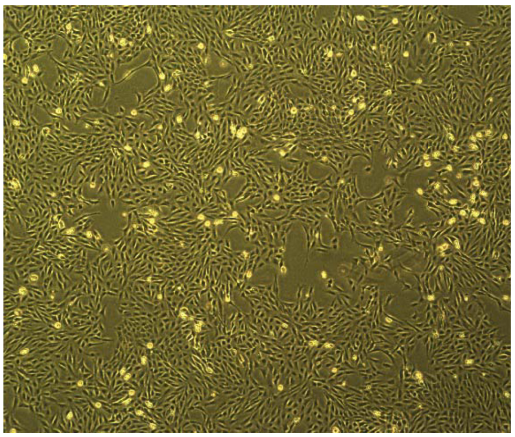
▼**M8**

Lisäys 4.1

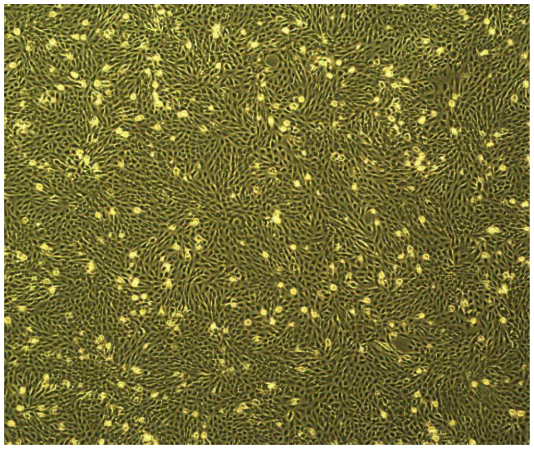
SOLUJEN ELINKYVYN SILMÄMÄÄRÄINEN TARKASTUS



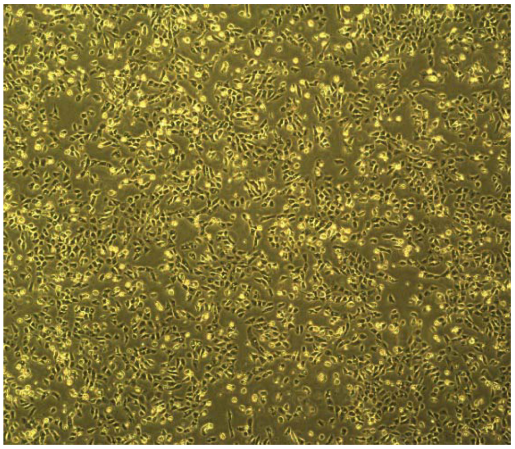
Konfluenssi < 5 %. Solut on juuri istutettu. Solujen elinkyky 100 %. Luokittelu: ”ei sytotoksisuutta”



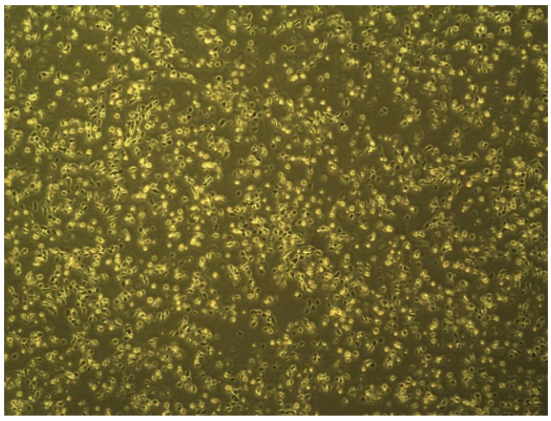
Konfluenssi > 85 %. Tässä vaiheessa solut altistetaan testikemikaaleille. Solujen elinkyky > 95 %. Luokittelu: ”ei sytotoksisuutta”



Konfluenssi > 95 %. Solut ovat pakkautuneet tiheään ja niiden määrä alkaa lisääntyä. Solujen elinkyky > 95 %.
Luokittelu: ”ei sytotoksisuutta”



Solujen elinkyky < 25 %. Solut erkanevat toisistaan, ja niiden välinen yhteys heikkenee. Solut pyöristyvät. Luokittelu: ”sytotoksisuutta”



Solun elinkyky < 5 %. Solut ovat erkaantuneet toisistaan kokonaan, ja niiden välinen yhteys on katkennut. Solut ovat pyöristyneet. Luokittelu: ”sytotoksisuutta”

▼M8

B.67. *IN VITRO* -GEENIMUTAATIOTESTIT NISÄKÄSSOLUILLA TYMIDIINIKINAASIN GEENIÄ KÄYTTÄEN

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 490 (2016). Testimenetelmiä tarkistetaan ja uusitaan säännöllisesti tieteellisen kehityksen, muuttuvien sääntelytarpeiden ja eläinten hyvinvoinnin vuoksi. Hiiren lymfoomatesti ja TK6-testi, jossa käytetään tymidiinikinaasin lokusta, sisältyivät alun perin testimenetelmään B.17. Genotoksisuuden testaamista käsittelevän kansainvälisen työryhmän (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) hiiren lymfoomatestin asiantuntijatyöryhmä on sen jälkeen laatinut kansainvälisesti yhtenäistetyt suositukset hiiren lymfoomatestin hyväksymisperusteista ja aineiston tulkinnasta (1) (2) (3) (4) (5), ja nämä suositukset sisältyvät tähän uuteen testimenetelmään B.67. Tämä testimenetelmä on laadittu hiiren lymfoomatestiä ja TK6-testiä varten, koska siinä hyödynnetään myös tymidiinikinaasin lokusta. Hiiren lymfoomatestiä on käytetty laajalti sääntelytarkoituksiin, kun taas TK6-testiä on käytetty paljon harvemmin. On kuitenkin todettava, että päätetapahtumien samanlaisuudesta huolimatta nämä kaksi solulinjaa eivät ole vaihdettavissa keskenään, ja sääntelyohjelmissa voidaan perustellusti priorisoida toista tietyssä sääntelykäytössä. Hiiren lymfoomatestin validointi osoitti, että sillä voidaan havaita geenimutaatioiden lisäksi myös testikemikaalin kyky aiheuttaa rakenteellisia kromosomivaurioita. Tämä testimenetelmä kuuluu geneettisen toksikologian testimenetelmiin. OECD on laatinut asiakirjan (6), joka sisältää yhteenvedon geneettistä toksikologiaa koskevista testeistä sekä katsauksen näihin testimenetelmiin tehtyihin viimeaikaisiin muutoksiin.

2. Nisäkässoluilla tehtävän *in vitro* -geenimutaatiotestin tarkoituksena on havaita kemikaalien aiheuttamia geenimutaatioita. Näissä testeissä käytettävillä solulinjoilla mitataan reportterigeeneissä, erityisesti endogeenisessä tymidiinikinaasin geenissä (lyhenne *TK* ihmisen soluista ja *Tk* jyrsijän soluista; tässä testimenetelmässä näihin viitataan yhteisesti lyhenteellä *TK*) olevia forward-mutaatioita. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi näiden kahden solulinjan kanssa: hiiren lymfooman solulinja L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C -(yleinen nimitys L5178Y) ja ihmisen lymfoblastoidi solulinja TK6 (yleinen nimitys TK6). Vaikka nämä kaksi solulinjaa eroavat toisistaan alkuperältään, solukasvultaan, p53-statukseltaan jne., *TK*-geenimutaatiotestit voidaan kuitenkin tehdä samalla tavoin kummassakin solutyypissä tässä testimenetelmässä kuvatulla tavalla.

3. Tymidiinikinaasin geenin autosomaalisuuden ja heterotsygoottisuuden avulla voidaan havaita elinkykyiset pesäkkeet, joiden soluista puuttuu tymidiinikinaasientsyymi $TK^{+/-}$ – $TK^{-/-}$ -mutaation seurauksena. Tämä puutos voi johtua *TK*-geeniin vaikuttavista geneettisistä tapahtumista, joita ovat sekä geenimutaatiot (pistemutaatiot, lukukehysmutaatiot, pienet deleetiot jne.) että kromosomaaliset tapahtumat (suuret deleetiot, kromosomien uudelleenjärjestymiset ja mitoottinen rekombinaatio). Viime mainitut tapahtumat ilmenevät heterotsygoottisuuden puutteena, mikä on yleinen geneettinen muutos kasvaimen suppressorigeeneissä ihmisen tuumorigeneesin yhteydessä. Teoriassa hiiren lymfoomatestillä voidaan havaita *TK*-geeniä kantavan koko kromosomin puuttuminen, joka johtuu sukkularihmaston häiriöistä ja/tai mitoottisesta nondisjunktiosta. Sytogeneettisen ja molekulaarisen analyysin yhdistelmä osoittaa selvästi, että jotkin hiiren lymfoomatestissä tavattavat TK-mutantit ovat seurausta nondisjunktiosta. Todistusnäyttö kuitenkin osoittaa, että *TK*-geenimutaatiotesteillä ei voida luotettavasti havaita aneugeeneja tavanomaisia sytotoksisuuskriteerejä sovellettaessa (kuten tässä testimenetelmässä kuvataan), joten näiden testien käyttö aneugeenien havaitsemiseksi ei ole asianmukaista (7) (8) (9).

▼**M8**

4. *TK*-geenimutaatiotesteissä luodaan kaksi eri fenotyyppiluokkaa *TK*-mutanteista: normaalisti kasvavat mutantit, jotka kasvavat samaa vauhtia kuin heterotsygoottiset TK-solut, ja hitaasti kasvavat mutantit, joiden kaksinkertaistumisaika on pidentynyt. Hiiren lymfoomatestissä normaalisti kasvavat ja hitaasti kasvavat mutantit määritetään suureksi mutaatiopesäkkeeksi ja pieneksi mutaatiopesäkkeeksi, ja TK6-testissä ne määritetään aikaisin ilmaantuvaksi pesäkkeeksi ja myöhään ilmaantuvaksi pesäkkeeksi. Hiiren lymfoomatestin osalta sekä suurten että pienten mutaatiopesäkkeiden molekulaarinen ja sytogeneettinen luonne on selvitetty yksityiskohtaisesti (8) (10) (11)(12) (13). Myös aikaisin ja myöhään ilmaantuvien TK6-mutanttien molekulaarista ja sytogeneettistä luonnetta on tutkittu laajasti (14) (15) (16) (17). Kummankin solutyypin hitaasti kasvavilla mutanteilla on ollut geneettinen vaurio, johon sisältyy oletus kasvua säätelevästä geenistä (säätelevistä geeneistä) TK:n lokuksen lähellä. Tästä seuraa kaksinkertaistumisaikojen piteneminen ja myöhään ilmaantuvien tai pienten pesäkkeiden muodostuminen (18). Hitaasti kasvavien mutanttien muodostuminen on yhdistetty kemikaaleihin, jotka aiheuttavat suuria rakenteellisia muutoksia kromosomitasolla. Solut, joiden vaurioon ei sisälly oletusta kasvua säätelevästä geenistä (säätelevistä geeneistä) TK:n lokuksen lähellä, kasvavat samaa vauhtia kuin parentaaliset solut, ja niistä tulee normaalisti kasvavia mutantteja. Pääasiassa normaalisti kasvavien mutanttien muodostuminen on liitetty kemikaaleihin, jotka aiheuttavat pääasiassa pistemutaatioita. Sen vuoksi on tärkeää laskea sekä hitaasti että normaalisti kasvavat mutantit, jotta löydetään kaikki mutantit ja jotta saadaan tietoa testikemikaalin aiheuttaman vaurion tyypistä (tyypeistä) (mutageenit vs. klastogeenit) (10) (12) (18) (19).

5. Testimenetelmä sisältää yleistä tietoa, jota sovelletaan sekä hiiren lymfoomatestiin että TK6-testiin, ja erityisohjeita kumpaakin yksittäistä testiä varten.

6. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

7. *In vitro* -testit edellyttävät yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiota. Eksogeeninen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei täysin jäljittele *in vivo* -olosuhteita.

8. On huolehdittava siitä, että vältetään olosuhteet, jotka voisivat johtaa vääriin positiivisiin tuloksiin (ts. mahdollinen yhteisvaikutus testausjärjestelmän kanssa), jotka eivät johdu testikemikaalien ja solun geneettisen materiaalin suorasta yhteisvaikutuksesta. Tällaisiin olosuhteisiin sisältyvät pH:n tai osmolaliteetin muutokset, yhteisvaikutus väliaineen komponenttien kanssa (20) (21) tai liiallinen sytotoksisuus (22) (23) (24). Hiiren lymfoomatestissä ja TK6-testissä sytotoksisuutta pidetään liian suurena, jos se ylittää 28 kohdassa määritetyt sytotoksisuuden enimmäistasot. Lisäksi on muistettava, että testikemikaalit, jotka ovat tymidiinin analogeja tai käyttäytyvät niiden tavoin, voivat lisätä mutaationopeutta spontaanien taustamutaatioiden valikoivan kasvun kautta solun käsittelyn aikana, ja niiden asianmukainen arviointi edellyttää muita testimenetelmiä (25).

9. Valmistettujen nanomateriaalien osalta tähän testimenetelmään voidaan joutua tekemään erityisiä mukautuksia, mutta niitä ei ole kuvattu tässä testimenetelmässä.

10. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

▼M8

11. Mutantit solut, joista $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ -mutaation seurauksena puuttuu tymidiinikinaasientsyymin vaikutus, ovat resistenttejä pyrimidiinianalogitrifluorotymidiinin (TFT) sytotoksisille vaikutuksille. *TK*:n läsnä ollessa solut ovat herkkiä TFT:lle, joka estää solun aineenvaihduntaa ja pysäyttää solunjakautumisen. Mutantit solut pystyvät siis lisääntymään TFT:n läsnä ollessa ja muodostamaan näkyviä pesäkkeitä, kun taas TK-entsyymiä sisältävät solut eivät pysty.

TESTIN PERIAATE

12. Suspensiossa olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi (ks. 33 kohta) testikemikaalille sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä (ks. 19 kohta) ja jatkoviljellään sytotoksisuuden toteamiseksi ja fenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi ennen mutanttien selektiota. Sytotoksisuus määritetään hiiren lymfoomatestissä suhteellisena kokonaiskasvuna (relative total growth, RTG – ks. 25 kohta) ja TK6-testissä suhteellisena eloonjääneisyytenä (relative survival, RS – ks. 26 kohta). Altistettuja viljelmiä pidetään kasvatusaineessa riittävän pitkä aika, joka on jokaiselle valitulle solutyypille ominainen (ks. 37 kohta), jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista. Fenotyypin ilmentymisen jälkeen mutaationopeus lasketaan siten, että tunnettu lukumäärä soluja kylvetään toisaalta mutanttipesäkkeiden toteamiseksi selektiivistä ainetta sisältävälle alustalle ja toisaalta kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden) määrittämiseksi alustalle, joka ei sisällä selektiivistä ainetta. Sopivan inkubaatioajan kuluttua lasketaan pesäkkeet. Mutaationopeus lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän perusteella mutanttien selektion aikaisella kloonaustehokkuudella korjattuna.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Solut

13. Hiiren lymfoomatesti: Koska hiiren lymfoomatestin kehittämisessä ja luonnehtimisessa käytettiin L5178Y-solujen alalinjaa $TK^{+/-}$ -3.7.2C, tätä nimenomaista alalinjaa on käytettävä hiiren lymfoomatestissä. L5178Y-solulinja on peräisin metyylikolantreenin aiheuttamasta DBA-2-kannan hiiren kateenkorvan lymfoomasta (26).Clive työtovereineen käsitteli L5178Y-soluja (jotka Clive nimesi $TK^{+/+}$ -3-soluiksi) etyylimetaanisulfonaatilla ja eristi $TK^{-/-}$ (nimitys $TK^{-/-}$ -3.7) -kloonin käyttämällä bromodeoksiuridiinia selektiivisenä aineena. $TK^{-/-}$-kloonista eristettiin spontaani $TK^{+/-}$-klooni (nimitys $TK^{+/-}$ -3.7.2.) ja alaklooni (nimitys $TK^{+/-}$-3.7.2C), ja niiden käyttöä hiiren lymfoomatestissä luonnehdittiin (27). Solulinjan karyotyyppi on julkaistu (28) (29) (30) (31). Modaalinen kromosomimäärä on 40. Yksi kromosomi on metasentrinen (t12;13), ja se tulisi laskea yhdeksi kromosomiksi. Hiiren *TK*:n lokus sijaitsee kromosomin 11 distaalipäässä. L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C -solulinjassa on mutaatioita kummassakin p53-alleelissa, ja se tuottaa mutanttia p53-proteiinia (32) (33). Se, että testillä voidaan havaita laaja-alaisia vaurioita, johtuu todennäköisesti $TK^{+/-}$-3.7.2C -solulinjan p53-statuksesta (17).

14. TK6-testi: TK6 on ihmisen lymfoblastoidi solulinja. Parentaalinen solulinja on Epstein-Barrin viruksella muunnettu solulinja WI-L2, joka saatiin alun perin 5-vuotiaalta perinnöllistä sferosytoosia sairastavalta pojalta. Ensimmäiselle eristetylle kloonille, HH4:lle, aiheutettiin mutaatio ICR191:llä, ja heterotsygoottinen *TK*-solulinja, TK-6, luotiin (34). TK-6-solut ovat lähes diploidisia, ja edustava karyotyyppi on 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Ihmisperäinen *TK*:n lokus sijaitsee kromosomin 17 pitkässä varressa. TK6 on p53-kompetentti solulinja, koska sen molemmissa alleeleissa on villityypin p53-sekvenssi ja se ilmentää vain villityypin p53-proteiinia (36).

▼M8

15. Sekä hiiren lymfoomatestissä että TK6-testissä testilaboratorion kannattaa varmistaa varastokantaa tehdessään tai täydentäessään, ettei *Mycoplasma*-kontaminaatiota ole. Lisäksi laboratorion täytyy tehdä solujen karyotyypitys tai värjätä kromosomit, joissa *TK*:n lokus sijaitsee, sekä tarkistaa populaation kaksinkertaistumisajat. Normaali solusyklin kesto testilaboratoriossa käytetyissä soluissa on määritettävä, ja sen on oltava solujen julkaistujen ominaisuuksien mukainen (16) (19) (37). Tätä varastokantaa on säilytettävä vähintään -150° C:ssa, ja kaikki työvarastokannat on valmistettava siitä.

16. Viljelmästä voidaan joutua puhdistamaan olemassa olevat mutantit solut [ellei liuotinkontrollin mutaationopeus jo ole hyväksyttävä – ks. hiiren lymfoomatestin osalta taulukko 2] joko ennen kuin tehdään suuri määrä syväjäädytyksellä säilöttäviä varastokantoja tai juuri ennen solujen käyttöä kokeessa. Tämä tehdään käyttämällä metotreksaattia (aminopteriinia) siihen, ettei valinta kohdistu niihin soluihin, joista puuttuu TK, ja lisäämällä viljelmään tymidiiniä, hypoksantiinia ja glysiiniä (L5178Y) tai 2'-deoksisytidiiniä (TK6) TK-kompetenttien solujen optimaalisen kasvun varmistamiseksi (19) (38) (39), ja TK6:n osalta (40)). Yleisiä ohjeita soluviljelmien ylläpitämisen hyvistä käytännöistä ja tarkempia ohjeita L5178Y- ja TK6-soluista on lähdeviitteissä (19) (31) (37) (39) (41). Jos laboratoriot tarvitsevat varastosolukantoja joko hiiren lymfoomatestin tai TK6-testin aloittamista varten tai uusien varastosolukantojen hankkimiseksi, on olemassa soluvarasto tarkkaan luonnehdituista soluista (37).

Kasvatusliuokset ja viljelyolosuhteet

17. Kummassakin testissä viljelmiä on ylläpidettävä soveltuvassa kasvatusliuoksessa ja inkubaatio-olosuhteissa (esim. kasvatusastiat, kosteutettu ilma, jonka hiilidioksidipitoisuus on 5 prosenttia, ja inkubointilämpötila 37 °C). Soluviljelmät on pidettävä aina sellaisissa olosuhteissa, joiden avulla varmistetaan, että ne kasvavat log-vaiheessa. On erityisen tärkeää valita sellaiset kasvatusliuokset ja viljelyolosuhteet, jotka takaavat optimaalisen solukasvun ilmentymisaikana ja optimaalisen kloonaustehokkuuden sekä mutanteille että ei-mutanteille soluille. Sekä hiiren lymfoomatestissä että TK6-testissä on tärkeää, että viljelyolosuhteilla varmistetaan sekä suurten pesäkkeiden / aikaisin ilmaantuvien että pienten pesäkkeiden / myöhään ilmaantuvien TK-mutanttien optimaalinen kasvu. Tarkempia tietoja viljelystä ja siitä, miten hevosen seerumi inaktivoidaan asianmukaisesti lämmöllä, jos mutanttien selektion aikana käytetään RPMI-kasvatusliuosta, on lähdeviitteissä (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Soluviljelmien valmistelu

18. Solulinjat kasvatetaan kantaviljelmistä ja kylvetään kasvatusliuokseen sellaiseen tiheyteen, että suspensioviljelmissä olevat solut kasvavat eksponentiaalisesti altistus- ja ilmentymisaikana.

Metabolinen aktivaatio

19. L5178Y- ja TK6-solujen yhteydessä on käytettävä eksogeenisia metabolisia järjestelmiä, koska näiden solujen endogeeninen metabolointikyky ei ole riittävä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä, jota suositellaan oletusarvoisesti, ellei toisin toimiminen ole perusteltua, on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (43) (44) (45) tai fenobarbitaalin ja ß-naftoflavonin (46) (47) (48) (49) (50) (51) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrsijöiden (yleensä rottien) maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Jälkimmäisenä mainittu yhdistelmäei ole ristiriidassa pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskevan Tukholman yleissopimuksen kanssa

▼M8

(52), ja sen on osoitettu indusoivan sekaoksidaasia yhtä tehokkaasti kuin Aroclor 1254 (45) (46) (47) (48) (49). S9-jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue on 1–2 prosenttia, mutta sen pitoisuutta voidaan nostaa 10 tilavuusprosenttiin lopullisessa testiaineessa. Testikemikaalien luokka saattaa vaikuttaa siihen, mitä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tai metabolisen indusoijan tyyppiä ja pitoisuutta päätetään käyttää.

Testikemikaalin valmistus

20. Kiinteät testikemikaalit on valmistettava sopivissa liuottimissa ja tarvittaessa laimennettava ennen solujen käsittelyä (ks. 21 kohta). Nestemäiset testikemikaalit voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen testijärjestelmän käsittelyä. Kaasujen tai haihtuvien kemikaalien testauksessa standardimenettelyihin on tehtävä tarvittavia muutoksia; kyseiset kaasut tai kemikaalit on esimerkiksi käsiteltävä suljetuissa astioissa (53) (54) (55). Testikemikaali on valmistettava juuri ennen käsittelyä, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

TESTAUSOLOSUHTEET

Liuottimet

21. Liuotin on valittava siten, että testikemikaalin liukoisuus on mahdollisimman hyvä eikä se haittaa testin tekemistä esimerkiksi muuttamalla solukasvua, vaikuttamalla testikemikaalin eheyteen, reagoimalla viljelyastioiden kanssa tai häiritsemällä metabolista aktivaatiojärjestelmää. Vesipitoisen liuottimen (tai kasvatusliuoksen) käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Hyvin tunnettuja liuottimia ovat vesi ja dimetyylisulfoksidi. Yleensä orgaanisten liuottimien osuus ei saa ylittää yhtä ja vesipitoisten liuottimien (suolaliuos tai vesi) kymmentä tilavuusprosenttia lopullisessa kasvatusaineessa. Jos testissä käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia (esimerkiksi etanolia tai asetonia), niiden käyttö on perusteltava tiedoilla, joilla osoitetaan, että ne ja testikemikaali sopivat yhteen ja etteivät ne ole genotoksisia käytettyinä pitoisuuksina. Jos tällaisia tukevia tietoja ei ole, on tärkeää käyttää käsittelemättömiä kontrolleja (ks. lisäys 1, määritelmät), jotka osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta haitallisia tai mutageenisiä vaikutuksia.

SYTOTOKSISUUDEN MITTAUS JA ALTISTUSPITOISUUKSIEN VALINTA

22. Testikemikaalin suurinta pitoisuutta määritettäessä on vältettävä pitoisuuksia, jotka voivat aiheuttaa vääriä positiivisia vasteita, kuten liian voimakasta sytotoksisuutta (ks. 28 kohta), saostumista kasvatusliuokseen (ks. 29 kohta) tai pH-arvon tai osmolaliteetin merkittävää muuttumista (ks. 8 kohta). Jos testikemikaali aiheuttaa sitä lisättäessä kasvatusliuoksen pH-arvon merkittävän muuttumisen, pH-arvoa voidaan mukauttaa puskuroimalla lopullinen kasvatusliuos väärien positiivisten tulosten välttämiseksi ja asianmukaisten viljelyolosuhteiden säilyttämiseksi.

23. Pitoisuuden valinta perustuu sytotoksisuuteen ja muihin näkökohtiin (ks. 27–30 kohta). Vaikka sytotoksisuuden arviointi alustavassa testissä saattaa olla hyödyllinen, jotta voidaan määrittää pääasiallisessa kokeessa käytettävät pitoisuudet, alustava testi ei ole pakollinen. Vaikka alustava sytotoksisuustesti tehtäisiin, sytotoksisuus on kunkin viljelmän osalta silti mitattava myös pääasiallisessa kokeessa. Jos tehdään annoksenmääritystesti, sen pitää kattaa laaja pitoisuusalue, ja se voidaan lopettaa joko päivänä 1 altistuksen jälkeen tai sitä voidaan jatkaa päivän 2 ilmentymisen ja mutanttien selektion ajan (jos käytetyt pitoisuudet osoittautuvat asianmukaisiksi).

▼**M8**

24. Sytotoksisuus on määritettävä jokaisesta yksittäisestä testiviljelmästä ja kontrolliviljelmästä: hiiren lymfoomatestin (2) ja TK6-testin (15) menetelmät on määritetty kansainvälisesti hyväksytyssä käytännössä.

25. Hiiren lymfoomatestin molemmat versiot (agar ja mikrokuoppalevy): Sytotoksisuus on arvioitava käyttämällä suhteellista kokonaiskasvua (relative total growth, RTG), jonka määrittelivät alkujaan Clive ja Spector vuonna 1975 (2). Tähän sisältyy suhteellinen suhteellinen suspensiokasvu (RSG: testiviljelmä vs. liuotinkontrolli) solun käsittelyn aikana, ilmentymisaika ja suhteellinen kloonaustehokkuus (RCE: testiviljelmä vs. liuotinkontrolli) mutanttien selektion aikana (2). Suhteellinen suspensiokasvu sisältää myös mahdollisen solukadon, jota voi ilmetä testiviljelmässä käsittelyn aikana (ks. laskentakaavat lisäyksestä 2).

26. TK6-testi: Sytotoksisuus on arvioitava käyttämällä suhteellista eloonjääneisyyttä eli maljattujen solujen kloonaustehokkuutta heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna solumäärän perusteella verrattuna negatiiviseen kontrolliin (jolle määritetty eloonjääneisyys on 100 %) (ks. kaavio lisäyksestä 2).

27. Vähintään neljää hyväksymisperusteet (asianmukainen sytotoksisuus, solumäärä jne.) täyttävää testipitoisuutta (paitsi liuotin- ja positiiviset kontrollit) on arvioitava. Vaikka rinnakkaisten viljelmien käyttö on suositeltavaa, kunkin testattavan pitoisuuden yhteydessä voidaan käyttää joko rinnakkaisia tai yksittäistä altistettuja viljelmiä. Rinnakkaisviljelmistä tietyllä pitoisuudella saadut tulokset on raportoitava erikseen, mutta ne voidaan yhdistää tietojen analyysia varten (55). Testikemikaaleille, jotka osoittavat vain vähän tai eivät lainkaan sytotoksisuutta, noin kaksin- tai kolminkertaiset pitoisuusvälit ovat yleensä riittävät. Jos sytotoksisuutta esiintyy, pitoisuudet on valittava siten, että ne kattavat sytotoksisuuden vaihteluvälin 28 kohdassa kuvatusta sytotoksisuudesta vähäiseen sytotoksisuuteen tai tasoon, jolla sytotoksisuutta ei esiinny lainkaan. Monien testikemikaalien pitoisuus-vastekäyrä on jyrkkä, ja jotta saataisiin tietoja sytotoksisuuden koko vaihteluvälistä tai voitaisiin tutkia pitoisuus-vastesuhdetta tarkasti, voi olla tarpeen käyttää pitoisuuksia, jotka ovat lähempänä toisiaan, ja useampaa kuin neljää pitoisuutta erityisesti tilanteissa, joissa tarvitaan toistettuja kokeita (ks. 70 kohta). Useamman kuin neljän pitoisuuden käyttö voi olla erityisen tärkeää silloin, kun käytetään yksittäisiä viljelmiä.

28. Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, hiiren lymfoomatestissä suurimmalla pitoisuudella pitäisi saavuttaa 20 ja 10 prosentin välillä vaihteleva suhteellinen kokonaiskasvu. TK6-testissä pitäisi saavuttaa suhteellinen eloonjääneisyys, joka vaihtelee välillä 20 ja 10 prosenttia (67 kohta).

29. Sellaisten huonosti liukenevien testikemikaalien kohdalla, jotka eivät ole sytotoksisia pienintä liukenematonta pitoisuutta pienempinä pitoisuuksina, suurimmassa analysoitavassa pitoisuudessa on esiinnyttävä testikemikaalille altistumisen päättyessä silmin tai käänteismikroskoopilla nähtävää sameutta tai saostumista. Vaikka sytotoksisuutta esiintyy pienintä liukenematonta pitoisuutta pienemmissä pitoisuuksissa, on suositeltavaa testata ainoastaan yksi sameutta tai näkyvää saostumista tuottava pitoisuus, koska saostuminen saattaa aiheuttaa vääriä vasteita. Koska hiiren lymfoomatestissä ja TK6-testissä käytetään suspensioviljelmiä, on huolehdittava siitä, ettei saostuminen vaikuta testin suorittamiseen. Ennen koetta saattaa olla hyödyllistä määrittää liukoisuus soluviljelmän kasvatusliuokseen.

▼M8

30. Jos saostumista tai rajoittavaa sytotoksisuutta ei havaita, suurimman testipitoisuuden on vastattava tasoa 10 mM, 2 mg/ml tai 2 µl/ml sen mukaan, mikä pitoisuuksista on pienin (57) (58). Jos testikemikaalin koostumusta ei ole määritelty eli se on esimerkiksi koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali [ts. UVCB-aine] tai ympäristöstä otettu näyte tms., suurimman pitoisuuden on riittävän sytotoksisuuden puuttuessa ehkä oltava suurempi (esimerkiksi 5 mg/ml) kunkin osan pitoisuuden lisäämiseksi. On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (59).

Kontrollit

31. Kaikkiin testiolosuhteisiin on sisällytettävä samanaikaiset negatiiviset kontrollit (ks. 21 kohta), jotka koostuvat pelkästään käsittelyväliaineessa olevasta liuottimesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä.

32. Samanaikaisia positiivisia kontrolleja tarvitaan, jotta voidaan osoittaa laboratorion kyky tunnistaa mutageenejä käytetyn testisuunnitelman mukaisissa olosuhteissa sekä eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus (tarvittaessa) ja jotta voidaan osoittaa, että sekä pienet / myöhään ilmaantuvat ja suuret / aikaisin ilmaantuvat *TK*-mutaatiopesäkkeet havaitaan asianmukaisesti. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista esitetään jäljempänä taulukossa 1. Vaihtoehtoisia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Koska nisäkässoluilla tehtävät *in vitro* -geenitoksisuustestit ovat riittävän standardoituja samanaikaisesti metabolisen aktivaation kanssa ja ilman sitä tehtäviä, lyhyitä (3–4 tuntia) ja kestoltaan samoja käsittelyjä varten, positiivisten kontrollien käyttö voidaan rajoittaa metabolista aktivaatiota edellyttävään mutageeniin. Tässä tapauksessa tämä yksittäinen positiivinen kontrollivaste osoittaa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän toiminnan että testausjärjestelmän herkkyyden. Pitkäaikaisessa käsittelyssä (esimerkiksi 24 tuntia ilman S9-jaetta) on kuitenkin oltava oma positiivinen kontrollinsa, koska käsittelyn kesto poikkeaa testistä, jossa käytetään metabolista aktivointia. Kutakin positiivista kontrollia on käytettävä yhtenä tai useampana pitoisuutena, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa oleva lisääntyminen taustaan verrattuna, jotta voidaan osoittaa testausjärjestelmän herkkyys. Tässä testimenetelmässä määritetyt raja-arvot ylittävä sytotoksisuustaso ei saa vaarantaa vasteen luotettavuutta (ks. 28 kohta).

Taulukko 1

Vertailuaineet, joita suositellaan laboratorion pätevyyden arvioimiseen ja positiivisten kontrollien valintaan

Luokka	Aine	CAS-nro
1. Mutageenit, jotka ovat aktiivisia ilman metabolista aktivaatiota		
	Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3
	Mitomysiini C	50-07-7
	4-nitrokinoliini-N-oksidi	56-57-5
2. Mutageenit, jotka edellyttävät metabolista aktivaatiota		
	Bentso(a)-pyreeni	50-32-8
	Syklofosfamidi (monohydraatti)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-dimetyylibentsantraseeni	57-97-6
	3-metyylikolantreeni	56-49-5

▼M8

MENETTELY

Käsittely testikemikaalilla

33. Lisääntyvät solut altistetaan testikemikaalille metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa ja ilman sitä. Altistusajan on oltava sopiva (asianmukainen aika on yleensä 3–4 tuntia). On kuitenkin huomattava, että nämä vaatimukset voivat vaihdella ihmisille tarkoitettujen lääkkeiden osalta (59). Jos lyhytaikaisesta käsittelystä saadaan hiiren lymfoomatestissä negatiivisia tuloksia ja jos tietojen perusteella näyttää siltä, että pidempi käsittely olisi tarpeen [esimerkiksi nukleosidianalogit, huonosti liukenevat kemikaalit (5) (59)], on harkittava testin tekemistä siten, että käsittelyaika on pidempi, esimerkiksi 24 tuntia ilman S9-jaetta.

34. Jokaisessa testiviljelmässä (kontrolli ja altistus) kussakin testivaiheessa käytettävien solujen vähimmäismäärän tulee perustua spontaanimutaationopeuteen. Yleisohje on käsitellä ja siirrostaa jokaisessa viljelmässä riittävästi soluja, jotta kaikissa testin vaiheissa (käsittely, fenotyypin ilmentyminen ja mutanttien selektio) on vähintään 10 mutta mieluiten 100 spontaania mutaatiota (56).

35. Hiiren lymfoomatestissä suositeltu hyväksyttävä spontaani mutaationopeus on 35–140 $\times$ 10^{-6} (agar-versio) ja 50–170 $\times$ 10^{-6} (mikrokuoppalevyversio) (ks. taulukko 2). Jotta jokaisessa testiviljelmässä olisi vähintään 10 ja mieluiten 100 spontaania mutanttia, jotka selviytyvät käsittelystä, soluja on käsiteltävä vähintään 6 $\times$ 10^{6}. Kun käsitellään tämä määrä soluja ja kun soluja on riittävästi ilmentymisen ja mutanttien selektioon liittyvän kloonauksen aikana, saadaan riittävästi spontaaneja mutantteja (vähintään 10) kaikissa kokeen vaiheissa, myös sellaisilla pitoisuuksilla käsitellyissä viljelmissä, joiden aiheuttama sytotoksisuus on 90 prosenttia (mitattuna 10 prosentin suhteellisella kokonaiskasvulla) (19) (38) (39).

36. TK6-testissä spontaani mutaationopeus on yleensä välillä 2 ja 10 $\times$ 10^{-6}. Jotta jokaisessa testiviljelmässä olisi vähintään 10 spontaania mutanttia, jotka selviytyvät käsittelystä, soluja on käsiteltävä vähintään 20 $\times$ 10^{6}. Kun käsitellään tämä määrä soluja, saadaan riittävä määrä spontaaneja mutantteja (vähintään 10) myös sellaisilla pitoisuuksilla käsitellyissä viljelmissä, jotka aiheuttavat käsittelyn aikana 90 prosentin sytotoksisuuden (suhteellinen eloonjääneisyys 10 prosenttia). Lisäksi on viljeltävä riittävä määrä soluja ilmentymisaikana, ja solut on maljattava mutanttien selektiota varten (60).

Fenotyypin ilmentymisaika sekä sytotoksisuuden ja mutaationopeuden mittaus

37. Käsittelyjakson päätteeksi soluja viljellään määrätyn ajan, jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista; tämä aika on jokaiselle solulinjalle ominainen. Hiiren lymfoomatestissä fenotyypin ilmentymisaika on kaksi päivää. TK6-testissä fenotyypin ilmentymisaika on 3–4 päivää. Jos käytetään 24 tunnin pituista käsittelyä, ilmentymisaika alkaa käsittelyn päätyttyä.

38. Fenotyypin ilmentymisajan aikana solut lasketaan päivittäin. Hiiren lymfoomatestissä päivittäisten solumäärien avulla lasketaan päivittäinen suspensiokasvu. Kahden päivän ilmentymisajan jälkeen soluja suspendoidaan kasvatusliuoksessa selektiivisen aineen kanssa ja ilman sitä mutanttien lukumäärän (valintatestilevyt) ja kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden testilevyt) määrittämiseksi. Hiiren lymfoomatestissä on kaksi yhtä hyväksyttävää menetelmää mutanttien selektion kloonaukseen: toisessa käytetään pehmeää agaria ja toisessa nestemäistä kasvatusainetta 96-kuoppaisissa levyissä (19) (38) (39). TK6-testissä kloonaus tehdään käyttämällä nestemäisiä kasvatusaineita ja 96-kuoppaisia levyjä (16).

▼M8

39. Trifluorotymidiini (TFT) on ainoa suositeltava selektiivinen aine *TK*-mutanteille (61).

40. Hiiren lymfoomatestissä agarlevyjen ja mikrokuoppalevyjen pesäkkeet lasketaan 10–12 päivän inkuboinnin jälkeen. TK6-testissä mikrokuoppalevyjen pesäkkeet lasketaan 10–14 päivän kuluttua aikaisin ilmaantuvien mutanttien osalta. Jotta voidaan määrittää hitaasti kasvavat (myöhään ilmaantuvat) TK6-mutantit, soluja täytyy ruokkia viljelyaineella ja TFT:llä aikaisin ilmaantuvien mutanttien laskemisen jälkeen, ja sen jälkeen levyjä on inkuboitava vielä 7–10 päivää (62). Lue 42 ja 44 kohdasta lisätietoja hitaasti ja normaalisti kasvavien *TK*-mutanttien laskemisesta.

41. Hiiren lymfoomatestin osalta asianmukaiset laskelmat kahdelle testille ja kahdelle menetelmälle (agar- ja mikrokuoppalevy) ovat lisäyksessä 2. Agar-levyllä tehtävässä hiiren lymfoomatestissä pesäkkeet lasketaan ja mutanttipesäkkeiden lukumäärä mukautetaan kloonaustehokkuudella, jotta saadaan laskettua mutaationopeus. Hiiren lymfoomatestin ja TK6-testin mikrokuoppalevyllä tehtävässä versiossa kloonaustehokkuus määritetään sekä valinnan että kloonaustehokkuuden testilevyiltä Poissonin jakauman mukaisesti (63). Mutaationopeus lasketaan näiden kahden kloonaustehokkuuden perusteella.

Mutanttipesäkkeiden luonnehdinta

42. Jos testikemikaalista saadaan hiiren lymfoomatestissä positiivinen tulos (ks. 62–63 kohta), pesäkkeitä on luonnehdittava kuvaamalla pesäkkeiden kokoa tai kasvua ainakin yhdessä testiviljelmässä (yleensä suurin hyväksyttävä positiivinen pitoisuus) ja negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa. Jos testikemikaalista saadaan negatiivinen tulos (ks. 64 kohta), mutanttipesäkkeiden luonnehdinta on tehtävä negatiivisten ja positiivisten kontrollien perusteella. Hiiren lymfoomatestin mikrokuoppalevymenetelmässä pieniä pesäkkeitä muodostaviksi mutanteiksi määritellään sellaiset pesäkkeet, jotka kattavat alle 25 prosenttia kuopan halkaisijasta. Suuria pesäkkeitä muodostaviksi mutanteiksi määritellään puolestaan sellaiset pesäkkeet, jotka kattavat yli 25 prosenttia kuopan halkaisijasta. Agar-menetelmässä mutanttipesäkkeiden laskemisessa ja pesäkkeiden koon määrittämisessä käytetään automaattista pesäkelaskuria. Kirjallisuudessa on yksityiskohtaisia kuvauksia pesäkkeiden koon määrittämistavoista (19) (38) (40). Negatiivisen ja positiivisen kontrollin pesäkkeiden luonnehdinta on tarpeen, jotta voidaan osoittaa, että tutkimukset on tehty asianmukaisesti.

43. Testikemikaalia ei voida määrittää negatiiviseksi, ellei positiivisessa kontrollissa havaita riittävästi sekä suuria että pieniä pesäkkeitä muodostavia mutantteja. Pesäkkeiden luonnehdinnan avulla voidaan saada yleistä tietoa testikemikaalin kyvystä aiheuttaa pistemutaatioita ja/tai kromosomeihin liittyviä tapahtumia (4 kohta).

44. TK6: Normaalisti kasvavat ja hitaasti kasvavat mutantit erotellaan sillä, että niiden inkubointiaika on erilainen (ks. 40 kohta). TK6-testissä sekä aikaisin että myöhään ilmaantuvat mutantit lasketaan kaikista viljelmistä, myös negatiivisista ja positiivisista kontrolleista. Negatiivisen ja positiivisen kontrollin pesäkkeiden luonnehdinta on tarpeen, jotta voidaan osoittaa, että tutkimukset on tehty asianmukaisesti. Testikemikaalia ei voida määrittää negatiiviseksi, ellei positiivisessa kontrollissa havaita riittävästi sekä aikaisin että myöhään ilmaantuvia mutantteja. Pesäkkeiden luonnehdinnan avulla voidaan saada yleistä tietoa testikemikaalin kyvystä aiheuttaa pistemutaatioita ja/tai kromosomeihin liittyviä tapahtumia (4 kohta).

▼M8

Laboratorion pätevyys

45. Jotta laboratoriolla voidaan osoittaa olevan riittävä kokemus testistä ennen sen käyttöä rutiinitestauksessa, laboratorion täytyy olla suorittanut useita kokeita positiivisilla vertailuaineilla, jotka vaikuttavat eri mekanismien välityksellä (ainakin yksi metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa ja yksi ilman sitä vaikuttava aine, jotka valitaan taulukossa 1 luetelluista aineista), sekä useita negatiivisia kontrolleja (käsittelemättömiä viljelmiä sekä erilaisia liuottimia/kantaja-aineita käyttäen). Näiden positiivisten ja negatiivisten kontrollien vasteiden olisi oltava yhdenmukaisia lähdekirjallisuuden kanssa. Tätä vaatimusta ei sovelleta laboratorioihin, joilla on kokemusta, eli joilla on 47–50 kohdassa määritelty aikaisempia tuloksia sisältävä tietokanta. Hiiren lymfoomatestissä sekä positiivisista että negatiivisista kontrolleista saatujen arvojen on oltava IWGT:n suositusten mukaiset (ks. taulukko 2).

46. Tiettyjä positiivisia kontrolliaineita (ks. taulukko 1) on tutkittava lyhyillä ja pitkillä altistuksilla (jos pitkiä altistuksia käytetään) ilman metabolista aktivaatiota ja myös lyhyellä altistuksella metabolisen aktivaation läsnä ollessa, jotta osoitetaan laboratorion pätevyys havaita mutageenisia kemikaaleja, määrittää metabolisen aktivaatiojärjestelmän tehokkuus ja osoittaa solujen käsittelyn aikaisten kasvuolosuhteiden, fenotyypin ilmentymisen sekä mutanttien selektion asianmukaisuus ja laskentamenetelmien soveltuvuus. Valittujen aineiden eri pitoisuudet on valittava siten, että ne aiheuttavat toistettavissa olevia ja pitoisuuteen liittyviä lisääntymisiä taustaan verrattuna, testijärjestelmän herkkyyden ja dynaamisen alueen osoittamiseksi.

Aiemmat kontrollitiedot

47. Laboratorion on määritettävä:

— aiempien positiivisten kontrollien vaihteluväli ja jakauma

— aiempien negatiivisten kontrollien (käsittelemättömien ja liuotinkontrollien) vaihteluväli ja jakauma.

48. Kun hankitaan aluksi tietoja aiempien negatiivisten kontrollien jakaumaa varten, samanaikaisten negatiivisten kontrollien on oltava yhdenmukaisia julkaistujen negatiivisten kontrollitietojen kanssa. Kun kontrollin jakaumaan lisätään enemmän kokeellista tietoa, samanaikaisten negatiivisten kontrollien tulisi mieluiten sijoittua kyseisen jakauman 95 prosentin kontrollirajojen sisälle (64) (65).

49. Laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokanta on aluksi luotava vähintään 10 kokeella, mutta sen olisi mieluiten koostuttava vähintään 20 kokeesta, jotka on suoritettu vastaavissa testiolosuhteissa. Laboratorioiden on käytettävä laadunvalvontamenetelmiä, kuten valvontakortteja (esim. C-kortteja tai X-bar-kortteja (65)), positiivisten ja negatiivisten kontrollitietojensa vaihtelevuuden määrittämiseksi ja sen osoittamiseksi, että laboratorio ”hallitsee” menetelmän (66). Tarkempia tietoja ja suosituksia siitä, miten aikaisempia tietoja sisältävä tietokanta laaditaan ja miten sitä käytetään, on kirjallisuudessa (64).

50. Negatiivisten kontrollitietojen on koostuttava mutaationopeuksista yhdessä viljelmässä tai mieluiten rinnakkaisviljelmissä 27 kohdan mukaisesti. Samanaikaisten negatiivisten kontrollien olisi mieluiten sijoituttava laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokannan 95 prosentin kontrollirajojen sisälle. Jos negatiivisia kontrolleja koskevat tiedot jäävät 95 prosentin kontrollirajojen ulkopuolelle, ne voidaan hyväksyä aikaisempien kontrollien jakaumaan edellyttäen, että ne eivät ole äärimmäisiä harha-arvoja ja on näyttöä siitä, että testijärjestelmä on ”hallinnassa” (ks. 49 kohta) ja että kyse ei ole teknisestä tai inhimillisestä virheestä.

▼M8

51. Mahdollisissa koejärjestelyn muutoksissa on otettava huomioon tietojen yhdenmukaisuus laboratorion olemassa olevien aiempia kontrolleja koskevien tietokantojen kanssa. Jos havaitaan merkittäviä epäjohdonmukaisuuksia, on luotava uusi aiempien kontrollien tietokanta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten esittäminen

52. Sekä hiiren lymfoomatestistä että TK6-testistä esitettävien tietojen on sisällettävä käsiteltyjen ja kontrolliviljelmien osalta sytotoksisuuden (suhteellinen kokonaiskasvu tai suhteellinen eloonjääneisyys) ja mutaationopeuden laskemiseen tarvittavat tiedot, jotka kuvataan jäljempänä.

53. Hiiren lymfoomatestin osalta yksittäisiä viljelmiä koskevina tietoina on esitettävä suhteellinen suspensiokasvu, suhteellinen kokonaiskasvu, kloonaustehokkuus mutanttien selektion aikana ja mutanttipesäkkeiden lukumäärä (agar-versiosta) tai tyhjien kuoppien lukumäärä (mikrokuoppalevy-versio). Mutaationopeus on ilmoitettava mutanttien solujen lukumääränä miljoonaa eloonjäänyttä solua kohti. Jos vaste on positiivinen, pienten ja suurten pesäkkeiden mutaationopeudet (ja/tai kokonaismutaationopeuden prosenttiosuus) on ilmoitettava vähintään yhdestä testikemikaalin pitoisuudesta (yleensä suurin positiivinen pitoisuus) sekä negatiivisesta ja positiivisesta kontrollista. Jos vaste on negatiivinen, pienten ja suurten pesäkkeiden mutaationopeus on ilmoitettava negatiivisesta ja positiivisesta kontrollista.

54. TK6-testin osalta yksittäisiä viljelmiä koskevina tietoina on esitettävä suhteellinen eloonjääneisyys, kloonaustehokkuus mutanttien selektion aikana sekä tyhjien kuoppien lukumäärä aikaisin ja myöhään ilmaantuvista mutanteista. Mutaationopeus on ilmoitettava mutanttien solujen lukumääränä eloonjääneiden solujen lukumäärää kohti, ja se on ilmoitettava sekä kokonaismutaationopeutena että aikaisin ja myöhään ilmaantuvien mutanttien mutaationopeutena (ja/tai prosenttiosuutena kokonaismutaationnopeudesta).

Hyväksymisperusteet

55. Niin hiiren lymfoomatestissä kuin TK6-testissä seuraavien perusteiden on täytyttävä ennen tietyn testikemikaalin kokonaistulosten määrittämistä:

— Testi toteutettiin kahdenlaisissa olosuhteissa (lyhyt käsittely metabolisen aktivaation läsnä ollessa ja ilman sitä – ks. 33 kohta), ellei toisesta saatu positiivisia tuloksia.

— Soluja ja pitoisuuksia on analysoitu riittävät määrät (ks. 27, 34–36 kohta).

— Suurimman pitoisuuden valintaperusteet vastaavat 28–30 kohdassa esitettyjä kriteerejä.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien hyväksymisperusteet

56. IWGT:n hiiren lymfoomatestin asiantuntijatyöryhmä analysoi suuren määrän hiiren lymfoomatestistä saatuja tietoja, ja tämän analyysin perusteella päädyttiin kansainväliseen yksimielisyyteen nimenomaan hiiren lymfoomatestiä koskevista hyväksymisperusteista (1) (2)(3) (4) (5). Näin ollen tässä testimenetelmässä annetaan erityissuosituksia negatiivisten ja positiivisten kontrollien hyväksyttävyyden määrittämisestä ja yksittäisiä aineita koskevien tuloksien arvioinnista hiiren lymfoomatestissä. TK6-testiä koskeva tietokanta on paljon pienempi, eikä työryhmä ole arvioinut sitä.

▼M8

57. Hiiren lymfoomatestissä jokaisesta kokeesta on arvioitava, täyttääkö käsittelemätön kontrolli / liuotinkontrolli IWGT:n hiiren lymfoomatestin asiantuntijatyöryhmän seuraavat hyväksymisperusteet ((4) ja jäljempänä oleva taulukko 2): 1) mutaationopeus (huomaa, että IWGT on hyväksynyt omat mutaationopeudet hiiren lymfoomatestin agar- ja mikrokuoppalevyversioille), 2) kloonaustehokkuus mutanttien selektion aikana ja 3) liuotinkontrollin suspensiokasvu (ks. laskentakaavat lisäyksestä 2).

Taulukko 2

Hiiren lymfoomatestin hyväksymisperusteet

Parametri	Pehmeä agar -menetelmä	Mikrokuoppalevymenetelmä
Mutaationopeus	$35 – 140 \times 10^{-6}$	$50 – 170 \times 10^{-6}$
Kloonaustehokkuus	65–120 %	65–120 %
Suspensiokasvu	8–32-kertainen (3–4 tunnin käsittely) 32–180-kertainen (24 tunnin käsittely, jos tehty)	8–32-kertainen (3–4 tunnin käsittely) 32–180-kertainen (24 tunnin käsittely, jos tehty)

58. Hiiren lymfoomatestin yhteydessä jokaisesta testistä on arvioitava myös se, täyttääkö positiivinen kontrolli (täyttävätkö positiiviset kontrollit) vähintään toisen kahdesta seuraavasta IWGT-työryhmän laatimasta hyväksymisperusteesta:

— Positiivisen kontrollin on osoitettava kokonaismutaationopeuden absoluuttinen lisääntyminen, jonka on siis oltava suurempi kuin spontaani mutaationopeus taustalla [aiheutettu mutaationopeus], vähintään 300×10^{-6}. Vähintään 40 prosenttia aiheutetusta mutaationopeudesta on näyttävä pienten pesäkkeiden mutaationopeudessa.

— Positiivisessa kontrollissa pienten pesäkkeiden mutaationopeus on lisääntynyt vähintään 150×10^{-6} enemmän kuin samanaikaisessa käsittelemättömässä / liuotinkontrollissa (pienten pesäkkeiden aiheutettu mutaationopeus 150×10^{-6}).

59. TK6-testiä pidetään hyväksyttävänä, jos samanaikainen negatiivinen kontrolli katsotaan voitavan lisätä laboratorion aikaisempien negatiivisten kontrollien tietokantaan 48–49 kohdassa kuvatun mukaisesti. Lisäksi samanaikaisten positiivisten kontrollien (ks. 32 kohta) on aiheutettava vasteita, jotka ovat yhteensopivia aikaisempien positiivisten kontrollien tietokannan vasteiden kanssa ja tuottavat tilastollisesti merkitsevää lisääntymistä verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin.

60. Kummassakin testissä positiivisessa kontrolliviljelmässä havaitun sytotoksisuuden ylärajan on oltava sama kuin kokeellisissa viljelmissä. Toisin sanoen suhteellisen kokonaiskasvun / suhteellisen eloonjääneisyyden on oltava vähintään 10 prosenttia. Yhden pitoisuuden käyttäminen (tai yhden positiivisen kontrollin viljelmien pitoisuuksista, jos käytetään useampaa kuin yhtä pitoisuutta) riittää osoittamaan, että positiivisen kontrollin hyväksymisperusteet ovat täyttyneet. Lisäksi positiivisen kontrollin mutaationopeuden on oltava laboratoriolle määritetyn hyväksyttävyysalueen mukainen.

Tulosten arviointi ja tulkinta

61. Hiiren lymfoomatestin osalta IWGT:n hiiren lymfoomatestin asiantuntijatyöryhmä on tehnyt huomattavan paljon töitä biologisen merkityksellisyyden ja positivista vastetta koskevien kriteerien eteen (4). Siksi tässä testimenetelmässä

▼M8

annetaan erityissuosituksia hiiren lymfoomatestillä testattuja testikemikaaleja koskevien tulosten tulkintaan (ks. 62–64 kohta). TK6-testiä koskeva tietokanta on paljon pienempi, eikä työryhmä ole arvioinut sitä. Sen vuoksi TK6-testistä saatujen tietojen tulkintaa koskevat suositukset ovat paljon yleisluonteisempia (ks. 65–66 kohta). Lisäsuositukset koskevat kumpaakin testiä (ks. 67–71 kohta).

Hiiren lymfoomatesti

62. Positiivisten ja negatiivisten vasteiden määrittämiseen suositellaan tiettyä lähestymistapaa, jotta voidaan varmistaa, että lisääntynyt mutaationopeus on biologisesti merkityksellinen. Yleensä muiden testien yhteydessä käytettävän tilastoanalyysin sijasta tämä lähestymistapa perustuu ennalta määritetyn aiheutetun mutaationopeuden (mutaationopeuden lisääntyminen samanaikaista kontrollia suuremmaksi) käyttöön. Tämä nopeus määritetään globaalilla arviointikertoimella (global evaluation factor, GEF), joka pohjautuu osallistuvilta laboratorioilta saatujen negatiivisen kontrollin mutaationopeustietojen jakaumaan (4). Hiiren lymfoomatestin agar-versiossa globaali arviointikerroin on 90×10^{-6} ja mikrokuoppalevyversiossa se on 126×10^{-6}.

63. Mikäli kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi positiivinen, jos missä tahansa tarkastelluista koeolosuhteista (ks. 33 kohta) samanaikaista taustanopeutta suuremmaksi lisääntyvä mutaationopeus ylittää globaalin arviointikertoimen ja jos lisääntyminen liittyy pitoisuuteen (selvitetään esimerkiksi trenditestillä). Tällöin katsotaan, että testikemikaali voi aiheuttaa mutaatioita tässä testijärjestelmässä.

64. Mikäli kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan selvästi negatiivinen, jos missä tahansa tarkastelluista koeolosuhteista (ks. 33 kohta) pitoisuuteen liittyvää vastetta ei ilmaannu, tai jos mutaationopeus lisääntyy, se ei kuitenkaan ylitä globaalia arviointikerrointa. Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali voi aiheuttaa mutaatioita tässä testijärjestelmässä.

TK6

65. Mikäli kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi positiiviseksi, jos jossakin tarkastelluista koeolosuhteista (ks. 33 kohta):

— vähintään yksi testipitoisuuksista aiheuttaa tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna rinnakkaiseen negatiiviseen kontrolliin

— kasvu liittyy pitoisuuteen, kun sitä arvioidaan asianmukaisella trenditestillä (ks. 33 kohta)

— mikä tahansa tuloksista on aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman ulkopuolella (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja; ks. 48 kohta).

Kun kaikki nämä perusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan voivan aiheuttaa mutaatioita tässä testijärjestelmässä. Lähdekirjallisuudessa on suosituksia sopivimmista tilastomenetelmistä (66) (67).

66. Mikäli kaikki hyväksyttävyysperusteet täyttyvät, testikemikaali katsotaan selvästi negatiiviseksi, jos kaikissa tarkastelluissa koeolosuhteissa (ks. 33 kohta):

— mikään testipitoisuuksista ei aiheuta tilastollisesti merkitsevää kasvua verrattuna samanaikaiseen negatiiviseen kontrolliin

— pitoisuuteen liittyvää kasvua ei esiinny asianmukaisella trenditestillä arvioituna

▼M8

— kaikki tulokset ovat aikaisempien negatiivisten kontrollitietojen jakauman rajoissa (esimerkiksi Poissonin jakaumaan perustuva 95 prosentin kontrolliraja; ks. 48 kohta).

Tällöin katsotaan, ettei testikemikaali voi aiheuttaa mutaatioita tässä testijärjestelmässä.

Sekä hiiren lymfoomatesti että TK-6-testi:

67. Jos enimmäispitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, suurimmalla pitoisuudella pitäisi saavuttaa 20 ja 10 prosentin välillä vaihteleva suhteellinen kokonaiskasvu / suhteellinen eloonjääneisyys. Asiantuntijat ovat yksimielisiä siitä, että on syytä suhtautua varauksellisesti, kun tulkitaan sellaisia positiivisia tuloksia, joiden mukaan suhteellinen kokonaiskasvu / suhteellinen eloonjääneisyys on vain välillä 20 tai 10 prosenttia, ja kun tulosta ei katsottaisi positiiviseksi, jos mutaationopeus lisääntyisi vain siten, että se olisi enintään 10 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä (mikäli arvioitu) (2) (59).

68. Tietyissä tilanteissa lisätiedoista voi olla apua testikemikaalin ei-mutageenisuuden selvittämisessä, jos ei ole sellaista viljelmää, johon liittyvä suhteellisen kokonaiskasvun arvo olisi 10–20 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä. Nämä tilanteet ovat seuraavat: 1) Näyttöä mutageenisuudesta ei ole (esimerkiksi ei annosvastetta, ei suurempia mutaationopeuksia kuin samanaikaisissa negatiivisissa kontrolleissa tai aikaisemmissa taustavaihteluväleissä jne.) sarjassa datapisteitä, jotka ulottuvat välille 100 prosenttia ja 20 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä ja kun vähintään yksi datapiste on välillä 20 ja 25 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä. 2) Näyttöä mutageenisuudesta ei ole (esimerkiksi ei annosvastetta, ei suurempia mutaationopeuksia kuin samanaikaisissa negatiivisissa kontrolleissa tai aikaisemmissa taustavaihteluväleissä jne.) sarjassa datapisteitä, jotka ulottuvat välille 100 prosenttia ja 25 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä ja kun on myös negatiivinen datapiste, joka on hieman alle 10 prosenttia suhteellisesta kokonaiskasvusta / suhteellisesta eloonjääneisyydestä. Kummassakin näissä tapauksessa testikemikaalin voidaan katsoa olevan negatiivinen.

69. Selvästi positiivista tai negatiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa.

70. Jos vaste ei ole selvästi negatiivinen eikä selvästi positiivinen edellä kuvatulla tavalla ja/tai tuloksen biologisen merkityksellisyyden vahvistaminen kaipaa tukea, tietoja tulee arvioida asiantuntija-arvion ja /tai lisätutkimusten avulla. Kokeen toistaminen käyttäen mahdollisesti modifioituja testiolosuhteita [esimerkiksi pitoisuusvälien muuttaminen, jotta parannetaan todennäköisyyttä saada datapisteitä, jotka sijoittuvat suhteellisen kokonaiskasvun / suhteellisen eloonjääneisyyden välille 10–20 prosenttia, muiden metabolisten aktivaatio-olosuhteiden (kuten S9-jakeen pitoisuus tai alkuperä) käyttäminen ja käsittelyn keston muuttaminen saattaa olla hyödyllistä.

71. Harvoissa tapauksissa edes lisätutkimusten pohjalta ei voida päätellä, että testikemikaali tuottaa positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Tällöin testikemikaalin vaste jää epäselväksi (sen tulkitaan olevan yhtä todennäköisesti positiivinen tai negatiivinen).

TESTIRAPORTTI

72. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— alkuperä, eränumero, viimeinen käyttöpäivä, jos sellainen on

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— tutkittavan kemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

▼**M8**

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Liuotin:

— liuottimen valintaperusteet

— liuottimen pitoisuus lopullisessa kasvatusliuoksessa.

Solut:

Laboratorion kantaviljelmät:

— solujen tyyppi ja lähde sekä niiden historia testauslaboratoriossa

— karyotyypin ominaisuudet ja/tai kromosomien modaalinen lukumäärä

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät.

— mykoplasman puuttuminen

— solujen kaksinkertaistumisajat.

Testiolosuhteet:

— pitoisuuksien valintaperusteet ja soluviljelmien lukumäärä, myös esimerkiksi sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset

— kasvatusliuosten koostumus, hiilidioksidipitoisuus, kosteustaso

— testikemikaalin pitoisuus ilmaistuna lopullisena pitoisuutena kasvatusliuoksessa (esim. µg tai mg/ml tai mM kasvatusliuoksessa)

— kasvatusliuokseen lisätyn liuottimen ja testikemikaalin pitoisuus (ja/tai tilavuus)

— inkubointilämpötila

— inkubointiaika

— altistuksen kesto

— solutiheys altistuksen aikana

▼**M8**

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus (S9-jakeen alkuperä, S9-seoksen valmistusmenetelmä, S9-seoksen ja S9-jakeen pitoisuus tai tilavuus lopullisessa viljelynesteessä, S9-jakeen laadunvalvonta)

— positiiviset ja negatiiviset kontrolliaineet, kaikkien käsittelyolosuhteiden lopulliset pitoisuudet

— ilmentymisajan pituus (myös kylvettyjen solujen lukumäärä ja jatkoviljelmät ja kasvatusliuoksen vaihtoajat tarvittaessa)

— selektiivisen aineen tunnistetiedot ja sen pitoisuus

— hiiren lymfoomatestin käytetty versio (agar vai mikrokuoppalevy)

— testien hyväksyttävyyttä koskevat perusteet

— elinkykyisten ja mutanttien solujen laskentamenetelmät

— sytotoksisuuden mittauksessa käytetyt menetelmät

— muut sytotoksisuuteen ja käytettyyn menetelmään liittyvät tiedot

— inkubointiaikojen kesto maljauksen jälkeen

— pesäkkeiden määritelmät, kun pesäkkeen koko ja tyyppi on otettu huomioon (myös ”pienten” ja ”suurten” pesäkkeiden kriteerit tarvittaessa)

— tutkimusten positiivisuuden, negatiivisuuden tai epäselvyyden arviointiperusteet

— pH:n, osmolaliteetin ja saostumisen määritysmenetelmät, jos määritetty ja tarpeen.

Tulokset:

— altistettujen solujen lukumäärä ja jokaisesta viljelmästä jatkoviljeltyjen solujen lukumäärä

— toksisuusparametrit (hiiren lymfoomatestistä suhteellinen kokonaiskasvu ja TK6-testistä suhteellinen eloonjääneisyys)

— saostumisen merkit ja määrittämisajankohta

— selektiiviseen ja ei-selektiiviseen kasvatusliuokseen maljattujen solujen lukumäärä

— ei-selektiivisessä kasvatusliuoksessa olevien pesäkkeiden lukumäärä ja selektiivisessä kasvatusliuoksessa olevien resistenttien pesäkkeiden lukumäärä ja niihin liittyvät mutaationopeudet

— pesäkkeen koot negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa ja tieto siitä, onko testikemikaali positiivinen vähintään yhdellä pitoisuudella, ja siihen liittyvät mutaationopeudet

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— samanaikaisten negatiivisten (liuotin) ja positiivisten kontrollien tiedot (pitoisuudet ja liuottimet)

— aikaisemmat negatiivisista (liuotin) ja positiivisista kontrolleista saadut tiedot (pitoisuudet ja liuottimet), myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat niiden testien lukumäärä, joihin aikaisemmat kontrollit perustuvat

▼**M8**

— tilastoanalyysit (yksittäisistä viljelmistä ja yhdistetyistä rinnakkaisviljelmistä, jos tarpeen) sekä mahdolliset p-arvot hiiren lymfoomatestistä globaalia arviointikerrointa koskeva arviointi.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185–190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292–299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127–140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1–5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36–40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21–28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101–114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci., 109 (1): 96–105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51–55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169–181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237–242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161–174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143–153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77–87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89–98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203–14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89–95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27–50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177–183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439–452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879–886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297–305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147–204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185–190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673–680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59 (1): 61–108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243–253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181–193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127–131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35–42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157–165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263–268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162–176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12–15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Tekeillä oleva käsikirjoitus.)

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Teoksessa: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467–485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261–287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287–294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347–364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173–215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83–90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277–290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55–65.

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175–177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Teoksessa: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241–261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51–59.

(52) UNEP (2001). Pysyviä orgaanisia yhdisteitä koskeva Tukholman yleissopimus, Yhdistyneiden kansakuntien ympäristöohjelma (UNEP).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Teoksessa: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.) New York, Plenum, s. 91–103.

(54) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. ja Brooks, A. L. (1983). (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795–801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122–130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Teoksessa: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, s. 66–101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32–56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36–43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Saatavana osoitteessa [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373–384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363–378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9–17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1–8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87–90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Aneugeeni: Kemikaali tai prosessi, joka on vuorovaikutuksessa solun mitoottisen ja meioottisen jakautumissyklin vaiheiden kanssa ja johtaa solujen tai organismien aneuploidiaan.

Aneuploidia: Yksittäisen tai useamman kuin yhden kromosomin mutta ei kuitenkaan koko kromosomiston (polyploidia) poikkeaminen kromosomien tavallisesta diploidisesta (tai haploidisesta) määrästä.

Emäsparien korvautumista aiheuttavat mutageenit: Kemikaaleja, jotka aiheuttavat emäsparien korvautumisen DNA:ssa.

Kemikaali: Aine tai seos.

Kloonaustehokkuus: Niiden harvakseltaan maljattujen solujen prosenttiosuus, jotka pystyvät kasvamaan pesäkkeeksi, joka voidaan laskea.

Klastogeeni: Kemikaali tai prosessi, joka aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia solu- tai organismipopulaatioissa.

Sytotoksisuus: Tämän testimenetelmän mukaisissa testeissä sytotoksisuus määritellään hiiren lymfoomatestissä suhteellisen kokonaiskasvun vähenemisenä ja TK6-testissä suhteellisen eloonjääneisyyden vähenemisenä.

Forward-mutaatio: Geenin mutaatio parentaalisesta tyypistä mutanttimuotoon, minkä seurauksena geenin koodittama proteiini menettää entsymaattisen aktiivisuutensa tai tehtävänsä tai ne muuttuvat.

Lukukehyksensiirtomutageenit: Kemikaaleja, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA-molekyylissä.

Genotoksinen: Yleinen nimitys kaikentyyppisille DNA- tai kromosomivaurioille, muun muassa DNA:n katkeamiselle, addukteille, uudelleenjärjestäytymiselle, mutaatioille, kromosomipoikkeavuuksille ja aneuploidialle. Kaikki genotoksiset vaikutukset eivät johda mutaatioihin tai pysyviin kromosomivaurioihin.

Mitoottinen rekombinaatio: Mitoosin aikana tapahtuva kahden homologisen kromatidin rekombinaatio, joka voi saada aikaan DNA:n kahden säikeen katkeamisen tai heterotsygoottisuuden häviämisen.

Mutageeninen: Aiheuttaa periytyvän muutoksen geenien DNA:n emäsparirakenteessa (-rakenteissa) tai kromosomirakenteessa (kromosomipoikkeavuudet).

Mutaationopeus: Todettu mutanttien solujen lukumäärä jaettuna elinkykyisten solujen määrällä.

Fenotyypin ilmentymisaika: Altistuksen jälkeinen aika, jona geneettinen muutos kiinnittyy genomiin ja mahdolliset aikaisemmat geenituotteet poistuvat siten, että fenotyyppinen ominaisuus muuttuu.

Suhteellinen eloonjääneisyys: TK6-testissä suhteellista eloonjääneisyyttä käytetään altistukseen liittyvän sytotoksisuuden mittarina. Se tarkoittaa heti solujen käsittelyn jälkeen maljattujen solujen suhteellista kloonaustehokkuutta mukautettuna mahdollisella soluhäviöllä käsittelyn aikana verrattuna negatiivisen kontrollin kloonaustehokkuuteen.

▼M8

Suhteellinen suspensiokasvu (RSG): Hiiren lymfoomatestissä testiviljelmän suhteellinen kahden päivän kokonaissuspensiokasvu verrattuna negatiivisen/liuotinkontrollin kahden päivän kokonaissuspensiokasvuun (Clive ja Spector, 1975). Suhteellisen suspensiokasvun tulee sisältää testiviljelmän suhteellinen kasvu verrattuna negatiiviseen/liuotinkontrolliin käsittelyjakson aikana.

Suhteellinen kokonaiskasvu (RTG): Hiiren lymfoomatestissä suhteellista kokonaiskasvua käytetään altistukseen liittyvän sytotoksisuuden mittarina. Sillä mitataan testiviljelmien suhteellista kasvua (kantaja-ainekontrolliin verrattuna) käsittelyn aikana, kahden päivän ilmentymistä sekä testin mutanttien selektion kloonausvaiheita. Jokaisen testiviljelmän suhteellinen suspensiokasvu kerrotaan testiviljelmän suhteellisella kloonaustehokkuudella mutanttien selektion aikana, ja se ilmaistaan suhteessa negatiivisen/liuotinkontrollin kloonaustehokkuuteen (Clive ja Spector, 1975).

Maksasta eristetty S9-jae: Maksahomogenaatin supernatantti 9 000 g:n sentrifugoinnin jälkeen, ts. käsittelemätön maksanäyte.

S9-seos: Maksasta eristetyn S9-jakeen ja metabolisen entsyymitoiminnan kannalta välttämättömien kofaktorien seos.

Suspensiokasvu (SG): Solujen määrän kasvu hiiren lymfoomatestin käsittelyn aikana ja ilmentymisvaiheissa. Suspensiokasvu lasketaan kertomalla päivän 1 kasvu päivän 2 kasvulla lyhyen (3–4 tunnin) käsittelyn yhteydessä. Jos käytetään 24 tunnin käsittelyä, suspensiokasvu on 24 tunnin aikana tapahtunut kasvu kerrottuna ilmentymispäivinä 1 ja 2 tapahtuneella kasvulla.

Liuotinkontrolli: Yleinen nimitys kontrolliviljelmille, joihin lisätään vain testikemikaalin liuottamiseen käytettyä liuotinta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Käsittelemättömät kontrollit: Käsittelemättömät kontrollit ovat soluviljelmiä, joita ei altisteta (eli joihin ei lisätä testikemikaalia eikä liuotinta) mutta jotka käsitellään samalla tavoin kuin testikemikaalille altistettavat viljelmät.

▼M8

Lisäys 2

LASKENTAKAAVAT

Sytotoksisuus

Hiiren lymfoomatestin molemmat versiot (agar ja mikrokuoppalevy):

Sytotoksisuus määritellään suhteellisena kokonaiskasvuna (RTG), johon sisältyy suhteellinen suspensiokasvu (RSG) kahden päivän ilmentymisaikana ja suhteellinen kloonaustehokkuus (RCE) mutanttien selektion aikana. Kaikki nämä ilmoitetaan prosenttiosuuksina.

Suhteellinen suspensiokasvu (RSG) lasketaan seuraavasti: Suspensiokasvu 1 (SG_1) on kasvunopeus päivän 0 ja päivän 1 välillä (solupitoisuus päivänä 1 / solupitoisuus päivänä 0), ja suspensiokasvu 2 (SG_2) on kasvunopeus päivän 1 ja päivän 2 välillä (solupitoisuus päivänä 2 / solupitoisuus päivänä 1). Suhteellinen suspensiokasvu (RSG) on käsitellyn viljelmän kokonaissuspensiokasvu (SG_1 x SG_2) verrattuna käsittelemättömään kontrolliin / liuotinkontrolliin. Toisin sanoen: RSG = [$SG_{1(testi)}$ x $SG_{2(testi)}$] / [$SG_{1(kontrolli)}$ x $SG_{2(kontrolli)}$] SG_1 on laskettava solujen käsittelyn alussa käytetyn alkuperäisen solupitoisuuden perusteella. Tämä tarkoittaa mahdollista differentiaalista sytotoksisuutta, joka ilmenee testiviljelmässä (-viljelmissä) solujen käsittelyn aikana.

RCE on testiviljelmän suhteellinen kloonaustehokkuus verrattuna käsittelemättömän kontrollin / liuotinkontrollin suhteelliseen kloonaustehokkuuteen mutanttien selektion aikana.

Suhteellinen kokonaiskasvu (RTG): RTG=RSG x RCE

TK6

Suhteellinen eloonjääneisyys (RS):

Sytotoksisuutta arvioidaan suhteellisella eloonjääneisyydellä eli maljattujen solujen kloonaustehokkuudella (CE) heti altistuksen jälkeen mahdolliseen altistuksen aikaiseen solukatoon mukautettuna ja verrattuna negatiivisten kontrollien kloonaustehokkuuteen (joille määritetty eloonjääneisyys on 100 %). Käsittelyn aikaiseen solukatoon mukautus lasketaan näin:

$$\text{Mukautettu CE} = \text{CE} \times \frac{\textit{Number of cells at the end of treatment}}{\textit{Number of cells at the beginning of treatment}}$$

Testikemikaalille altistetun viljelmän suhteellinen eloonjääneisyys lasketaan näin:

$$RS = \frac{\textit{Adjusted CE in the treated culture}}{\textit{Adjusted CE in the solvent control}} \times 100$$

Mutaationopeus sekä hiiren lymfoomatestissä että TK-6-testissä

Mutaationopeus (MF) on selektiivisellä alustalla todettujen mutanttipesäkkeiden kloonaustehokkuus (CE_M) mukautettuna ei-selektiivisen alustan kloonaustehokkuudella mutanttien selektion aikana (CE_V). Laskentakaava on siis MF=CE_M/CE_V. Näiden kahden kloonaustehokkuuden laskenta agar- ja mikrokuoppakloonausmenetelmiä käytettäessä kuvataan jäljempänä.

▼**M8**

Hiiren lymfoomatestin agar-versio: Hiiren lymfoomatestin pehmeä agar -versiossa pesäkkeiden lukumäärä mutanttien selektiolevyllä (C_M) ja pesäkkeiden lukumäärä valikoimattomat- tai kloonaustehokkuus (elinkykyisten määrä) -levyllä (C_V) saadaan laskemalla kloonit suoraan. Kun 600 solua maljataan mutanttien selektiolevyille (CE_M) kloonaustehokkuutta varten (CE_V) ja valikoimattomat- tai kloonaustehokkuus (elinkykyisten määrä) -levyille ja mutanttien selektioon käytetään 3 x 10^6 solua, laskentakaavat ovat

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

Hiiren lymfoomatestin ja TK6-testin mikrokuoppalevyversio Hiiren lymfoomatestin mikrokuoppalevyversiossa C_M ja C_V määritetään mikrokuoppien kokonaismäärän tuotteeksi (TW) ja todennäköiseksi pesäkemääräksi kuoppaa kohti (P) mikrokuoppalevyillä.

$C_M = P_M \times TW_M$

$CV = P_V \times TW_V$

Poissonin jakauman nollaehdosta (Furth ja muut, 1981) P saadaan kaavalla

$P = - \ln (EW / TW)$

EW tarkoittaa tyhjiä kuoppia (empty wells) ja TW kaikkia kuoppia yhteensä (total wells). Näin ollen

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

Hiiren lymfoomatestin mikrokuoppalevyversiossa pienten ja suurten pesäkkeiden mutaationopeudet lasketaan samalla tavalla käyttämällä asianmukaista tyhjien kuoppien lukua pienistä ja suurista pesäkkeistä.

TK6-testissä pienten ja suurten pesäkkeiden mutaationopeudet lasketaan aikaisin ja myöhään ilmaantuvien mutanttien perusteella.

▼M8

B.68. **LYHYTAIKAISEEN ALTISTUKSEEN PERUSTUVA IN VITRO -TESTIMENETELMÄ, JOLLA VOIDAAN MÄÄRITTÄÄ i) VAKAVIA SILMÄVAURIOITA AIHEUTTAVAT KEMIKAALIT JA ii) KEMIKAALIT, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 491 (2017). Lyhytaikainen altistus (LA) -testimenetelmä on in vitro -menetelmä, jota voidaan käyttää tietyissä oloissa ja tietyin rajoituksin vakavia silmävaurioita aiheuttavien sekä sellaisten kemikaalien (aineiden ja seosten), jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, vaaraluokitukseen ja merkintöihin Yhdistyneiden kansakuntien (YK) maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmässä (GHS) (1) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa Euroopan unionin (EU) asetuksessa 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti.

2. Monien vuosien ajan kemikaalien silmävaarallisuuspotentiaalia on arvioitu ensisijaisesti käyttämällä *in vivo* -kaninsilmätestiä (TM B.5 (8), vastaa OECD:n testiohjetta 405). On yleisesti hyväksyttyä, ettei *in vivo* -kaninsilmätestiä voida korvata lähitulevaisuudessa yhdellä ainoalla vaihtoehtoisella *in vitro* -testillä, kun tavoitteena on ennustaa vakavaan silmävaurioon/silmä-ärsytykseen liittyvät vasteet kokonaisuudessaan eri kemikaaliluokissa. Kaninsilmätesti saatetaan kuitenkin voida korvata kokonaan (vaiheittaisessa) testausstrategiassa käytettävien vaihtoehtoisten testimenetelmien strategisilla yhdistelmillä (2). Ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa on suunniteltu sellaisten kemikaalien testaamiseen, joilla nykyisten tietojen perusteella voidaan olettaa olevan suuri ärsyttävyyspotentiaali tai joiden voidaan odottaa aiheuttavan vakavia silmävaurioita. Alhaalta ylöspäin suuntautuvaa lähestymistapa on puolestaan suunniteltu sellaisten kemikaalien testaamiseen, joista nykyisten tietojen perusteella voidaan odottaa, etteivät ne aiheuta sellaista silmä-ärsytystä, joka vaatisi luokitusta. Vaikka lyhytaikaiseen altistukseen perustuvan testimenetelmän ei katsota korvaavan *in vivo* -kaninsilmätestiä kokonaisuudessaan, sitä voidaan käyttää osana vaiheittaista testausstrategiaa sääntelyyn pohjautuvassa luokitus- ja merkintämenettelyssä (kuten ylhäältä alaspäin tai alhaalta ylöspäin suuntautuva lähestymistapa), jotta voidaan tunnistaa ilman lisätestausta i) kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1), ja ii) kemikaalit (paitsi erittäin haihtuvat aineet ja kaikki muut kiinteät kemikaalit kuin pinta-aktiiviset aineet), jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”) (1) (2). Kemikaali, jonka ei lyhytaikaiseen altistukseen perustuvalla testimenetelmällä ennusteta aiheuttavan vakavia silmävaurioita (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) eikä aiheuttavan vakavia silmävaurioita tai silmä-ärsytystä (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), vaatii kuitenkin lisätestausta, jotta lopullinen luokitus voidaan määrittää. Lisäksi asianmukaisilta sääntelyviranomaisilta tulisi pyytää ohjeita, ennen kuin lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa menetelmää käytetään alhaalta ylöspäin suuntautuvassa lähestymistavassa jonkin muun luokitusjärjestelmän kuin YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisen järjestelmän mukaisesti. Sopivimman testimenetelmän valintaa ja kyseisen testimenetelmän käyttöä on tarkasteltava OECD:n vakavien silmävaurioiden ja silmä-ärsytyksen testausta ja arviointia koskevia yhdennettyjä lähestymistapoja käsittelevän ohjeasiakirjan yhteydessä (14).

3. Tässä testimenetelmässä kuvataan menettelyt, joilla arvioidaan testikemikaalin silmävaarallisuuspotentiaali selvittämällä sen kyky aiheuttaa sytotoksisuutta lyhytaikaiseen altistukseen perustuvalla testimenetelmällä. Kemikaalien sytotoksinen

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M8

vaikutus sarveiskalvon epiteelisoluihin on tärkeä vaikutustapa, joka johtaa sarveiskalvon epiteelin vaurioitumiseen ja silmä-ärsytykseen. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä solujen elinkykyä arvioidaan kvantitatiivisella mittauksella sen jälkeen, kun solut on uutettu sinisestä formatsaanisuolasta, jota elävät solut tuottavat muuntamalla väriaine MTT:tä (3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi), joka tunnetaan myös nimellä tiatsolyylisininen (3), entsymaattisesti. Näiden solujen elinkykyä verrataan liuotinkontrolliin (suhteellinen elinkyky) ja käytetään testikemikaalin mahdollisen silmävaarallisuuden arvioimisessa. Testikemikaali luokitellaan YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan 1, kun sekä 5 prosentin että 0,05 prosentin pitoisuus johtaa solujen elinkykyyn, joka on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) 70 prosenttia. Vastaavasti kemikaali luokitellaan YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan ”Ei luokitusta”, kun sekä 5 prosentin että 0,05 prosentin pitoisuus johtaa siihen, että solujen elinkyky on suurempi kuin (>) 70 prosenttia.

4. Tässä testimenetelmässä ilmauksella ’testikemikaali’ tarkoitetaan sitä, mitä testataan, eikä ilmaus liity lyhytaikaiseen altistukseen perustuvan testimenetelmän sovellettavuuteen aineiden ja/tai seosten testaamisessa. Määritelmät esitetään lisäyksessä.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

5. Tämä testimenetelmä perustuu Kao Corporationin kehittämään protokollaan (4), jolle on tehty kaksi erilaista validointitutkimusta: yhden teki vaihtoehtoja eläinkokeille kehittävän Japanese Society for Alternative toAnimal Experiments (JSAAE) -yhteisön validointikomitea (5) ja toisen vaihtoehtoisten menetelmien validoinnista vastaava keskus Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6). Vertaisarvioinnin teki NICEATM/ICCVAM validointitutkimusraporttien ja testimenetelmän tausta-asiakirjojen perusteella (7).

6. Kun lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää käytettiin vakavia silmävaurioita aiheuttavien kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamisessa (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1 (1)), menetelmällä 125 kemikaalista (sekä aineista että seoksista) saatujen tietojen kokonaistarkkuus oli 83 prosenttia (104/125), väärien positiivisten tulosten osuus oli 1 prosentti (1/86) ja väärien negatiivisten tulosten osuus oli 51 prosenttia (20/39) verrattuna *in vivo* -kaninsilmätestiin (7). Mainittu väärien negatiivisten tulosten osuus ei ole tässä asiayhteydessä merkittävä, koska kaikki testikemikaalit, joiden aiheuttama solujen elinkyky on 5 prosentin pitoisuudella ≤ 70 prosenttia ja 0,05 prosentin pitoisuudella > 70 prosenttia, testattaisiin myös muilla asianmukaisesti validoiduilla *in vitro* -testimenetelmillä tai viimesijaisena vaihtoehtona *in vivo* -kaninsilmätestillä sen mukaan, mitkä ovat sääntelyvaatimukset, ja tällä hetkellä suositeltujen vaiheittaisen testausstrategian ja näyttöön perustuvien lähestymistapojen mukaisesti (1) (8). Testatut aineet olivat enimmäkseen yhdestä ainesosasta koostuvia, joskin saatavilla on myös jonkin verran tietoa seosten testaamisesta. Teknisesti testimenetelmää voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta koostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä ei havaittu erityisiä puutteita, kun sitä käytettiin testikemikaalien määrittämisessä YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan 1. Tutkijoiden kannattaa siis harkita tämän testimenetelmän käyttämistä testikemikaaleihin, ja kun solujen elinkyky on sekä 5 prosentin että 0,05 prosentin pitoisuudella ≤ 70 prosenttia, tuloksen on katsottava viittaavan vakavia silmävaurioita aiheuttavaan vasteeseen, ja kemikaali on luokiteltava YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan 1 ilman lisätestausta.

▼**M8**

7. Kun lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää käytettiin sellaisten kemikaalien (aineiden ja seosten) tunnistamisessa, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen ja vakavan silmävaurion osalta (ts. YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), menetelmällä 130 kemikaalista (sekä aineista että seoksista) saatujen tietojen kokonaistarkkuus oli 85 prosenttia (110/130), väärien negatiivisten tulosten osuus oli 12 prosenttia (9/73) ja väärien positiivisten tulosten osuus oli 19 prosenttia (11/57) verrattuna *in vivo* -kaninsilmätestiin (7). Kun aineistosta poistetaan erittäin haihtuvat aineet ja muut kiinteät aineet kuin pinta-aktiiviset aineet, kokonaistarkkuus on 90 prosenttia (92/102), väärien negatiivisten osuus 2 prosenttia (1/54) ja väärien positiivisten osuus 19 prosenttia (9/48) (7). Kun lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää käytetään sellaisten testikemikaalien tunnistamisessa, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen ja vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), menetelmän puutteet ovat siis suuri väärien negatiivisten tulosten osuus i) sellaisten erittäin haihtuvien aineiden osalta, joiden höyrynpaine on yli 6 kPa, ja ii) muiden kiinteiden kemikaalien (aineiden ja seosten) kuin pinta-aktiivisten aineiden ja vain niistä koostuvien seosten osalta. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää ei voida käyttää tällaisten kemikaalien testaamiseen (7).

8. Edellä 6 ja 7 kohdassa mainittujen kemikaalien lisäksi lyhytaikaiseen altistukseen perustuvalla testimenetelmällä saatu aineisto sisältää myös sisäisiä tietoja 40 seoksesta. Draizen *in vivo* -silmätestiin verrattuna tämän aineiston tarkkuus oli 88 prosenttia (35/40), väärien positiivisten tulosten osuus 50 prosenttia (5/10) ja väärien negatiivisten tulosten osuus 0 prosenttia (0/30), kun tarkoituksena oli määrittää seoksia, jotka eivät vaadi luokitusta YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen nojalla (9). Näin ollen lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää voidaan soveltaa sellaisten seosten määrittämiseen, jotka luokitellaan YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan ”Ei luokitusta” alhaalta ylöspäin suuntautuvalla lähestymistavalla, lukuun ottamatta muita kiinteitä seoksia kuin vain pinta-aktiivisista aineista koostuvia; näin siis laajennetaan sen kiinteitä aineita koskevaa rajoitusta. Lisäksi seokset, jotka sisältävät aineita, joiden höyrynpaine on yli 6 kPa, on arvioitava huolellisesti, jotta vältetään mahdolliset aliennusteet, ja niille on esitettävä tapauskohtaiset perustelut.

9. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa testimenetelmää ei voida käyttää määritettäessä sellaisia testikemikaaleja, jotka kuuluvat YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 2 tai YK:n GHS-järjestelmän luokkaan 2A (silmä-ärsytys) taikka 2B (lievä silmä-ärsytys), koska huomattava määrä YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 1 kemikaaleista on aliennustettu luokkaan 2, 2A tai 2B ja luokan ”Ei luokitusta” kemikaaleja on yliennustettu luokkaan 2, 2A tai 2B (7). Tätä varten saattaa olla tarpeen tehdä lisää testejä muilla soveltuvilla menetelmillä.

10. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva testimenetelmä sopii testikemikaaleille, jotka liukenevat tai suspendoituvat tasaisesti vähintään 5 minuutissa fysiologiseen suolaliuokseen, 5-prosenttiseen dimetyylisulfoksidiin (DMSO) suolaliuoksessa tai mineraaliöljyyn. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva testimenetelmä ei sovi testikemikaaleille, jotka ovat liukenemattomia tai jotka eivät suspendoidu tasaisesti vähintään 5 minuutissa fysiologiseen suolaliuokseen, 5-prosenttiseen dimetyylisulfoksidiin (DMSO) suolaliuoksessa tai mineraaliöljyyn. Mineraaliöljyä voidaan käyttää tässä testimenetelmässä, koska altistus kestää lyhyen aikaa. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva testimenetelmä sopii siis veteen liukenemattomien testikemikaalien (esimerkiksi pitkäketjuisten rasva-alkoholien tai ketonien) silmävaarallisuuspotentiaalin ennustamiseen, kunhan ne voidaan sekoittaa vähintään yhteen edellä ehdotetuista liuottimista (4).

▼M8

11. Tässä testimenetelmässä ilmauksella ’testikemikaali’ tarkoitetaan sitä, mitä testataan ([1]), eikä ilmaus liity lyhytaikaiseen altistukseen perustuvan testimenetelmän sovellettavuuteen aineiden ja/tai seosten testaamisessa.

TESTIN PERIAATE

12. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva testimenetelmä on sytotoksisuuteen pohjautuva in vitro -testi. Se tehdään konfluenteilla yksikerroksisilla Statens Seruminstitutin kanin sarveiskalvosoluilla (SIRC-solut), joita viljellään 96-kuoppaisella polykarbonaattimikrolevyllä (4). Soluja altistetaan testikemikaalille viisi minuuttia, ja sen jälkeen sytotoksisuus mitataan kvantitatiivisesti SIRC-solujen suhteellisena elinkykynä MTT-määritystä käyttämällä (4). Solujen elinkyvyn heikentymisen perusteella ennustetaan mahdolliset haittavaikutukset, jotka aiheuttavat silmävaurion.

13. On todettu, että 80 prosenttia kanin silmään tiputetusta liuoksesta erittyy sidekalvopussin kautta 3–4 minuutin kuluessa, kun taas yli 80 prosenttia ihmisen silmään tiputetusta liuoksesta erittyy 1–2 minuutin kuluessa (10). Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvan testimenetelmän tavoitteena on arvioida nämä altistumisajat ja käyttää sytotoksisuutta päätetapahtumana, kun arvioidaan SIRC-soluihin syntyneen vaurion laajuutta viiden minuutin testikemikaalille altistuksen jälkeen.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

14. Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tässä testimenetelmässä kuvattua lyhytaikaiseen altistukseen perustuvaa menetelmää rutiininomaisesti, sen on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla oikein taulukossa 1 suositellut 11 ainetta. Nämä aineet on valittu edustamaan kaikkia vakavan silmävaurion tai silmä-ärsytyksen vasteita *in vivo* -kaninsilmätestien (testiohje 405) tulosten ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän (1) perusteella. Muita valintaperusteita olivat esimerkiksi se, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että korkeatasoisia *in vivo* -vertailutietoja tulee olla saatavilla. Lisäksi lyhytaikaiseen altistukseen perustuvasta testimenetelmästä on oltava saatavilla korkeatasoisia *in vitro* -tietoja (3). Jos luettelossa olevaa ainetta ei ole saatavilla tai jos se on perusteltua, voidaan käyttää toista ainetta, josta on saatavana asianmukaisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, kunhan käytetään muuten samoja perusteita kuin tässä kuvatut.

Taulukko 1

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* YK GHS/CLP-lk. ([2])	Liuotin LA-testissä	LA YK GHS/ CLP-lk.
Bentsalkoniumkloridi (10 %, vesiliuos)	8001-54-5	Oniumyhdiste	Neste	Luokka 1	Suolaliuos	Luokka 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Eetteri	Neste	Luokka 1	Suolaliuos	Luokka 1

([1]) Kesäkuussa 2013 pidetyssä yhteisessä kokouksessa sovittiin, että, aina kun mahdollista, olisi ilmausta ”testikemikaali” käytettävä aiempaa yhdenmukaisemmin kuvaamaan sitä, mitä testataan, uusissa ja päivitettävissä testimenetelmissä.

▼**M8**

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* YK GHS/CLP-lk. ([2])	Liuotin LA-testissä	LA YK GHS/ CLP-lk.
Acid Red 92	18472-87-2	Heterosyklinen yhdiste; bromiyhdiste; klooriyhdiste	Kiinteä	Luokka 1	Suolaliuos	Luokka 1
Natriumhydroksidi	1310-73-2	Emäs; epäorgaaninen kemikaali	Kiinteä	Luokka 1 ([3])	Suolaliuos	Luokka 1
Butyrolaktoni	96-48-0	Laktoni; heterosyklinen yhdiste	Neste	Luokka 2A (CLP:ssä luokka 2)	Suolaliuos	Ei voida ennustaa
1-oktanoli	111-87-5	Alkoholi	Neste	Luokka 2A/B ([4]) (CLP:ssä luokka 2)	Mineraaliöljy	Ei voida ennustaa
Syklopentanoli	96-41-3	Alkoholi; hiilivety, syklinen	Neste	Luokka 2A/B ([5]) (CLP:ssä luokka 2)	Suolaliuos	Ei voida ennustaa
2-etoksietyyliasetaatti	111-15-9	Alkoholi; eetteri	Neste	Ei luokitusta	Suolaliuos	Ei luokitusta
Dodekaani	112-40-3	Hiilivety, asyklinen	Neste	Ei luokitusta	Mineraaliöljy	Ei luokitusta
Metyyli-isobutyyliketoni	108-10-1	Ketoni	Neste	Ei luokitusta	Mineraaliöljy	Ei luokitusta

▼M8

Aine	CAS-nro	Kemiallinen luokka ([1])	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* YK GHS/CLP-lk. ([2])	Liuotin LA-testissä	LA YK GHS/ CLP-lk.
1,1-dimetyyliguanidiinisulfaatti	598-65-2	Amidiini; rikkiyhdiste	Kiinteä	Ei luokitusta	Suolaliuos	Ei luokitusta

([1]) Kemialliset luokat määritettiin NICEATMin aikaisempien julkaisujen perusteella. Jos niitä ei ollut saatavilla, käytettiin National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) -järjestelmää (ChemIDplusin® kautta, [National Library of Medicine], saatavana osoitteessa http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) ja NICEATMin rakennemäärityksiä.

([2]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu *in vivo* -kaninsilmätestillä (OECD:n testiohje 405) ja soveltamalla YK:n GHS-järjestelmää / CLP-asetusta (1).

([3]) Luokitus luokkaan 1 perustuu siihen, että natriumhydroksidin ihosyövyttävyyspotentiaali on 100 prosenttia (lueteltu pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuna kemikaalina, joka on mahdollisesti ihoa syövyttävä, OECD:n testiohjeessa 435), ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 1 perusteisiin (1).

([4]) Luokitus luokkaan 2A tai 2B määräytyy sen mukaan, miten tulkitaan YK:n GHS-järjestelmän kriteerejä, jotka erottavat nämä luokat toisistaan. Päivänä 7 vaikutuksia on siis oltava 2 eläimellä kuudesta tai 4 eläimellä kuudesta, jotta kemikaali voidaan luokitella luokkaan 2A. *In vivo* -aineistoon kuului kaksi tutkimusta, joissa kummassakin oli kolme eläintä. Ensimmäisessä tutkimuksessa kahdella eläimellä kolmesta näkyi vaikutuksia päivänä 7, minkä perusteella kemikaali luokiteltiin luokkaan 2A (11). Toisessa tutkimuksessa kaikki päätetapahtumat kaikilla kolmella eläimellä palautuivat nolla-arvoon päivään 7 mennessä. Näin ollen kemikaali luokiteltiin luokkaan 2B (12).

([5]) Luokitus luokkaan 2A tai 2B määräytyy sen mukaan, miten tulkitaan YK:n GHS-järjestelmän kriteerejä, jotka erottavat nämä luokat toisistaan. Päivänä 7 vaikutuksia on siis oltava 1 eläimellä kolmesta tai 2 eläimellä kolmesta, jotta kemikaali voidaan luokitella luokkaan 2A. *In vivo* -tutkimuksessa oli kolme eläintä. Yhdellä eläimellä esiintynyttä sarveiskalvon sameutta ja sidekalvon punaisuutta lukuun ottamatta kaikki päätetapahtumat palautuivat nolla-arvoon päivään 7 mennessä. Päivään 7 mennessä täysin toipumattoman eläimen sarveiskalvon sameusarvo oli 1 ja sidekalvon punaisuusarvo oli 1 (päivänä 7). Täydellinen toipuminen tapahtui päivänä 14 (11).

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero

MENETTELY

Yksikerroksisen soluviljelmän valmistelu

15. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä on käytettävä kanin sarveiskalvosta peräisin olevaa solulinjaa, SIRCiä. On suositeltavaa, että SIRC-solut hankitaan korkeatasoisesta solupankista, jollainen on esimerkiksi American Type Culture Collection CCL60.

16. SIRC-soluja viljellään 37 °C:n lämpötilassa 5-prosenttisessa hiilidioksidi-inkubaattorissa ja kosteutetussa ympäristössä soluviljelypullossa. Sen tulee sisältää kasvatusliuosta, jossa on Eaglen minimum essential medium (MEM) -liuosta, johon on lisätty 10 % naudan sikiön verestä valmistettua seerumia (FBS), 2 mM L-glutamiinia, 50–100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 50–100 µg/ml streptomysiiniä. Solut, jotka ovat kasvaneet soluviljelypullossa konfluenteiksi, on erotettava käyttämällä trypsiini-etyleenidiamiinitetraetikkahappoliuosta; soluraaputinta voidaan käyttää tai olla käyttämättä. Ennen solujen käyttämistä rutiinimaisessa testauksessa ne propagoidaan (esimerkiksi 2 tai 3 siirrostusta) soluviljelypullossa. Sulatuksen jälkeen saa kuitenkin tehdä enintään 25 siirrostusta.

17. Solut, jotka ovat valmiita käytettäväksi lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testissä, preparoidaan asianmukaiseen tiheyteen ja kylvetään 96-kuoppaisille levyille. Suositeltu solutiheys on $6{,}0 \times 10^3$ solua kuoppaa kohti, jos solut käytetään neljän päivän kuluttua kylvöstä, tai $3{,}0 \times 10^3$ solua kuoppaa kohti, jos solut käytetään viiden päivän kuluessa kylvöstä. Viljelytilavuus on 200 µl. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testissä käytettävät solut, jotka kylvetään kasvatusliuokseen asianmukaiseen tiheyteen, saavuttavat yli 80 prosentin konfluenssin testaushetkeen mennessä eli neljän tai viiden päivän kuluessa kylvöstä.

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

18. Ensisijaisesti testikemikaalien liuottamisessa tai suspendoimisessa on käytettävä liuottimena fysiologista suolaliuosta. Jos testikemikaalin liukoisuus on huono tai jos se ei liukene tai suspendoidu tasaisesti suolaliuoksessa vähintään

▼M8

viiden minuutin kuluessa, toissijaisena liuotinvaihtoehtona käytetään 5-prosenttista DMSO:ta (CAS-nro 67-68-5) suolaliuoksessa. Testikemikaaleille, jotka eivät liukene tai suspendoidu tasaisesti suolaliuoksessa tai 5-prosenttisella DMSO:lla täydennetyssä suolaliuoksessa vähintään viiden minuutin kuluessa, käytetään kolmantena liuotinvaihtoehtona mineraaliöljyä (CAS-nro 8042-47-5).

19. Testikemikaalit liuotetaan tai suspendoidaan tasaisesti valittuun liuottimeen 5-prosenttisena pitoisuutena (v/v). Sen jälkeen niitä laimennetaan 10-kertaisena sarjalaimennoksena 0,5 prosentin ja 0,05 prosentin pitoisuuteen. Kukin testikemikaali on testattava sekä 5 prosentin että 0,05 prosentin pitoisuutena. Solut, joita viljellään 96-kuoppaisella levyllä, altistetaan (tilavuus 200 µl/kuoppa) joko 5-prosenttiselle tai 0,05-prosenttiselle pitoisuudelle testikemikaaliliuosta (tai -suspensiota) viiden minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Testikemikaaleja (yhdestä ainesosasta koostuva aineet tai useasta ainesosasta koostuvat aineet tai seokset) pidetään laimentamattomina aineina, ja ne laimennetaan tai suspendoidaan menetelmän mukaan niiden puhtaudesta riippumatta.

20. Edellä 16 kohdassa kuvattua kasvatusliuosta käytetään kasvatusliuoskontrollina jokaisella levyllä jokaisessa toistossa. Lisäksi solut altistetaan myös liuotinkontrollinäytteille jokaisella levyllä jokaisessa toistossa. Edellä 18 kohdassa luetelluista liuottimista on vahvistettu, etteivät ne vaikuta haitallisesti SIRC-solujen elinkykyyn.

21. Lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä on käytettävä 0,01-prosenttista natriumlauryylisulfaattia (SLS) suolaliuoksessa positiivisena kontrollina jokaisella levyllä jokaisessa toistossa. Jotta voidaan laskea positiivisen kontrollin solujen elinkyky, jokaisen toiston jokaisella levyllä on oltava myös suolaliuosliuotinkontrolli.

22. Nollanäyte on tarpeen optisen tiheyden kompensaation määrittämiseksi, ja se on tehtävä kuopille, jotka sisältävät pelkästään fosfaattipuskuroitua suolaliuosta mutta eivät kalsiumia ja magnesiumia (PBS) tai soluja.

23. Jokainen näyte (testikemikaali 5-prosenttisena ja 0,05-prosenttisena pitoisuutena, kasvatusliuoskontrolli, liuotinkontrolli sekä positiivinen kontrolli) on testattava kolmena rinnakkaisnäytteenä jokaisessa toistossa: solut on altistettava 200 µl:lle asianmukaista testi- tai kontrollikemikaalia viiden minuutin ajan huoneenlämpötilassa.

24. Vertailuaineet ovat hyödyllisiä, kun arvioidaan tiettyyn kemikaali- tai tuoteryhmään kuuluvien tuntemattomien kemikaalien silmä-ärsytyspotentiaalia tai silmää ärsyttävän aineen suhteellista ärsytyspotentiaalia tietyllä ärsytysvaste-alueella.

Solujen elinkyvyn mittaus

25. Altistuksen jälkeen solut pestään kahdesti 200 µl:lla PBS:ää, ja siihen lisätään 200 µl MTT-liuosta (0,5 mg MTT:tä millilitrassa kasvatusliuosta). Liuoksen annetaan olla kaksi tuntia inkubaattorissa (37 °C, 5 % CO_2). Sen jälkeen MTT-liuos dekantoidaan ja MTT-formatsaani uutetaan lisäämällä 200 µl 0,04 N hydrokloorihappo-isopropanolia ja antamalla liuoksen olla 60 minuuttia pimeässä huoneenlämpötilassa. Tämän jälkeen MTT-formatsaaniliuoksen absorbanssi mitataan 570 nm:n alueella mikrolevylukijalla. Testikemikaalit häiritsevät MTT-määritystä (väriaineilla tai suorilla MTT:n pelkistimillä) vain, jos testausjärjestelmään jää huomattavia määriä testikemikaalia altistuksen jälkeisen huuhtelun jälkeen. Tämä koskee kolmiulotteisesti rekonstruoitua ihmisen sarveiskalvokudosta tai rekonstruoitua orvaskesikudosta, mutta tällä ei ole merkitystä lyhytaikaiseen altistukseen perustuvassa testimenetelmässä käytettävien kaksiulotteisten soluviljelmien yhteydessä.

▼M8

Tulosten tulkinta ja ennustettavuusmalli

26. Jokaisesta testikemikaalista saatuja optisen tiheyden arvoja käytetään solujen elinkyvyn laskemiseen suhteessa liuotinkontrolliin, jonka arvoksi on asetettu 100 prosenttia. Solujen suhteellinen elinkyky ilmaistaan prosenttiosuutena, ja se saadaan jakamalla testikemikaalin optinen tiheys liuotinkontrollin optisella tiheydellä sen jälkeen, kun kummastakin arvosta on vähennetty nollanäytteen optinen tiheys.

$$Solun\ elinkyky(\%) = \frac{(OD_{570}\ testikemikaalin) - (OD_{570}\ nollanäytteen)}{(OD_{570}\ liuotinkontrollin) - (OD_{570}\ nollanäytteen)} \times 100$$

Myös kunkin liuotinkontrollin solujen suhteellinen elinkyky ilmaistaan prosenttiosuutena, ja se saadaan jakamalla kunkin liuotinkontrollin optinen tiheys kasvatusliuoskontrollin optisella tiheydellä sen jälkeen, kun kummastakin arvosta on vähennetty nollanäytteen optinen tiheys.

27. Kolme itsenäistä toistoa, joista kukin sisältää kolme rinnakkaisnäytekuoppaa (ts. n=9), on tehtävä. Solujen suhteellisen elinkyvyn aritmeettinen keskiarvo lasketaan käyttämällä jokaisen testikemikaalin ja liuotinkontrollin kolmen kuopan aritmeettista keskiarvoa jokaisesta itsenäisestä toistosta. Solujen elinkyvyn lopullinen aritmeettinen keskiarvo lasketaan kolmen itsenäisen toiston perusteella.

28. Seuraavassa on esitetty solujen elinkyvyn raja-arvot, joiden avulla voidaan tunnistaa sellaiset testikemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1), sekä testikemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”).

Taulukko 2

LA-testimenetelmän ennustemalli

Solujen elinkyky		YK:n GHS-järj. / CLP-as. mukainen luokitus	Sovellettavuus
Pitoisuus 5 %	Pitoisuus 0,05 %		
> 70 %	> 70 %	Ei luokitusta	Aineet ja seokset, lukuun ottamatta näitä: i) erittäin haihtuvat aineet, joiden höyrynpaine on yli 6 kPa ([1]), ja ii) muut kiinteät kemikaalit (aineet ja seokset) kuin pinta-aktiiviset aineet ja vain niistä koostuvat seokset
≤ 70 %	> 70 %	Ei voida ennustaa	Ei sovellettavissa
≤ 70 %	≤ 70 %	Luokka 1	Aineet ja seokset ([2])

([1]) Seokset, jotka sisältävät aineita, joiden höyrynpaine on yli 6 kPa, on arvioitava huolellisesti, jotta vältetään mahdolliset aliennusteet, ja niille on esitettävä tapauskohtaiset perustelut.

([2]) Pääasiassa yhdestä ainesosasta koostuvista aineista saatujen tulosten perusteella, joskin myös seosten testaamisesta on jonkin verran tietoa. Teknisesti testimenetelmää voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta muodostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

▼M8

Hyväksymisperusteet

29. Testitulosten katsotaan olevan hyväksyttäviä, mikäli kaikki seuraavat perusteet täyttyvät:

a) Kasvatusliuoskontrollin (altistus kasvatusliuokselle) optisen tiheyden on oltava 0,3 tai enemmän nollanäytteen optisen tiheyden vähentämisen jälkeen.

b) Liuotinkontrollin solujen elinkyvyn on oltava 80 prosenttia tai enemmän kasvatusliuoskontrolliin nähden. Jos jokaisessa toistossa käytetään useita liuotinkontrolleja, solujen elinkyvyn on oltava jokaisessa niistä yli 80 prosenttia, jotta näillä liuottimilla testattujen testikemikaalien testaus voitaisiin hyväksyä.

c) Positiivisen kontrollin (0,01-prosenttinen SLS) solujen elinkyvyn pitäisi olla kahden keskihajonnan etäisyydellä historiallisesta keskiarvosta. Positiivisen kontrollin ylempi ja alempi hyväksymisraja on päivitettävä säännöllisesti, esimerkiksi kolmen kuukauden välein tai joka kerta, kun laboratorioissa, joissa näitä testejä tehdään epäsäännöllisesti (harvemmin kuin kerran kuussa), tehdään hyväksyttävä testi. Jos laboratorio ei tee riittävästi kokeita, jotta voitaisiin vahvistaa tilastollisesti luotettava positiivisen kontrollin jakauma, se voi käyttää menetelmän käyttäjän vahvistamaa ylempää ja alempaa hyväksymisrajaa (ts. 21,1 ja 62,3 prosentin välillä) laboratorion aikaisempien tietojen perusteella ja määrittää sisäisen jakauman ensimmäisten rutiinimaisten testien aikana.

d) Kolmen itsenäisen toiston perusteella johdetun solujen lopullisen elinkyvyn keskihajonnan on oltava alle 15 prosenttia testikemikaalin kummankin pitoisuuden (5 % ja 0,05 %) osalta.

Jos yksi tai useampi näistä perusteista ei täyty, tulokset on hylättävä ja on tehtävä toiset kolme itsenäistä toistoa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

30. Tiedot jokaisen toiston jokaisesta yksittäisestä kuopasta (esimerkiksi solujen elinkykyarvot) sekä kokonaiskeskiarvo, keskihajonta ja luokitus on ilmoitettava.

Testiraportti

31. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja kontrolliaineet

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine: kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset: mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemialliset tunnistetiedot (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

— fysikaalinen olomuoto, haihtuvuus, pH, logP-arvo, molekyylipaino, kemiallinen luokka ja muut tutkimuksen tekemisen kannalta olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

▼**M8**

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Testimenetelmän mukaiset olosuhteet ja menettelyt

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testimenetelmästä

— käytetty solulinja, sen lähde, siirrostusten lukumäärä ja testaukseen käytettyjen solujen konfluenssi

— käytetty testimenettely yksityiskohtaisesti

— toistojen ja rinnakkaisnäytteiden määrä

— testikemikaalin käytetyt pitoisuudet (jos muut kuin suositellut)

— perustelut liuottimen valinnalle kunkin testikemikaalin osalta

— testikemikaalille altistuksen kesto (jos muu kuin suositeltu)

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— tiedot positiivisen kontrollin aikaisemmasta keskiarvosta ja keskihajonnasta:

— osoitus laboratorion pätevyydestä testimenetelmän käyttämisessä (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuilla aineilla testaus) tai osoitus testimenetelmän suorituskyvyn toistuvuudesta pidemmällä aikavälillä.

Tulokset

— Jokaisesta testikemikaalista ja kontrolliaineesta sekä jokaisesta testipitoisuudesta on esitettävä seuraavat tiedot taulukossa: yksittäiset optisen tiheyden arvot rinnakkaisnäytekuoppaa kohti, optisen tiheyden arvojen aritmeettinen keskiarvo jokaisesta itsenäisestä toistosta, solujen prosentuaalinen elinkyky jokaisesta itsenäisestä toistosta sekä solujen prosentuaalisen elinkyvyn lopullinen aritmeettinen keskiarvo ja keskihajonta kolmesta toistosta.

— Kasvatusliuos- ja liuotinkontrollien sekä positiivisen kontrollin tulokset, jotka osoittavat, että tutkimuksen hyväksymisperusteet ovat asianmukaiset

— Kuvaus muista havaituista vaikutuksista

— Ennustemallin/päätöksentekoperusteiden pohjalta tehty luokitus.

▼M8

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavana osoitteesta http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22, 760–770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25, 796–809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, s. 1855–1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Saatavana osoitteesta [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Tässä liitteessä oleva B.5 luku, Akuutti silmän ärsyttävyys/syövyttävyys

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci. 1648–1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442–449.

(13) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(14) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Liite

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (13).

Vertailuaine: Testikemikaalin vertailustandardina käytettävä aine. Vertailuaineella on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, ii) samanlainen rakenne ja toiminta kuin testattavien aineiden luokkaan kuuluvilla aineilla, iii) tunnetut fysikaaliset/kemialliset ominaisuudet, iv) tukevia tietoja tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellun vasteen vaihteluvälillä.

Alhaalta ylöspäin suuntautuva lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään testikemikaalille, jonka ei oleteta vaativan luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta (negatiivinen tulos), ja muut kemikaalit (positiivinen tulos).

Kemikaali: Aine tai seos.

Silmä-ärsytys: Silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle ja jotka korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”silmiin kohdistuvat korjautuvat vaikutukset” ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Kaikkien positiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on yksi testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten kemikaalien osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on yksi testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Vaara: Aineen tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

Kasvatusliuoskontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, reagoiko liuotin testijärjestelmän kanssa.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

MTT: 3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi, tiatsolyylisininen.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka aineosien pitoisuudet ovat $\geq$ 10 painoprosenttia ja $<$ 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

▼**M8**

OD: Optinen tiheys.

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (10).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (13).

Herkkyys: Kaikkien positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (10).

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön rappeutuminen, joka syntyy, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”silmiin kohdistuvat korjautumattomat vaikutukset” ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine, ja joka prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen ja muiden kontrollinäytteiden kanssa perusvastetason määrittämiseksi näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin tai kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (13).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Pinta-aktiivinen aine: Kemikaali, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita. Tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M8

Vaiheittainen testausstrategia: Vaiheittainen testausstrategia, jossa kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen näyttöön perustuvaa prosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin ärsyttävyys voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, lisätestausta ei tarvita. Jos testikemikaalin ärsyttävyyttä ei voida määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, toteutetaan vaiheittainen testaus eläimillä, kunnes luokitus voidaan määrittää aukottomasti.

Ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että testikemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (positiivinen tulos), ja muut kemikaalit (negatiivinen tulos).

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1: Ks. ”vakava silmävaurio”.

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2: Ks. ”silmä-ärsytys”.

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”: Kemikaalit, joita ei ole luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1 tai 2 (tai luokkiin 2A tai 2B).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

▼M8

B.69. **REKONSTRUOITUUN IHMISEN SARVEISKALVON KALTAISEEN EPITEELIIN (RhCE) PERUSTUVA TESTIMENETELMÄ SELLAISTEN KEMIKAALIEN MÄÄRITTÄMISEEN, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA JA MERKINTÖJÄ SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 492 (2017). *Vakava silmävaurio* tarkoittaa silmän kudosvauriota tai vakavaa fyysistä näön heikentymistä, joka syntyy, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta Yhdistyneiden kansakuntien (YK) maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmässä (YK:n GHS-järjestelmä) (1) ja aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetussa Euroopan unionin (EU) asetuksessa 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritetyn mukaisesti. *Silmä-ärsytys* tarkoittaa YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaan silmän muutoksia, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle, ja jotka korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Vakavia silmävaurioita aiheuttavat testikemikaalit luokitellaan YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokkaan 1, kun taas silmä-ärsytystä aiheuttavat kemikaalit luokitellaan GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokkaan 2. Testikemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta, on määritelty kemikaaleiksi, jotka eivät täytä vaatimuksia, jotta ne voisi luokitella YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokan 1 tai 2 (2A tai 2B) kemikaaleiksi, joten ne kuuluvat YK:n GHS-järjestelmän tai CLP-asetuksen mukaiseen luokkaan ”Ei luokitusta”.

2. Vakavan silmävaurion / silmä-ärsytyksen arviointi on yleensä edellyttänyt koe-eläinten käyttöä (TM B.5, 2 kohta). Sopivimman testimenetelmän valintaa ja kyseisen testimenetelmän käyttöä on tarkasteltava OECD:n vakavien silmävaurioiden ja silmä-ärsytyksen testausta ja arviointia koskevia yhdennettyjä lähestymistapoja koskevan ohjeasiakirjan yhteydessä (39).

3. Tässä testimenetelmässä kuvataan *in vitro* -menetelmä, jolla voidaan määrittää sellaiset kemikaalit (aineet ja seokset), jotka eivät vaadi luokitusta ja merkintöjä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti. Siinä käytetään rekonstruoitua ihmisen sarveiskalvon kaltaista epiteeliä (RhCE:tä), joka jäljittelee tarkasti ihmisen sarveiskalvon epiteelin histologisia, morfologisia, biokemiallisia ja fysiologisia ominaisuuksia. Neljä muuta *in vitro* -testimenetelmää on validoitu, katsottu tieteellisesti valideiksi ja hyväksytty testimenetelmiksi B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) ja B.68 (6), joilla voidaan tarkastella vakavaa silmävauriota / silmä-ärsytystä ihmisten terveyteen liittyvänä päätetapahtumana.

4. Tähän testimenetelmään sisältyy kaksi validoitua testiä, joissa käytetään kaupallisesti saatavilla olevia RhCE-malleja. Silmä-ärsytyksen / vakavan silmävaurion arviointiin on tehty validointitutkimuksia (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13), joissa on käytetty EpiOcular™-silmä-ärsytystestiä ja SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) -silmä-ärsytystestiä. Kummassakin näissä testissä käytetään kaupallisesti saatavia RhCE-kudosmalleja testijärjestelmänä. Niistä käytetään jäljempänä nimitystä validoitu vertailumenetelmä,

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼**M8**

VVM 1 ja VVM 2. Näiden validointitutkimusten ja niiden riippumattoman vertaisarvioinnin (9) (12) perusteella todettiin, että EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesteillä voidaan määrittää oikein ne kemikaalit (sekä aineet että seokset), jotka eivät vaadi luokitusta ja merkintöjä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta YK:n GHS-järjestelmän mukaisesti, ja testejä pidettiin tieteellisesti valideina tähän tarkoitukseen (13).

5. Tällä hetkellä on yleisesti hyväksyttyä, ettei Draizen *in vivo* -silmätestiä (2) (14) voida täysin korvata lähitulevaisuudessa yhdellä ainoalla *in vitro* -testillä, kun tavoitteena on ennustaa vakavaan silmävaurioon/silmä-ärsytykseen liittyvät vasteet kokonaisuudessaan eri kemikaaliluokissa. Draizen silmätesti saatetaan kuitenkin voida korvata kokonaan yhdistelemällä strategisesti useita vaihtoehtoisia (vaiheittaisiin) testausstrategioihin kuuluvia testimenetelmiä, kuten alhaalta ylöspäin tai ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa (15). Alhaalta ylöspäin suuntautuva lähestymistapa (15) on tarkoitettu käytettäväksi silloin, kun kemikaalin ei nykyisten tietojen perusteella oleteta aiheuttavan siinä määrin silmä-ärsytystä, että se vaatisi luokitusta. Ylhäältä alaspäin suuntautuvaa lähestymistapaa (15) on puolestaan määrä käyttää silloin, kun kemikaalin oletetaan nykyisten tietojen perusteella aiheuttavan vakavia silmävaurioita. EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestejä suositellaan käytettäväksi, kun tavoitteena on määrittääne kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti (”Ei luokitusta”) ilman lisätestausta, kun testausstrategiana on esimerkiksi Scottin ja muiden ehdottama alhaalta ylöspäin tai ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa (esimerkiksi ensimmäinen vaihe alhaalta ylöspäin suuntautuvassa lähestymistavassa tai yhtenä viimeisistä vaiheista ylhäältä alaspäin suuntautuvassa lähestymistavassa) (15). EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestejä ei ole kuitenkaan tarkoitettu tekemään eroa YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokan 1 (vakava silmävaurio) ja luokan 2 (silmä-ärsytys) välille. Tämä ero pitää tehdä testausstrategian toisessa vaiheessa (15). Testikemikaali, josta EpiOcular™- tai SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti osoittaa, että tarvitaan luokitusta silmä-ärsytyksen / vakavan silmävaurion osalta, vaatii siis lisätestausta (*in vitro* ja/tai *in vivo*), jotta lopullinen luokituspäätös voidaan tehdä (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka Ei luokitusta, luokka 2 tai luokka 1), käyttäen esimerkiksi testimenetelmiä B.47, B.48, B.61 tai B.68.

6. Tässä testimenetelmässä kuvataan menettely, jolla arvioidaan testikemikaalin silmävaarallisuuspotentiaali selvittämällä sen kyky aiheuttaa sytotoksisuutta RhCE-kudosmallissa MTT-määrityksellä mitattuna (16) (ks. 21 kohta). RhCE-kudoksen elinkyky testikemikaalille altistuksen jälkeen määritetään vertaamalla sitä kudoksiin, jotka on käsitelty negatiivisella kontrolliaineella (prosentuaalinen elinkyky), ja näin saadulla arvolla ennustetaan testikemikaalin silmävaarallisuuspotentiaali.

7. Saatavilla on suoritusvaatimukset (17), jotka helpottavat uusien tai muokattujen RhCE-pohjaisten *in vitro* -testien, jotka ovat samanlaisia kuin EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestit, validointia OECD:n ohjeasiakirjan nro 34 (18) periaatteiden mukaisesti. Niiden avulla myös OECD:n testiohjetta 492 voidaan muuttaa oikea-aikaisesti lisäämällä suorituskykyvaatimukset näihin ohjeisiin. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (Mutual Acceptance of Data, MAD) taataan ainoastaan suoritusvaatimusten mukaisesti validoitujen testien osalta, jos OECD on tarkistanut ja sisällyttänyt ne vastaavaan testiohjeeseen.

MÄÄRITELMÄT

8. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.

▼**M8**

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

9. Tämä testimenetelmä perustuu kaupallisiin kolmiulotteisiin RhCE-kudosmalleihin, joita valmistetaan käyttämällä joko ihmisen orvaskeden keratinosyyttejä (ts. EpiOcular™ OCL-200) tai ihmisen immortalisoituja sarveiskalvon epiteelisoluja (ts. SkinEthic™ HCE/S). EpiOcular™ OCL-200- ja SkinEthic™ HCE/S -RhCE-kudosmallit ovat samankaltaisia kuin sarveiskalvon epiteelin kolmiulotteinen rakenne *in vivo*, ja ne valmistetaan käyttämällä kohdelajilta peräisin olevia soluja (19) (20). Lisäksi näillä testeillä mitataan suoraan sytotoksisuutta, joka johtuu siitä, että kemikaali läpäisee sarveiskalvon ja aiheuttaa näin solu- ja kudosvaurioita. Vakava silmävaurio / silmä-ärsytys *in vivo* määritetään kokonaisuudessaan sytotoksisen vasteen perusteella. Soluvauriot voivat johtua monenlaisista vaikutustavoista (ks. 20 kohta), mutta sytotoksisuudella on tärkeä, ellei jopa tärkein, mekanistinen rooli määritettäessä vakavaan silmävaurioon / silmä-ärsytykseen liittyvää kokonaisvastetta kemikaalille (se näkyy *in vivo* pääasiassa sarveiskalvon sameutena, värikalvotulehduksena, sidekalvon punoituksena ja/tai kemoosina) riippumatta kudosvaurion taustalla olevista fysikaalis-kemiallisista prosesseista.

10. Tämän testimenetelmän validointitutkimuksessa on testattu laaja joukko kemikaaleja, jotka kattavat hyvin monenlaisia kemikaalityyppejä, kemiallisia luokkia, molekyylipainoja, logP-arvoja, kemiallisia rakenteita jne. EpiOcular™-silmä-ärsytystestin validointitietokanta sisälsi yhteensä 113 kemikaalia, jotka kattavat 95 erilaista orgaanista funktionaalista ryhmää OECD:n QSAR-työkalupakilla tehdyn analyysin mukaisesti (8). Suurin osa näistä kemikaaleista oli yhdestä ainesosasta koostuvia aineita, mutta tutkimukseen sisältyi myös monta useasta ainesosasta koostuvaa ainetta (esimerkiksi kolme homopolymeeriä, viisi kopolymeeriä ja 10 kvasipolymeeriä). Fysikaalisen olomuodon ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkien osalta 113 testattua kemikaalia jakautuivat näin: 13 luokan 1 nestettä, 15 luokan 1 kiinteää ainetta, 6 luokan 2A nestettä, 10 luokan 2A kiinteää ainetta, 7 luokan 2B nestettä, 7 luokan 2B kiinteää ainetta, 27 luokan ”Ei luokitusta” nestettä ja 28 luokan ”Ei luokitusta” kiinteää ainetta (8). SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestin validointitietokanta sisälsi yhteensä 200 kemikaalia, jotka kattavat 165 erilaista orgaanista funktionaalista ryhmää (8) (10) (11). Suurin osa näistä kemikaaleista oli yhdestä ainesosasta koostuvia aineita, mutta tutkimukseen sisältyi myös monta useasta ainesosasta koostuvaa ainetta (esimerkiksi 10 polymeeriä). Fysikaalisen olomuodon ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkien osalta 200 testattua kemikaalia jakautuivat näin: 27 luokan 1 nestettä, 24 luokan 1 kiinteää ainetta, 19 luokan 2A nestettä, 10 luokan 2A kiinteää ainetta, 9 luokan 2B nestettä, 8 luokan 2B kiinteää ainetta, 50 luokan ”Ei luokitusta” nestettä ja 53 luokan ”Ei luokitusta” kiinteää ainetta (10) (11).

11. Tätä testimenetelmää voidaan käyttää aineisiin ja seoksiin sekä kiinteisiin aineisiin, nesteisiin, puolikiinteisiin aineisiin ja vahamaisiin aineisiin. Nesteet voivat olla vesiliuoksia tai orgaanisia liuoksia; kiinteät aineet voivat olla joko veteen liukenevia tai veteen liukenemattomia. Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan jauhettava hienoksi jauheeksi ennen applikointia; näytteen muuta esikäsittelyä ei vaadita. Validointitutkimuksessa ei ole arvioitu kaasuja ja aerosoleja. Vaikka voidaan ajatella, että niitä voidaan testata RhCE-tekniikalla, tällä testimenetelmällä kaasuja ja aerosoleja ei voida kuitenkaan testata.

12. Testikemikaalit, jotka absorboivat valoa samalla aallonpituudella kuin MTT-formatsaani (luonnostaan tai käsittelyn jälkeen), ja testikemikaalit, jotka voivat suoraan pelkistää MTT-vitaaliväriä (MTT-formatsaaniksi), voivat häiritä kudoksen elinkykymittauksia, ja niiden yhteydessä on käytettävä mukautettuja kontrolleja korjauksiin. Mahdollisesti tarvittavien mukautettujen kontrollien tyyppi vaihtelee sen mukaan, millaista häiriötä testikemikaali tuottaa ja mitä menetelmää MTT-formatsaanin kvantifioinnissa käytetään (ks. 36–42 kohta).

▼**M8**

13. Validointia edeltävistä (21) (22) ja täysimittaisista validointitutkimuksista (8) (10) (11) saadut tulokset ovat osoittaneet, että sekä EpiOcular™-silmä-ärsytystesti että SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti ovat siirrettävissä laboratorioihin, jotka eivät ole tehneet näitä testejä aikaisemmin, ja että ne ovat myös toistettavissa samoissa laboratorioissa ja eri laboratorioissa. Näiden tutkimusten perusteella toistettavuuden (EpiOcular™-silmä-ärsytystestillä odotuksenmukaisten ennusteiden vastaavuus) suuruusluokka on 113:a kemikaalia koskevien tietojen perusteella noin 95 prosenttia samassa laboratoriossa ja 93 prosenttia eri laboratorioissa. Toistettavuuden (SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestillä odotuksenmukaisten ennusteiden vastaavuus) suuruusluokka on 120:tä kemikaalia koskevien tietojen perusteella noin 92 prosenttia samassa laboratoriossa ja 95 prosenttia eri laboratorioissa.

14. EpiOcular™-silmä-ärsytystestiä voidaan käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän mukaisesti silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta. Validointitutkimuksesta (8) saatujen tietojen perusteella EpiOcular™-silmä-ärsytystestin kokonaistarkkuus on 80 prosenttia (112 kemikaalin perusteella), herkkyys 96 prosenttia (57 kemikaalin perusteella), väärien negatiivisten tulosten osuus 4 prosenttia (57 kemikaalin perusteella), spesifisyys 63 prosenttia (55 kemikaalin perusteella) ja väärien positiivisten tulosten osuus on 37 prosenttia (55 kemikaalin perusteella) verrattuna *in vivo* -kaninsilmävertailutestistä saatuihin tietoihin (TM B.5) (2) (14), jotka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän mukaisesti. Tutkimus, jossa EpiOcular™-silmä-ärsytystestillä testattiin 97 nestemäistä maatalouskemikaaleihin kuuluvaa valmistetta, osoitti, että testimenetelmä toimi samalla tavalla tämäntyyppisten seosten kanssa kuin validointitutkimuksessa (23). Nämä 97 valmistetta jakautuivat näin: 21 valmistetta luokkaan 1, 19 valmistetta luokkaan 2A, 14 valmistetta luokkaan 2B ja 43 valmistetta luokkaan ”Ei luokitusta”, kun ne luokiteltiin YK:n GHS-luokitusjärjestelmän mukaan *in vivo* -kaninsilmävertailutestistä saatujen tietojen perusteella (TM B.5) (2) (14). Testistä saatiin seuraavat arvot: kokonaistarkkuus 82 prosenttia (97 valmisteen perusteella), herkkyys 91 prosenttia (54 valmisteen perusteella), väärien negatiivisten tulosten osuus 9 prosenttia (54 valmisteen perusteella), spesifisyys 72 prosenttia (43 valmisteen perusteella) ja väärien positiivisten tulosten osuus 28 prosenttia (43 valmisteen perusteella) (23).

15. SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestiä voidaan käyttää myös sellaisten kemikaalien tunnistamiseen, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän mukaisesti silmä-ärsytyksen ja vakavien silmävaurioiden osalta. Validointitutkimuksesta (10) (11) saatujen tietojen perusteella SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestin kokonaistarkkuus on 84 prosenttia (200 kemikaalin perusteella), herkkyys 95 prosenttia (97 kemikaalin perusteella), väärien negatiivisten tulosten osuus 5 prosenttia (97 kemikaalin perusteella), spesifisyys 72 prosenttia (103 kemikaalin perusteella) ja väärien positiivisten tulosten osuus on 28 prosenttia (103 kemikaalin perusteella) verrattuna *in vivo* -kaninsilmävertailutestistä saatuihin tietoihin (TM B.5) (2) (14), jotka on luokiteltu YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmän mukaisesti.

16. Kummallakin RhCE-testillä joko aineilla tai seoksilla saatujen väärien negatiivisten tulosten osuudet sijoittuvat 12 prosentin yleiseen todennäköisyyteen, jonka mukaan kemikaalit luokitellaan Draizen silmätestillä toistuvissa testeissä joko YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokkaan 2 tai luokkaan ”Ei luokitusta”; tämä johtuu menetelmän luontaisesta testinsisäisestä vaihtelusta (24). Kummallakin RhCE-testimenetelmällä joko aineista tai seoksista saatujen väärien positiivisten tulosten osuus ei ole tämän testimenetelmän yhteydessä merkittävä, koska kaikki testikemikaalit, joiden aiheuttama kudoksen elinkyky on yhtä suuri tai pienempi kuin määritetyt raja-arvot (ks. 44 kohta), edellyttävät lisätestausta muilla *in vitro* -testimenetelmillä tai viimesijaisena vaihtoehtona kaneilla (sääntelyvaatimusten mukaan) käyttäen vaiheittaista testausstrategiaa ja näyttöön perustuvaa lähestymistapaa. Näitä testimenetelmiä voidaankäyttää kaikentyyppisille kemikaaleille, ja negatiivinen tulos tarkoittaa sitä, ettei kemikaalia tarvitse luokitella

▼M8

silmä-ärsytyksen ja vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”). Asianmukaisilta sääntelyviranomaisilta tulee pyytää ohjeita, ennen kuin EpiOcular™-silmä-ärsytystestiä tai SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestiä käytetään jonkin muun luokitusjärjestelmän kuin YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisen järjestelmän mukaisesti.

17. Tämän testimenetelmän rajoitus on se, ettei sillä voida erotella silmä-ärsytystä / silmään kohdistuvia korjaantuvia vaikutuksia (luokka 2) ja vakavaa silmävaurioita / silmään kohdistuvia korjaantumattomia vaikutuksia (luokka 1) siten kuin ne on määritelty YK:n GHS-järjestelmässä ja CLP-asetuksessa, eikä silmiä ärsyttäviä aineita (valinnainen luokka 2A) ja lievästi silmiä ärsyttäviä aineita (valinnainen luokka 2B) siten kuin ne on määritelty YK:n GHS-järjestelmässä (1). Näiden erotteleminen edellyttää lisätestausta muilla *in vitro* -testimenetelmillä.

18. Tässä testimenetelmässä ilmauksella ’testikemikaali’ tarkoitetaan sitä, mitä testataan ([1]), eikä ilmaus liity RhCE-testimenetelmän sovellettavuuteen aineiden ja/tai seosten testaamisessa.

TESTIN PERIAATE

19. Testikemikaalia applikoidaan paikallisesti vähintään kahdelle kolmiulotteiselle RhCE-kudosmallille, ja kudoksen elinkyky mitataan altistuksen ja käsittelyn jälkeisen inkubointijakson jälkeen. RhCE-kudokset rekonstruoidaan ihmisen orvaskeden keratinosyyteistä tai ihmisen immortalisoiduista sarveiskalvon epiteelisoluista, joita on viljelty useita päiviä, jotta ne muodostaisivat kerrostuneen ja pitkälle erilaistuneen levyepiteelin, joka on morfologisesti samanlainen kuin ihmisen sarveiskalvossa. EpiOcular™-RhCE-kudosmalli koostuu vähintään kolmesta elinkykyisestä solukerroksesta ja keratinisoitumattomasta pintakerroksesta, ja sen rakenne on samankaltainen kuin sarveiskalvossa *in vivo*. SkinEthic™ HCE -RhCE-kudosmalli taas koostuu vähintään neljästä elinkykyisestä solukerroksesta, joihin sisältyy lieriömäisiä tyvisoluja, välimuotoisia siipisoluja ja pinnallisia levyepiteelisoluja. Ne ovat samanlaisia kuin normaalissa ihmisen sarveiskalvon epiteelissä (20) (26).

20. Kemikaalin aiheuttama vakava silmävaurio / silmä-ärsytys, joka näkyy in vivo pääasiassa sarveiskalvon sameutena, värikalvotulehduksena, sidekalvon punoituksena ja/tai kemoosina, johtuu tapahtumasarjasta, joka alkaa siitä, että kemikaali läpäisee sarveiskalvon ja/tai sidekalvon ja vaurioittaa soluja. Soluvaurio voi aiheutua monella vaikutustavalla, joita ovat esimerkiksi nämä: solukalvon hajoaminen (aiheuttajina esimerkiksi pinta-aktiiviset aineet, orgaaniset liuottimet), makromolekyylien (varsinkin proteiinien) koagulaatio (aiheuttajina esimerkiksi pinta-aktiiviset aineet, orgaaniset liuottimet, emäkset ja hapot), lipidien saippuoituminen (aiheuttajina esimerkiksi emäkset) ja alkylointi tai muut kovalentit yhteisvaikutukset makromolekyylien kanssa (aiheuttajina esimerkiksi valkaisuaineet, peroksidit ja alkyloivat aineet) (15) (27) (28). On kuitenkin osoitettu, että sytotoksisuudella on tärkeä, ellei jopa tärkein, mekanistinen rooli määritettäessä vakavaan silmävaurioon / silmä-ärsytykseen liittyvää kokonaisvastetta kemikaalille riippumatta kudosvaurion taustalla olevista fysikaalis-kemiallisista prosesseista (29) (30). Kemikaalin vakavan silmävaurion / silmä-ärsytyksen aiheuttamispotentiaali määritetään ensisijaisesti alkuvaurion laajuuden perusteella (31). Se korreloi

([1]) Kesäkuussa 2013 pidetyssä OECD:n yhteisessä kokouksessa sovittiin, että, aina kun mahdollista, olisi ilmausta ”testikemikaali” käytettävä aiempaa yhdenmukaisemmin kuvaamaan sitä, mitä testataan, uusissa ja päivitettävissä testiohjeissa.

▼M8

solukuoleman laajuuden (29) ja myöhempien vasteiden ja mahdollisten seurausten kanssa (32). Hyvin lievästi ärsyttävät aineet vaikuttavat yleensä vain sarveiskalvon epiteelin pintakerrokseen, lievästi ja kohtalaisesti ärsyttävät aineet vaurioittavat pääasiassa epiteeliä ja pinnallista tukikerrosta, ja voimakkaasti ärsyttävät aineet vaurioittavat epiteeliä, syvemmällä olevaa tukikerrosta ja toisinaan myös sarveiskalvon endoteelia (30) (33). RhCE-kudosmallin elinkyvyn mittaaminen sen jälkeen, kun se on altistettu paikallisesti testikemikaalille sellaisten kemikaalien tunnistamiseksi, joita ei tarvitse luokitella vakavan silmävaurion / silmä-ärsytyksen osalta (YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), perustuu oletukseen, että kaikki kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita tai silmä-ärsytystä, aiheuttavat sytotoksisuutta sarveiskalvon epiteelissä ja/tai sidekalvoilla.

21. RhCE-kudoksen elinkykyä mitataan yleensä sillä, miten elinkykyiset solut muuttavat vitaaliväri MTT:n [3-(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi; tiatsolyylisininen; CAS-nro 298-93-1] entsymaattisella konversiolla siniseksi MTT-formatsaanisuolaksi, joka mitataan kvantitatiivisesti kudoksista uuttamisen jälkeen (16). Sellaisia kemikaaleja, joita ei tarvitse luokitella YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen (ei luokitusta) mukaan, ovat ne, jotka eivät pienennä kudoksen elinkykyä määritettyä raja-arvoa pienemmäksi (ts. kudoksen elinkyky > 60 % EpiOcular™- ja SkinEthic™ HCE EITL -silmä-ärsytystestissä ([1]) tai > 50 % SkinEthic™ HCE EITS -silmä-ärsytystestissä ([2])) (ks. 44 kohta).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

22. Ennen kuin laboratoriot alkavat käyttää RhCE-testejä sääntelytarkoituksiin rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä luokittelemalla taulukossa 1 luetellut 15 pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta oikein. Nämä kemikaalit valittiin validoitujen vertailumenetelmien validointitutkimuksissa käytetyistä kemikaaleista (8) (10) (11). Valikoima sisältää mahdollisuuksien mukaan kemikaaleja, jotka i) edustavat eri fysikaalisia olomuotoja, ii) kattavat kaikki vakavaan silmävaurioon / silmä-ärsytykseen liittyvät *in vivo* -vasteet, jotka perustuvat *in vivo* -kaninsilmävertailutestistä (TM B.5) saatuihin korkeatasoisiin tuloksiin ja YK:n GHS-luokitusjärjestelmään (ts. luokat 1, 2A, 2B tai ei luokitusta) (1) ja CLP-asetuksen luokitusjärjestelmään (ts. luokat 1, 2 tai ei luokitusta), iii) täyttävät eri *in vivo* -luokitusperusteet (24) (25), iv) edustavat validointitutkimuksessa käytettyjä kemiallisia luokkia (8) (10) (11), v) edustavat hyvin ja laajalti orgaanisia funktionaalisia ryhmiä (8) (10) (11), vi) ovat kemialliselta rakenteeltaan tarkoin määritettyjä (8) (10) (11), vii) ovat värillisiä ja/tai suoria MTT:n pelkistimiä, viii) tuottivat toistettavissa olevia tuloksia RhCE-testimenetelmillä niiden validoinnin aikana, ix) luokiteltiin asianmukaisesti RhCE-testimenetelmillä niiden validointitutkimuksissa, x) kattavat kaikki *in vitro* -vasteet, jotka perustuvat korkeatasoisiin RhCE-testimenetelmillä saatuihin tietoihin (elinkyky 0–100 prosenttia), xi) ovat kaupallisesti saatavilla ja xii) joiden hankinta- tai hävityskustannukset eivät ole niin suuret, että ne estäisivät menetelmän käytön. Jos luettelossa olevaa kemikaalia ei ole saatavilla tai jos sitä ei voida käyttää muista perusteluista syistä, voidaan käyttää muuta edellä olevat perusteet täyttävää kemikaalia, esimerkiksi sellaista, jota on käytetty validoidun vertailumenetelmän validoinnissa. Tällaiset poikkeukset on kuitenkin aina perusteltava.

([1]) EITL: Nesteillä tehty silmä-ärsytystesti SkinEthic™ HCE -testin yhteydessä.
([2]) EITS: Kiinteillä aineilla tehty silmä-ärsytystesti SkinEthic™ HCE -testin yhteydessä.

▼**M8**

Taulukko 1

Luettelo pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista kemikaaleista

Kemiallinen nimi	CAS-nro	Orgaaninen funktionaalinen ryhmä ([1])	Fysikaalinen olomuoto	VVM1/elinkyky (%) ([2])	VVM2/elinkyky (%) ([3])	VVM-ennuste	MTT:n pelkistin	Väri-interf.
***In vivo*: luokka 1** ([4])								
Metyylitioglykolaatti	2365-48-2	Karboksyylihappo, esteri; tioalkoholi	N	10,9±6,4	5,5±7,4	Ei voida ennustaa	K (voimakas)	E
Hydroksietyyliakrylaatti	818-61-1	Akrylaatti; alkoholi	N	7,5±4,7 ([5])	1,6±1,0	Ei voida ennustaa	E	E
2,5-dimetyyli-2,5-heksaanidioli	110-03-2	Alkoholi	K	2,3±0,2	0,2±0,1	Ei voida ennustaa	E	E
Natriumoksalaatti	62-76-0	Oksokarboksyylihappo	K	29,0±1,2	5,3±4,1	Ei voida ennustaa	E	E
In vivo: luokka 2A ([4])								
2,4,11,13-tetra-atsatetradekaani-di-imidamidi, N,N″-bis(4-kloorifenyyli)-3,12-di-imino-, di-D-glukonaatti (20 %, vesiliuos) ([6])	18472-51-0	Aromaattinen heterosyklinen halidi; aryylihalidi; dihydroksyyliryhmä; guanidiini	N	4,0±1,1	1,3±0,6	Ei voida ennustaa	E	K (heikko)
Natriumbentsoaatti	532-32-1	Aryyli; karboksyylihappo	K	3,5±2,6	0,6±0,1	Ei voida ennustaa	E	E
***In vivo: luokka* 2B** ([4])								
Dietyylitoluamidi	134-62-3	Bentsamidi	N	15,6±6,3	2,8±0,9	Ei voida ennustaa	E	E
2,2-dimetyyli-3-metyleenibisyklo[2.2.1]heptaani	79-92-5	Alkaani, haarautunut, tertäärinen hiili; alkeeni; bisykloheptaani; silloittuneet rengasrakenteiset karboksyylit; sykloalkaani	K	4,7±1,5	15,8±1,1	Ei voida ennustaa	E	E
In vivo: ei luokitusta ([4])								
1-etyyli-3-metyyliimidatsolietyylisulfaatti	342573-75-5	Alkoksi; ammoniumsuola; aryyli; imidatsoli; sulfaatti	N	79,9±6,4	79,4±6,2	Ei luok.	E	E

▼M8

Kemiallinen nimi	CAS-nro	Orgaaninen funktionaalinen ryhmä ([1])	Fysikaalinen olomuoto	VVM1/elinkyky (%) ([2])	VVM2/elinkyky (%) ([3])	VVM-ennuste	MTT:n pelkistin	Väri-interf.
Dikaprylyylieetteri	629-82-3	Alkoksi; eetteri	N	97,8±4,3	95,2±3,0	Ei luok.	E	E
Piperonyylibutoksidi	51-03-6	Alkoksi; bentsodioksoli; bentsyyli; eetteri	N	104,2±4,2	96,5±3,5	Ei luok.	E	E
Polyetyleeniglykoli (PEG-40) -hydrogenoitu risiiniöljy	61788-85-0	Asylaali; alkoholi; allyyli; eetteri	Viskoosinen	77,6±5,4	89,1±2,9	Ei luok.	E	E
1-(4-kloorifenyyli)-3-(3,4-dikloorifenyyli)urea	101-20-2	Aromaattinen heterosyklinen halidi; aryylihalidi; ureajohdannaiset	K	106,7±5,3	101,9±6,6	Ei luok.	E	E
2,2′-metyleeni-bis-(6-(2H-bentsotriatsoli-2-yyli)-4-(1,1,3,3-tetrametyylibutyyli)- fenoli)	103597-45-1	Alkaani, haarautunut, kvaternäärinen hiili; fuusioitunut karbosyklinen aromaattinen yhdiste; fuusioituneet saturoituneet heterosykliset yhdisteet; kinoidiyhdisteiden esiasteet; tert-butyyli	K	102,7±13,4	97,7±5,6	Ei luok.	E	E
Kaliumtetrafluoriboroaatti	14075-53-7	Epäorgaaninen suola	K	88,6±3,3	92,9±5,1	Ei luok.	E	E

Lyhenteet:

CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero; YK:n GHS: YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (1); VVM1 = validoitu vertailumenetelmä, EpiOcular™-silmä-ärsytystesti; VVM2 = validoitu vertailumenetelmä, SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti; väri-interf. = väri-interferenssi MTT-formatsaanin vakioabsorbanssin (optisen tiheyden) mittauksessa.

([1]) OECD Toolbox 3.1:llä tehdyn sisäkkäisen analyysin mukaan määritetty orgaaninen funktionaalinen ryhmä (8).

([2]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu EpiOcular™-silmä-ärsytystestillä EURL ECVAM/Cosmetics Europen silmä-ärsytystä koskevassa validointitutkimuksessa (EIVS) (8).

([3]) Perustuu SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystestillä validointitutkimuksessa saatuihin tuloksiin (10) (11).

([4]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu *in vivo* -kaninsilmätestillä (TM B.5 / OECD:n testiohje 405) (2) (14) ja YK:n GHS-järjestelmää käyttämällä.

([5]) Perustuu tuloksiin, jotka on saatu Euroopan kemianteollisuuden järjestön CEFICin konsortion *in vitro* -silmä-ärsytyksen testausstrategiaa koskevassa tutkimuksessa (CON4EI).

([6]) Luokitus luokkaan 2A tai 2B määräytyy sen mukaan, miten tulkitaan YK:n GHS-järjestelmän kriteerejä, jotka erottavat nämä luokat toisistaan. Päivänä 7 vaikutuksia on siis oltava 1 eläimellä kolmesta tai 2 eläimellä kolmesta, jotta kemikaali voidaan luokitella luokkaan 2A. *In vivo* -tutkimuksessa oli kolme eläintä. Yhdellä eläimellä esiintynyttä sarveiskalvon sameutta lukuun ottamatta kaikki päätetapahtumat palautuivat nolla-arvoon päivään 7 mennessä. Päivään 7 mennessä täysin toipumattoman eläimen sarveiskalvon sameusarvo oli 1 (päivänä 7). Täydellinen toipuminen tapahtui päivänä 9.

23. Osana pätevyyden osoittamista suositellaan, että kudosten vastaanoton jälkeen käyttäjät tarkastavat kudosten läpäisevyysominaisuudet RhCE-kudosmallin valmistajan määräysten mukaisesti (ks. 25, 27 ja 30 kohta). Tämä on erityisen tärkeää, jos kudoksia kuljetetaan pitkiä välimatkoja tai pitkiä aikoja. Kun testi on otettu onnistuneesti käyttöön ja laboratorion pätevyys on osoitettu, tällaista tarkastusta ei tarvitse tehdä säännöllisesti. Jos testiä käytetään säännöllisesti, läpäisevyysominaisuudet on kuitenkin jatkossakin syytä arvioida säännöllisin väliajoin.

▼M8

MENETTELY

24. Tähän testimenetelmään sisältyvät tieteellisesti validit testit ovat EpiOcular™-silmä-ärsytystesti ja SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (9) (12) (13), joista käytetään myös nimitystä validoitu vertailumenetelmä (VVM1 ja VVM2). RhCE-testimenetelmille on saatavana vakiotoimintamenettelyt (Standard Operating Procedures, SOP), ja niitä pitää noudattaa, kun laboratorio ottaa testimenetelmän käyttöön ja käyttää sitä (34) (35). RhCE-testien keskeiset osat ja menettelyt kuvataan jäljempänä olevissa kohdissa ja lisäyksessä 2.

RHCE-TESTIMENETELMÄN OSAT

Yleiset ehdot

25. Sarveiskalvon kaltaisen epiteelin kolmiulotteisen kudoksen rekonstruoinnissa on käytettävä asianmukaisia ihmiseltä peräisin olevia soluja. Kudoksen on koostuttava progressiivisesti kerrostuneista mutta ei sarveistuneista soluista. RhCE-kudosmalli valmistetaan inserteissä, joissa on huokoinen synteettinen kalvo, jonka läpi ravintoaineet pääsevät kulkeutumaan soluihin. Rekonstruoidussa sarveiskalvon kaltaisessa epiteelissä tulee olla useita kerroksia elinkykyisiä keratinisoitumattomia epiteelisoluja. RhCE-kudosmallin epiteelin pinnan on oltava suorassa kosketuksessa ilmaan, jotta suora paikallinen altistuminen testikemikaaleille on mahdollista samalla tavalla kuin sarveiskalvon epiteeli altistuu *in vivo*. RhCE-kudosmallin on toimittava riittävän lujana ja funktionaalisena esteenä sytotoksisten vertailuaineiden, kuten Triton X-100:n tai natriumdodekyylisulfaatin (SDS:n), nopealle kulkeutumiselle sen läpi. Läpäisynesto on osoitettava ja sitä voidaan arvioida määrittämällä joko altistuksen kesto, jota kudoksen elinkyvyn väheneminen 50 prosentilla edellyttää (ET_{50}), kun vertailuainetta applikoidaan tietty kiinteä pitoisuus (esimerkiksi 100 µl 0,3-prosenttista (v/v) Triton X-100:aa) tai pitoisuus, jolla vertailuaine vähentää kudosten elinkykyä 50 prosentilla (IC_{50}) kiinteän altistusajan jälkeen (esimerkiksi 30 minuutin käsittely 50 µl:lla SDS:ää) (ks. 30 kohta). RhCE-kudosmallin on oltava sellainen, ettei testikemikaali pääse kulkeutumaan reunan alta elinkykyiseen kudokseen, koska se heikentäisi kudoksen kykyä mallintaa sarveiskalvon altistusta. RhCE-kudosmallin valmistamisessa käytetyissä ihmiseltä peräisin olevissa soluissa ei saa olla bakteeri-, virus-, mykoplasma- tai sienikontaminaatiota. Kudosmallin toimittajan on tarkastettava mallin steriiliys, jotta varmistetaan, ettei siinä ole sieni- tai bakteerikontaminaatiota.

Toimintaolosuhteet

Elinkyky

26. Kudoksen elinkyvyn kvantifioinnissa käytettävä testi on MTT-määritys (16). RhCE-kudosmallin elinkykyiset solut pelkistävät vitaaliväri MTT:n saostuneeksi siniseksi MTT-formatsaaniksi, joka uutetaan kudoksestaisopropanolilla (tai samankaltaisella liuottimella). Uutettu MTT-formatsaani voidaan kvantifioida käyttämällä joko vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys, OD) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä (36). Pelkän uuttoliuottimen optisen tiheyden on oltava riittävän pieni, ts. OD < 0,1. RhCE-kudosmallin käyttäjien on varmistettava, että kukin RhCE-kudosmallin erä täyttää negatiiviselle kontrollille asetetut perusteet. Validoitujen vertailumenetelmien negatiivisen kontrollin optisen tiheyden arvojen (OD-arvojen) hyväksyttävyysalueet on esitetty taulukossa 2. HPLC-/UPLC-spektrofotometrian käyttäjän on käytettävä taulukossa 2 esitettyjä negatiivisen kontrollin OD-vaihteluvälejä negatiivisen kontrollin hyväksymisperusteena. Negatiivisella kontrolliaineella käsiteltyjen kudosten vakaus viljelmässä (niiden on annettava samanlaiset elinkykytulokset) testin altistusjakson ajan on dokumentoitava testiraportissa. Kudoksen valmistajan on noudatettava samanlaista menettelynä osana kudoserän vapauttamisen laadunvalvontaa, mutta tällöin voidaan soveltaa toisia hyväksymisperusteita kuin niitä,

▼M8

jotka on esitetty taulukossa 2. RhCE-kudosmallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo) (laadunvalvotaan sovellettavissa testimenetelmän olosuhteissa).

Taulukko 2

Negatiivisen kontrollin OD-arvojen hyväksyttävyysalue (testin käyttäjille)

Testi	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (OCL-200) – VVM1 (sekä nestemäisten että kiinteiden aineiden tutkimusprotokollat)	> 0,8 ([1])	< 2,5
SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (HCE/S) – VVM2 (sekä nestemäisten että kiinteiden aineiden tutkimusprotokollat)	> 1,0	≤ 2,5

([1]) Tässä hyväksyttävyysrajassa otetaan huomioon tavallista pidempi kuljetus-/säilytysaika (esim. > 4 päivää), jonka ei ole osoitettu vaikuttavan testimenetelmän suorituskykyyn (37).

Läpäisyn esto

27. RhCE-kudosmallin on oltava tarpeeksi paksu ja luja, jotta se voi toimia esteenä sytotoksisten vertailuaineiden nopealle kulkeutumiselle sen läpi, kuten on arvioitu esimerkiksi ET_{50}-arvolla (Triton X-100) tai IC_{50}-arvolla (SDS) (taulukko 3). RhCE-kudosmallin kehittäjän/myyjän on osoitettava jokaisen erän läpäisynestokyky, kun se toimittaa kudokset loppukäyttäjälle (ks. 30 kohta).

Morfologia

28. RhCE-kudosmallin histologisen tutkimuksen on osoitettava, että sen rakenne on ihmisen sarveiskalvon kaltainen (ts. että siinä on vähintään kolme kerrosta elinkykyisiä epiteelisoluja ja keratinisoitumaton pinta). Validoitujen vertailumenetelmien osalta kehittäjä/toimittaja on vahvistanut asianmukaisen morfologian, joten testimenetelmän käyttäjän ei tarvitse osoittaa sitä uudestaan jokaisen käytettävän kudoserän osalta.

Toistettavuus

29. Testimenetelmän positiivisilla ja negatiivisilla kontrolleilla saatujen tulosten on osoitettava tulosten toistettavuus pidemmällä aikavälillä.

Laadunvalvonta

30. RhCE-kudosmallia saa käyttää vain, jos sen kehittäjä/toimittaja osoittaa, että kukin RhCE-mallin erä täyttää määritellyt tuotantokriteerit, joiden joukosta elinkykyä (26 kohta) ja läpäisyn estoa (ks. 27 kohta) koskevat perusteet ovat tärkeimmät. RhCE-kudosmallin kehittäjän/toimittajan on määritettävä läpäisyn eston hyväksyttävyysalue (ylempi ja alempi raja-arvo) ET_{50}- tai IC_{50}-arvolla mitattuna (ks. 25 ja 26 kohta). ET_{50}- ja IC_{50}-arvoihin perustuva hyväksyttävyysalue, jota RhCE-kudosmallien kehittäjä/toimittaja on käyttänyt laadunvalvonnassa erän vapauttamisperusteena, esitetään taulukossa 3. RhCE-kudosmallin kehittäjän/toimittajan on annettava testimenetelmän käyttäjille tiedot, jotka osoittavat, että kaikki tuotantokriteerit täyttyvät, jotta käyttäjät voivat ilmoittaa nämä tiedot testiraportissa. Ainoastaan nämä tuotantokriteerit täyttävillä kudoksilla saadut tulokset voidaan hyväksyä luotettavaksi ennusteeksi kemikaaleista, joita ei tarvitse luokitella ja merkitä silmäärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen mukaisesti.

▼M8

Taulukko 3

Laadunvalvonnan perusteet erän vapauttamiseksi tehtaalta myyntiin

Testi	Alempi hyväksyttävyysraja	Ylempi hyväksyttävyysraja
EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (OCL-200) – VVM1 (100 µl 0,3-prosenttista (v/v) Triton X-100:aa)	ET_{50} = 12,2 min	ET_{50} = 37,5 min
SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (HCE/S) – VVM2 (30 minuutin käsittely 50 µl:lla SDS:ää)	IC_{50} = 1 mg/ml	IC_{50} = 3,2 mg/ml

Testikemikaalin ja kontrolliaineiden applikointi

31. Kutakin testikemikaalia ja kutakin kontrolliainetta kohti on käytettävä vähintään kaksi kudosnäytettä jokaisessa testiajossa. Testissä käytetään kahta erilaista käsittelyprotokollaa, yhtä nestemäisille testikemikaaleille ja toista kiinteille testikemikaaleille (34) (35). Kummassakin menetelmässä ja protokollassa kudosmallin pinta on ennen testikemikaalien applikointia kostutettava Dulbeccon fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, jossa ei ole kalsiumia eikä magnesiumia (Ca^{2+}/Mg^{2+}-free DPBS), ihmisen silmän kosteiden olosuhteiden jäljittelemiseksi. Kudosten käsittely aloitetaan altistamalla ne testikemikaalille (-kemikaaleille) ja kontrolliaineille. Kummassakin käsittelyprotokollassa ja kummassakin VVM:ssä epiteelin pinnalle on annosteltava testikemikaalia tai kontrolliainetta tasaisesti riittävä määrä kuitenkin niin, ettei käytetä rajoittamatonta annosta (ks. 32 ja 33 kohta) (lisäys 2).

32. Testikemikaaleja, jotka voidaan pipetoida 37 °C:ssa tai sitä alhaisemmassa lämpötilassa (käyttämällä tarvittaessa mäntäpipettiä), pidetään VVM:issä nesteinä; muussa tapauksessa niitä on pidettävä kiinteinä aineina (ks. 33 kohta). VVM:issä nestemäinen testikemikaali levitetään tasaisesti kudoksen pinnalle (ts. applikointi vähintään 60 µl/cm^2) (ks. lisäys 2 (33) (34)). Kapillaari-ilmiötä (pintajännityksen vaikutuksia), jota voi esiintyä inserttiin (kudoksen pinnalle) levitettävien pienten määrien vuoksi, on mahdollisuuksien mukaan vältettävä, jotta voidaan taata, että testikemikaalia annostellaan kudokselle oikea määrä. Nestemäisillä testikemikaaleilla käsiteltyjä kudoksia inkuboidaan tavanomaisissa viljelyoloissa (37±2 °C, 5±1 % CO_2, ilmankosteus ≥ 95 %) 30 minuuttia. Altistusajan päätyttyä nestemäinen testikemikaali ja kontrolliaineet on poistettava kudoksen pinnalta huolellisesti huuhtelemalla ne kunnolla kalsiumittomalla ja magnesiumittomalla DPBS:llä huoneenlämpötilassa. Tämän huuhteluvaiheen jälkeen seuraa altistuksen jälkeinen upotus tuoreeseen liuokseen huoneenlämpötilassa (kudokseen mahdollisesti absorboituneen testikemikaalin poistamiseksi) määrätyksi ajaksi, joka vaihtelee käytettävän VVM:n mukaan. Vain VVM1:tä noudatettaessa tehdään altistuksen jälkeinen inkubointi tuoreessa liuoksessa tavanomaisissa viljelyoloissa ennen MTT-määrityksen tekemistä (ks. lisäys 2, (34) (35)).

33. Testikemikaaleja, joita ei voida pipetoida enintään 37 °C:n lämpötilassa, pidetään VVM:issä kiinteinä aineina. Testikemikaalia on applikoitava riittävä määrä, jotta se peittää kudoksen koko pinnan; määrän on oltava vähintään 60 mg/cm^2 (lisäys 2). Kiinteät aineet on mahdollisuuksien mukaan testattava hienona jauheena. Kiinteillä testikemikaaleilla käsiteltyjä kudoksia inkuboidaan määrätty aika (käytettävän VVM:n mukaan) tavanomaisissa viljelyoloissa (ks. lisäys 2, (34) (35)). Altistusajan päätyttyä kiinteä testikemikaali ja kontrolliaineet on poistettava kudoksen pinnalta huolellisesti huuhtelemalla ne kunnolla kalsiumittomalla ja magnesiumittomalla DPBS:llä huoneenlämpötilassa. Tämän huuhteluvaiheen jälkeen seuraa altistuksen jälkeinen upotus

▼M8

tuoreeseen liuokseen huoneenlämpötilassa (kudokseen mahdollisesti absorboituneen testikemikaalin poistamiseksi) määrätyksi ajaksi, joka vaihtelee käytettävän VVM:n mukaan, ja altistuksen jälkeinen inkubointi tuoreessa liuoksessa tavanomaisissa viljelyoloissa ennen MTT-määrityksen tekemistä (ks. lisäys 2, (34) (35)).

34. Kussakin testiajossa on käytettävä samanaikaisia negatiivisia ja positiivisia kontrolleja osoittamaan, että solujen elinkyky (negatiivisella kontrollilla määritettynä) ja kudosten herkistyminen (positiivisella kontrollilla määritettynä) ovat aikaisempien tietojen perusteella määritettyjen hyväksyttävyysalueen mukaisia. Samanaikainen negatiivinen kontrolli muodostaa myös perustason (kudoksen elinkykyisyys 100 prosenttia) testikemikaalilla käsiteltyjen kudosten suhteellisen prosentuaalisen elinkykyisyyden laskemista varten (%Viability$_{test}$). VVM:ien yhteydessä käytettäväksi suositeltu positiivinen kontrolliaine on laimentamaton metyyliasetaatti (CAS-nro 79-20-9, kaupallisesti saatavana esimerkiksi Sigma-Aldrichilta, luettelonro 45997; neste). VVM1:n yhteydessä käytettäväksi suositeltu negatiivinen kontrolliaine on ultrapuhdas H_2O; VVM2:n yhteydessä se on kalsiumiton ja magnesiumiton DPBS. Näitä aineita käytettiin kontrolliaineina validoitujen vertailumenetelmien validointitutkimuksissa, ja niistä on eniten tietoa saatavilla. Sopivien vaihtoehtoisten positiivisten tai negatiivisten kontrolliaineiden käytölle on esitettävä tieteelliset ja asianmukaiset perustelut. Negatiiviset ja positiiviset kontrollit on testattava samalla protokollalla (samoilla protokollilla), jota (joita) käytettiin testiajoon sisältyneiden testikemikaalien yhteydessä (ts. nestemäiset ja/tai kiinteät aineet). Tämän applikoinnin jälkeen seuraa varsinainen käsittelyaltistus, huuhtelu, altistuksen jälkeinen immersio ja inkubointi tarvittaessa, kuten on kuvattu nestemäisten testikemikaalien kanssa samanaikaisten kontrolliajojen osalta (ks. 32 kohta) tai kiinteiden testikemikaalien kanssa samanaikaisten kontrolliajojen osalta (ks. 33 kohta), ennen MTT-määrityksen tekemistä (ks. 35 kohta) (34) (35). Yksi sarja negatiivisia ja positiivisia kontrolleja riittää kaikille samaan testiajoon sisältyville testikemikaaleille, joiden fysikaalinen olomuoto on sama (neste tai kiinteä aine).

Kudoksen elinkykymittaukset

35. MTT-määritysmenetelmä on standardoitu kvantitatiivinen menetelmä (16), jota on käytettävä kudoksen elinkyvyn mittaamiseen tässä testimenetelmässä. MTT-menetelmä sopii käytettäväksi kolmiulotteisen kudosmallin kanssa. MTT-määritys tehdään heti altistuksen jälkeisen inkubointivaiheen jälkeen. VVM:issä RhCE-kudosmallinäyte laitetaan 0,3 ml:aan MTT-liuosta (1 mg/ml) 180±15 minuutiksi tavanomaisiin viljelyoloihin. RhCE-kudosmallin elinkykyiset solut pelkistävät vitaaliväri MTT:n siniseksi saostuneeksi MTT-formatsaaniksi. Sen jälkeen saostunut sininen MTT-formatsaanituote uutetaan kudoksesta käyttämällä riittävää määrää isopropanolia (tai muuta vastaavaa liuotinta) (34) (35). Nestemäisillä testikemikaaleilla testatut kudokset on uutettava niiden ylä- ja alaosasta, kun taas kiinteillä testikemikaaleilla ja värillisillä nesteillä testatut kudokset on uutettava vain kudoksen alaosasta (jotta minimoidaan isopropanoliuuton mahdollinen kontaminoituminen testikemikaalilla, jota kudokseen on voinut jäädä). Myös kudokset, jotka on testattu nestemäisillä testikemikaaleilla, joita ei ole vielä huuhdeltu pois, on uutettava vain kudoksen alaosasta. Samanaikaisesti testattuja negatiivisia ja positiivisia kontrolliaineita on käsiteltävä samalla tavoin kuin testattua kemikaalia. Uutettu MTT-formatsaani voidaan kvantifioida joko vakioabsorbanssin (optisen tiheyden) mittauksella 570 nm:n aallonpituudella käyttämällä ±30 nm:n kaistanpäästösuodatinta tai käyttämällä HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä (ks. 42 kohta) (11) (36).

▼**M8**

36. Testikemikaalin optiset ominaisuudet tai sen kemiallinen vaikutus MTT:hen voivat häiritä MTT-formatsaanin mittausta ja johtaa virheelliseen arvioon kudoksen elinkyvystä. Testikemikaalit voivat häiritä MTT-määritystä joko pelkistämällä MTT:n suoraan siniseksi MTT-formatsaaniksi ja/tai väri-interferenssillä, jos testikemikaali absorboi valoa luonnostaan tai käsittelymenettelyjen takia samalla optisella tiheydellä kuin MTT-formatsaani (noin 570 nm). Ennen testausta on tehtävä esitarkistuksia, jotta voidaan tunnistaa mahdolliset suorat MTT:n pelkistimet ja/tai väri-interferenssiä aiheuttavat kemikaalit, ja käytettävä lisäkontrolleja, jotta näistä testikemikaaleista johtuva mahdollinen häiriö voidaan havaita ja korjata (ks. 37–41 kohta). Tämä on tärkeää etenkin silloin, jos tiettyä testikemikaalia ei saada kokonaan pois RhCE-kudosmallista huuhtelussa tai jos se tunkeutuu sarveiskalvon kaltaisen epiteelin läpi, jolloin sitä on RhCE-kudosmallissa, kun MTT-määritys tehdään. Sellaisten testikemikaalien yhteydessä, jotka absorboivat valoa samalla aallonpituusalueella kuin MTT-formatsaani (luonnostaan tai käsittelyn jälkeen) ja jotka eivät sovellu MTT-formatsaanin vakioabsorbanssimittaukseen (optinen tiheys) liian voimakkaan interferenssin takia (voimakas absorptio alueella 570±30 nm), voidaan käyttää HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä MTT-formatsaanin mittaamiseen (ks. 41 ja 42 kohta) (11) (36). MTT:n suoran pelkistyksen ja väriaineiden aiheuttamien häiriöiden korjaamismenettelyt selostetaan yksityiskohtaisesti validoituja vertailumenetelmiä koskevissa vakiotoimintamenettelyissä (34) (35). Havainnolliset vuokaaviot, joissa opastetaan, miten tunnistetaan suorat MTT:n pelkistimet ja/tai väri-interferenssiä aiheuttavat kemikaalit ja käsitellään niitä, ovat VVM:n 1 osalta lisäyksessä III ja VVM:n 2 osalta lisäyksessä IV.

37. Jotta saadaan selville, aiheuttavatko MTT-formatsaanin kanssa samalla aallonpituudella valoa (luonnostaan tai käsittelyn jälkeen) absorboivat testikemikaalit häiriötä ja tarvitaanko lisäkontrolleja, testikemikaalia lisätään veteen ja/tai isopropanoliin ja sitä inkuboidaan asianmukainen aika huoneenlämpötilassa (ks. lisäys 2, (34) (35)). Jos vedessä ja/tai isopropanolissa oleva testikemikaali absorboi riittävästi valoa aallonpituusalueella 570±20 nm (VVM1) (ks. lisäys 3) tai jos testikemikaalin ja veden sekoittamisen tuloksena on värillinen liuos (VVM2) (ks. lisäys 4), testikemikaalin oletetaan häiritsevän MTT-formatsaanin vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) ja on käytettävä useampia väriainekontrolleja tai vaihtoehtoisesti on käytettävä HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä, jolloin näitä kontrolleja ei tarvita (ks. 41 ja 42 kohta sekä lisäys III ja IV) (34) (35). Vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä kutakin häiritsevää testikemikaalia on laitettava vähintään kahdelle elinkykyiselle rinnakkaiskudosnäytteelle, joita käytetään koko testimenettelyn ajan mutta jotka inkuboidaan MTT-liuoksen sijasta väliaineessa MTT-inkubointivaiheen aikana, jotta saadaan aikaan epäspesifi värikontrolli elävillä kudoksilla (NSC_{living}) (34) (35). NSC_{living}-kontrolli on tehtävä samanaikaisesti värillisellä testikemikaalilla tehtävän testin kanssa, ja jos testejä tehdään useita, jokaisen testin aikana (jokaisessa testiajossa) on tehtävä itsenäinen NSC_{living}-kontrolli elävien kudosten luontaisen biologisen vaihtelun vuoksi. Kudoksen todellinen elinkyky lasketaan näin: häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT-liuoksessa inkuboitujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkyky ($\%Viability_{test}$) miinus häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä väliaineessa inkuboitujen elävien kudosten epäspesifisen ja samanaikaisesti korjattavan testin kanssa testatun värikontrollin prosenttiosuudella ($\%NSC_{living}$); kudoksen todellinen elinkyky = $[\%Viability_{test}] - [\%NSC_{living}]$.

38. Jotta suorat MTT:n pelkistimet voidaan tunnistaa, kukin testikemikaali tulee lisätä tuoreeseen MTT-liuokseen. Asianmukainen määrä testikemikaalia lisätään MTT-liuokseen, ja seosta inkuboidaan noin kolme tuntia tavanomaisissa

▼**M8**

viljelyoloissa (ks. lisäys III ja IV) (34) (35). Jos testikemikaalia sisältävä MTT-seos (tai suspensio liukenemattomien testikemikaalien osalta) muuttuu siniseksi tai violetiksi, testikemikaalin oletetaan olevan suora MTT:n pelkistin, jolloin on tehtävä toiminnallinen tarkastus kuolleilla RhCE-kudosmalleilla riippumatta siitä, käytetäänkö vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tai HPLC-/UPLC-spektrofotometriamenettelyä. Tässä toiminnallisessa lisätarkastuksessa käytetään kuolleita kudoksia, joiden metabolinen toiminta on vähäistä mutta jotka absorboivat ja sitovat testikemikaalia itseensä yhtä paljon kuin elinkykyiset kudokset. VVM1:ssä kuolleet kudokset valmistetaan altistamalla ne alhaiselle lämpötilalle (”freeze-killed”). VVM2:ssa kuolleet kudokset valmistetaan inkuboimalla niitä tavallista pidempään (vähintään 24±1 h) vedessä, minkä jälkeen ne säilötään alhaisessa lämpötilassa (”water-killed”) Kutakin MTT:tä pelkistävää testikemikaalia laitetaan vähintään kahdelle sellaiselle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testimenettelyn ajan. Näin saadaan aikaan epäspesifinen MTT:n pelkistin (NSMTT) -kontrolli (34) (35). Yksi NSMTT-kontrolli testikemikaalia kohti riittää tehtyjen itsenäisten testien/testiajojen määrästä riippumatta. Kudoksen todellinen elinkyky lasketaan näin: MTT:n pelkistimelle altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkyky (%$Viability_{test}$) miinus samalle MTT:n pelkistimelle altistettujen kuolleiden kudosten epäspesifisen MTT-pelkistyksen prosenttiosuus laskettuna suhteessa negatiiviseen kontrolliin, joka testattiin samanaikaisesti korjattavan testin kanssa (%NSMTT); kudoksen todellinen elinkyky = [%$Viability_{test}$] - [%NSMTT].

39. Niille testikemikaaleille, joiden todetaan tuottavan sekä väri-interferenssiä (ks. 37 kohta) että suoraa MTT:n pelkistystä (ks. 38 kohta), tarvitaan vielä kolmas kontrollisarja edellisissä kohdissa kuvattujen NSMTT- ja NSC_{living}-kontrollien lisäksi vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) tehtäessä. Näin on yleensä sellaisten tummien testikemikaalien yhteydessä, jotka absorboivat valoa aallonpituudella 570±30 nm (esimerkiksi sininen, violetti, musta), koska niiden luontainen väri vaikeuttaa sen arviointia, miten ne pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan 38 kohdassa kuvatun mukaisesti. Tämän vuoksi on oletusarvoisesti käytettävä NSMTT-kontrolleja NSC_{living}-kontrollien kanssa. Niin elävät kuin kuolleet kudokset voivat absorboida ja sitoa itseensä testikemikaaleja, joille tehdään NSMTT- ja NSC_{living}-kontrollit. Näin ollen NSMTT-kontrolli saattaa tässä tapauksessa korjata paitsi testikemikaalin mahdollisesti aiheuttaman suoran MTT:n pelkistyksen myös väri-interferenssin, joka johtuu siitä, että kuolleet kudoksetabsorboivat ja sitovat itseensä testikemikaalia. Tämä taas voi johtaa väri-interferenssin kaksinkertaiseen korjaamiseen, koska NSC_{living}-kontrollilla korjataan jo väri-interferenssi, joka johtuu siitä, että elävät kudokset absorboivat ja sitovat itseensä testikemikaalia. Jotta vältetään väri-interferenssin mahdollinen kaksinkertainen korjaaminen, on tehtävä kolmas, epäspesifinen väri kuolleissa kudoksissa -kontrolli (NSC_{killed}) (ks. lisäykset III ja IV) (34) (35). Tässä lisäkontrollissa testikemikaalia laitetaan vähintään kahdelle kuolleesta kudoksesta tehdylle rinnakkaisnäytteelle, joita käytetään koko testimenettelyn ajan mutta jotka inkuboidaan väliaineessa MTT-liuoksen sijasta MTT-inkubointivaiheessa. Yksi NSC_{killed}-kontrolli testikemikaalia kohti riittää tehtyjen itsenäisten testien/testiajojen määrästä riippumatta, mutta se on tehtävä samaan aikaan kuin NSMTT-kontrolli ja samalla kudoserällä. Kudoksen todellinen elinkyky lasketaan näin: testikemikaalille altistettujen elävien kudosten prosentuaalinen elinkyky (%$Viability_{test}$) miinus %NSMTT miinus %NSC_{living}plus häiritsevälle testikemikaalille altistettujen ja MTT:tä sisältämättömässä väliaineessa inkuboitujen kuolleiden kudosten epäspesifinen väri laskettuna suhteessa korjattavan testin kanssa samanaikaisesti tehtyyn negatiiviseen kontrolliin (%NSC_{killed}); kudoksen todellinen elinkyky = [%$Viability_{test}$] - [%NSMTT] - [%NSC_{living}] + [%NSC_{killed}].

▼**M8**

40. On tärkeää muistaa, että epäspesifinen MTT:n pelkistys ja epäspesifiset väri-interferenssit voivat lisätä kudosnäytteen optista tiheyttä (kun tehdään vakioabsorbanssimittauksia) spektrofotometrin lineaarista asteikkoa suuremmaksi ja että epäspesifinen MTT:n pelkistys voi myös kasvattaa kudosnäytteen MTT-formatsaanin huippualuetta (kun tehdään HPLC-/UPLC-spektrofotometriamittauksia) spektrofotometrin lineaarista asteikkoa suuremmaksi. Tämän vuoksi jokaisen laboratorion on määritettävä spektrofotometrinsä lineaarinen asteikko optisen tiheyden / huippualueen osalta esimerkiksi MTT-formatsaanilla (CAS-nro 57360-69-7), jota on kaupallisesti saatavilla esimerkiksi Sigma-Aldrichilta (luettelonro M2003) ennen sääntelytarkoituksiin liittyvien testikemikaalien testaamisen aloittamista.

41. Vakioabsorbanssimittaus (optinen tiheys) on asianmukainen suorien MTT:n pelkistimien ja väri-interferenssiä aiheuttavien testikemikaalien määrittämisessä spektrofotometrillä, jos MTT-formatsaanin mittaukseen liittyvä havaittu interferenssi ei ole liian voimakas (ts. kudosnäytteistä testikemikaalilla saadut optiset tiheydet ilman suoran MTT:n pelkistyksen ja/tai väri-interferenssin korjausta ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon sisällä). Sellaisiin testikemikaaleihin, joiden tuottama %NSMTT ja/tai $\%NSC_{living}$ on ≥ 60 prosenttia (VVM1, ja VVM2 nesteprotokollan osalta) tai 50 prosenttia (VVM2 kiinteiden aineiden protokollan osalta) negatiivisesta kontrollista, on suhtauduttava varauksellisesti, koska tämä on VVM:issä vahvistettu raja-arvo, jolla erotellaan luokitellut kemikaalit luokittelemattomista (ks. 44 kohta). Vakioabsorbanssia (optinen tiheys) ei kuitenkaan voida mitata, jos MTT-formatsaanin mittaukseen kohdistuva interferenssi on liian voimakas (ts. jos se johtaa siihen, että testikudosnäytteiden korjaamattomat optisen tiheyden arvot ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon ulkopuolella). Värillisiä testikemikaaleja tai testikemikaaleja, jotka värjäytyvät kosketuksessa veden tai isopropanolin kanssa ja jotka häiritsevät MTT-formatsaanin vakioabsorbanssimittausta (optinen tiheys) liian voimakkaasti, voidaan silti arvioida käyttämällä HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa (ks. lisäys III ja IV). Tämä johtuu siitä, että HPLC-/UPLC-järjestelmällä MTT-formatsaani voidaan erottaa kemikaalista ennen sen kvantifiointia (36). Tästä syystä NSC_{living}- tai NSC_{killed}-kontrolleja ei tarvita koskaan HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa käytettäessä siitä riippumatta, mikä testattava kemikaali on. NSMTT-kontrolleja on kuitenkin käytettävä, jos testikemikaalin epäillään olevan suora MTT:n pelkistin (38 kohdassa kuvattua menettelyä noudattaen). NSMTT-kontrolleja on käytettävä myös, jos testikemikaalilla on väri (luontaisesti tai jos se värjäytyy vedessä), joka vaikeuttaa sen arviointia, miten se pystyy pelkistämään MTT:tä suoraan, 38 kohdassa kuvatun mukaisesti. Jos MTT-formatsaanin mittaamisessa käytetään HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa, kudoksen prosentuaalinen elinkyky lasketaan testikemikaalille altistetuista elävistä kudoksista saadun MTT-formatsaanin huippualueen prosenttiosuutena suhteessa samanaikaisesta negatiivisesta kontrollista saadun MTT-formatsaanin huippualueeseen. Niiden testikemikaalien osalta, jotka pystyvät pelkistämään MTT:tä suoraan, kudoksen todellinen elinkyky lasketaan tällä kaavalla: $\%Viability_{test}$miinus %NSMTT, kuten 38 kohdan viimeisessä virkkeessä on kuvattu. On myös syytä muistuttaa siitä, että suoria MTT:n pelkistimiä, myös sellaisia, jotka voivat aiheuttaa myös väri-interferenssiä ja jotka pysyvät kudoksissa käsittelyn jälkeen ja pelkistävät MTT:tä niin voimakkaasti, että testattujen kudosnäytteiden optiset tiheydet (vakiotiheysmittausta käyttäen) tai huippualueet (UPLC-/HPLC-spektrofotometriaa käyttäen) ovat spektrofotometrin lineaarisen asteikon ulkopuolella, ei voida arvioida RhCE-testimenetelmillä, vaikka tällaista oletetaan tapahtuvan vain hyvin harvoin.

42. HPLC-/UPLC-spektrofotometriaa voidaan käyttää kaikentyyppisten testikemikaalien (värillisten, värittömien, MTT:n pelkistimien ja muiden kuin MTT:n pelkistimien) kanssa MTT-formatsaanin mittaamiseen (11) (36). HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmien moninaisuuden vuoksi ei ole

▼M8

mahdollista, että jokainen käyttäjä määrittäisi täsmälleen samat järjestelmäolosuhteet. Tämän vuoksi HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmien asianmukaisuus on osoitettava, ennen kuin niitä käytetään kudosnäytteiden MTT-formatsaanin kvantifioimisessa. Järjestelmien on täytettävä hyväksymiskriteerit tavanomaisten laatuparametrien osalta Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston bioanalyyttisten menetelmien validointia koskevissa ohjeissa kuvatun mukaisesti (36) (38). Nämä keskeiset parametrit ja niihin liittyvät hyväksymiskriteerit esitetään lisäyksessä 5. Kun lisäyksessä 5 määritetyt hyväksymiskriteerit täyttyvät, kyseistä HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmää pidetään asianmukaisena ja sillä voidaan mitata MTT-formatsaania tässä testimenetelmässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

Hyväksymisperusteet

43. Jokaisessa testiajossa, jossa käytetään laadunvalvontakriteerit (ks. 30 kohta) täyttäviä RhCE-kudoseriä, negatiivisella kontrolliaineella käsiteltyjen kudosten optisen tiheyden on kuvastettava kudosten laatua kuljetus- ja vastaanottovaiheiden sekä kaikkien protokollan mukaisten menettelyjen jälkeen, eikä tämä arvo saa olla aikaisemmin määritettyjä, taulukossa 2 kuvattuja raja-arvoja pienempi tai suurempi (ks. 26 kohta). Vastaavasti positiivisella kontrolliaineella, kuten metyyliasetaatilla, käsiteltyjen kudosten keskimääräinen elinkyky on oltava < 50 prosenttia suhteessa VVM1:n negatiiviseen kontrolliin joko nestemäisiä tai kiinteitä aineita koskevan protokollan mukaisesti, ja ≤ 30 prosenttia (nesteprotokolla) tai ≤ 20 prosenttia (kiinteiden aineiden protokolla) suhteessa VVM2:n negatiiviseen kontrolliin. Arvojen on siis kuvastettava kudosten kykyä reagoida ärsyttävään testikemikaaliin testimenetelmän yhteydessä käytetyissä olosuhteissa (34) (35). Testikemikaaleilla ja kontrolliaineilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden vaihtelun on oltava hyväksytyissä rajoissa (esimerkiksi kahden rinnakkaiskudosnäytteen välisen elinkykyisyyden erotuksen pitää olla alle 20 prosenttia tai kolmen rinnakkaiskudosnäytteen välinen keskihajonta saa olla enintään 18 prosenttia). Jos testiajossa käytetyn negatiivisen kontrollin tai positiivisen kontrollin tulos on hyväksyttävyysalueen ulkopuolella, testiajoa ei pidetä hyväksyttävänä ja se on toistettava. Jos testikemikaalin rinnakkaiskudosnäytteiden vaihtelu on hyväksyttävyysalueen ulkopuolella, testiajoa ei pidetä hyväksyttävänä ja testikemikaali on testattava uudelleen.

Tulosten tulkinta ja ennustemalli

44. Kudoksen keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky (rinnakkaiskudosnäytteiden keskiarvo) normalisoituna negatiiviseen kontrolliin, jonka arvoksi on asetettu 100 prosenttia, on laskettava käyttämällä jokaisesta testikemikaalin rinnakkaiskudosnäytteestä saatuja OD-arvoja/huippualuearvoja. Kudoksen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvo, jonka perusteella määritetään ne testikemikaalit, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta (YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”), esitetään taulukossa 4. Tuloksia on siis tulkittava näin:

— Testikemikaalia ei tarvitse luokitella ja merkitä YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen (ei luokitusta) mukaisesti, jos kudoksen keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky altistuksen ja sen jälkeisen inkuboinnin jälkeen on suurempi kuin (>) määritetty kudoksen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvo (taulukko 4). Tässä tapauksessa lisätestaus muilla testimenetelmillä ei ole tarpeen.

▼M8

— Jos kudoksen keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky altistuksen ja sen jälkeisen inkuboinnin jälkeen on pienempi tai yhtä suuri kuin (≤) määritetty kudoksen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvo, ennustetta ei voida tehdä (taulukko 4). Tässä tapauksessa testausta on jatkettava muilla testimenetelmillä, koska RhCE-testimenetelmillä saatiin tietty määrä vääriä positiivisia tuloksia (ks. 14 ja 15 kohta) eikä luokituspäätöstä YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokkien 1 ja 2 välillä voida tehdä (ks. 17 kohta).

Taulukko 4

Ennustemallit YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen luokituksen mukaan

VVM	Ei luokitusta	Ei voida ennustaa
VVM1 – EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (kumpikin protokolla)	Kudoksen keskimääräinen elinkyky > 60 %	Kudoksen keskimääräinen elinkyky ≤ 60 %
VVM2 - SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (nesteprotokolla)	Kudoksen keskimääräinen elinkyky > 60 %	Kudoksen keskimääräinen elinkyky ≤ 60 %
VVM2 - SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (kiinteiden aineiden protokolla)	Kudoksen keskimääräinen elinkyky > 50 %	Kudoksen keskimääräinen elinkyky ≤ 50 %

45. Kun testikemikaalin luokittelu on yksiselitteinen, se voidaan testata yhdessä vähintään kaksi rinnakkaiskudosnäytettä käsittävässä testissä. Jos luokittelu on vaikeaa, esimerkiksi jos rinnakkaisnäytteille saadut tulokset ovat erilaiset ja/tai jos kudoksen keskimääräinen elinkyky on 60 ± 5 prosenttia (VVM1 ja VVM2 nesteprotokollan osalta) tai 50±5 prosenttia (VVM2 kiinteiden aineiden protokollan osalta), on harkittava toista testiä ja myös kolmatta, jos kahden ensimmäisen testin tulokset poikkeavat toisistaan.

46. Tietyntyyppisille seoksille voidaan harkita erilaisia kudoksen prosentuaalisen elinkyvyn raja-arvoja, joilla erotellaan luokitellut testikemikaalit luokittelemattomista, jos se on tarkoituksenmukaista ja perusteltua. Näin voidaan parantaa testimenetelmän kokonaistehokkuutta kyseisen tyyppisten seosten osalta (ks. 14 kohta). Vertailukemikaalien käyttö voi olla hyödyllistä arvioitaessa tuntemattomien testikemikaalien tai tuoteluokan vakavan silmävaurion / silmä-ärsytyksen aiheuttamispotentiaalia tai luokitellun kemikaalin suhteellista silmätoksisuuspotentiaalia tietyllä positiivisten vasteiden alueella.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

47. Jokaisesta testikemikaalista on esitettävä taulukossa testiajon yksittäisiä rinnakkaiskudosnäytteitä koskevat tiedot (esimerkiksi kunkin testikemikaalin ja kontrollin OD-arvot / MTT-formatsaanin huippualuearvot sekä laskettu kudoksen prosentuaalinen elinkyky sekä tiedot lopullisesta RhCE-testimenetelmällä saadusta ennusteesta) ja tarvittaessa myös tiedot toistetuista kokeista. Lisäksi on esitettävä kudoksen keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky sekä kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välinen ero (jos n=2 rinnakkaiskudosnäytettä) tai keskihajonta (jos n≥ 3 rinnakkaiskudosnäytettä) jokaisesta yksittäisestä testikemikaalista ja kontrollista. Jokaisen testatun kemikaalin osalta on ilmoitettava myös MTT-formatsaanin mittauksessa mahdollisesti havaittu testikemikaalin interferenssi, joka johtuu MTT:n suorasta pelkistyksestä ja/tai väri-interferenssistä.

Testiraportti

48. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

▼**M8**

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto, haihtuvuus, pH, logP-arvo, molekyylipaino, kemiallinen luokka ja muut tutkimuksen tekemisen kannalta olennaiset fysikaalis-kemiaaliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fysikaalinen olomuoto ja muut tutkimuksen tekemisen kannalta olennaiset fysikaalis-kemiaaliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa.

Positiiviset ja negatiiviset kontrolliaineet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto, haihtuvuus, molekyylipaino, kemiallinen luokka ja muut tutkimuksen tekemisen kannalta olennaiset fysikaalis-kemiaaliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan, mikä on käytännössä mahdollista, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa perustelut, jos on käytetty muuta negatiivista kontrolliainetta kuin ultrapuhdasta vettä tai kalsiumitonta ja magnesiumitonta DPBS:ää

— tarvittaessa perustelut, jos on käytetty muuta positiivista kontrolliainetta kuin laimentamatonta metyyliasetaattia

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisiin ja negatiivisiin kontrollituloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksyntäkriteereistä.

Tutkimuksen teettäjää ja testauslaitosta koskevat tiedot:

— Tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja.

— *Käytetty RhCE-kudosmalli ja protokolla (sekä tarvittaessa perustelut valinnoille)*

▼**M8**

Testimenetelmän olosuhteet

— käytetty RhCe-kudosmalli ja eränumero

— MTT-formatsaanin kvantifioinnissa käytetty aallonpituus ja kaistanpäästöarvo (tarvittaessa) sekä mittauslaitteen (esimerkiksi spektrofotometrin) lineaarinen asteikko

— kuvaus MTT-formatsaanin kvantifioinnissa käytetystä menetelmästä

— kuvaus käytetystä HPLC-/UPLC-spektrofotometriajärjestelmästä tarvittaessa

— täydelliset RhCE-kudosmallin käyttöä tukevat tiedot (myös sen suoritusarvot). Näitä voivat olla esimerkiksi

i) elinkykyisyyden laatukontrolli (toimittaja)

ii) elinkykyisyys testimenetelmän olosuhteissa (käyttäjä)

iii) läpäisyneston laatukontrolli

iv) morfologia, jos saatavilla

v) toistettavuus ja ennustamiskyky

vi) muut RhCE-kudosmallin laatukontrollit, jos saatavilla

— viittaukset RhCE-kudosmallia koskeviin aiempiin tietoihin. Näitä voivat olla esimerkiksi laatukontrollitietojen hyväksyttävyys; viitattava aikaisempia eriä koskeviin tietoihin

— maininta siitä, että testauslaitos on osoittanut pätevyytensä tämän testimenetelmän käytössä pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen kemikaalien testaamisella ennen rutiininomaisen käytön aloittamista.

Testiajon ja testin hyväksymisperusteet

— positiivisen ja negatiivisen kontrollin keskiarvot ja hyväksyttävyysalueet aikaisempien tietojen perusteella

— hyväksyttävä vaihtelu rinnakkaiskudosnäytteiden välillä positiivisten ja negatiivisten kontrollien osalta

— hyväksyttävä vaihtelu rinnakkaiskudosnäytteiden välillä testikemikaalin osalta.

Testimenettely

— tiedot käytetystä testimenettelystä

— testikemikaalin ja käytettyjen kontrolliaineiden annokset

— altistuksen sekä sen jälkeisen immersion ja inkuboinnin kesto ja lämpötila (tarvittaessa)

— kuvaus testimenettelyn mahdollisista muutoksista

▼M8

— tiedot kontrolleista, joita on käytetty suorille MTT:n pelkistimille ja/tai värjääville testikemikaaleille, jos tarpeen

— testikemikaalia ja kontrolleja kohti käytettyjen rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä (positiivinen/negatiivinen kontrolli, NSMTT, NSCliving ja NSCkilled tarvittaessa).

Tulokset

— Taulukkomuotoiset tiedot yksittäisistä testikemikaaleista ja kontrolliaineista jokaisesta testiajosta (myös toistokokeista tarvittaessa) ja jokaisesta rinnakkaismittauksesta sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, kudosten prosentuaalinen elinkyky, kudosten keskimääräinen prosentuaalinen elinkyky, rinnakkaiskudosnäytteiden välinen ero tai keskihajonta sekä lopullinen ennuste.

— Tarvittaessa tulokset kontrolleista, joita käytettiin suorien MTT:n pelkistimien ja/tai värjäävien testikemikaalien yhteydessä, sekä OD-arvot tai MTT-formatsaanin huippualue, %NSMTT, %NSCliving, %NSCkilled, rinnakkaiskudosnäytteiden välinen ero tai keskihajonta, lopullinen oikea kudosten prosentuaalinen elinkyky ja lopullinen ennuste.

— Testikemikaalista (-kemikaaleista) ja kontrolliaineista saadut tulokset tietyssä testiajossa ja testin hyväksymisperusteisiin nähden.

— Kuvaus muista havaituista vaikutuksista, kuten värillisen testikemikaalin aiheuttamasta kudosten värjäytymisestä.

Tulosten tarkastelu

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) YK (2015). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York and Geneva: United Nations. Saatavana osoitteesta http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(2) Tässä liitteessä oleva B.5 luku, Akuutti silmän ärsyttävyys/syövyttävyys.

(3) Tässä liitteessä oleva B.47 luku, Naudan sarveiskalvon sameuden ja läpäisevyyden testimenetelmä, jolla voidaan määrittää i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta.

(4) Tässä liitteessä oleva B.48 luku, Eristetyn kanan silmän käyttöön perustuva testimenetelmä, jolla tunnistetaan i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, joita ei tarvitse luokitella silmä-ärsytyksen tai vakavien silmävaurioiden osalta.

(5) Tässä liitteessä oleva B.61 luku, Fluoreseiinivuototestimenetelmä silmää syövyttävien ja silmää vakavasti ärsyttävien aineiden tunnistamiseksi.

▼**M8**

(6) Tässä liitteessä oleva B.68 luku, Lyhytaikaiseen altistukseen perustuva *in vitro* -testimenetelmä, jolla voidaan määrittää i) vakavia silmävaurioita aiheuttavat kemikaalit ja ii) kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261–266.

(8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28 125 EN; doi:10.2787/41680. Saatavana osoitteessa hhttp://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. Saatavana osoitteessa http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43–53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55–70.

(12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. Saatavana osoitteessa http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Tekeillä oleva käsikirjoitus).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377–390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1–9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

(17) OECD (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(18) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339–364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. Teoksessa: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, s. 147–159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619–626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476–1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1–18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701–723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521–547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113–126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. Julkaisussa *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, s. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. Teoksessa Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, s. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106–117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Saatavana osoitteessa [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Saatavana osoitteessa https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741–761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101–127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Saatavana osoitteessa http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼M8

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testimenetelmän tulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testimenetelmällä saatujen oikeiden tulosten osuutta (18).

Vertailukemikaali: Testikemikaalin vertailustandardina käytettävä kemikaali. Vertailukemikaalilla on oltava seuraavat ominaisuudet: i) luotettava alkuperä, joka pysyy samana, sen tunnistamista ja luonnehtimista varten; ii) rakenteellinen ja/tai funktionaalinen vastaavuus tai sama kemiallinen tai tuoteluokka kuin testattavalla kemikaalilla (testattavilla kemikaaleilla), iii) tunnetut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, iv) todisteet tunnetuista vaikutuksista ja v) tunnettu voimakkuus tavoitellulla vastealueella.

Alhaalta ylös suuntautuva lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään testikemikaalille, jonka ei oleteta vaativan luokitusta ja merkintöjä silmä-ärsytyksen tai vakavan silmävaurion osalta. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, jotka eivät vaadi luokitusta ja merkintöjä (negatiivinen tulos), ja muut kemikaalit (positiivinen tulos).

Kemikaali: Aine tai seos.

Vastaavuus: Ks. ”tarkkuus”.

Sarveiskalvo: Silmämunan etuosan läpinäkyvä osa, joka peittää värikalvon ja silmäterän ja päästää valoa sisäosiin.

CV: Coefficient of variation, variaatiokerroin.

Dev: Deviation, poikkeama.

EIT: Eye Irritation Test, silmä-ärsytystesti.

EURL ECVAM: Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen vertailulaboratorio.

Silmä-ärsytys: Silmän muutokset, jotka syntyvät, kun testikemikaalia on annosteltu silmän etupinnalle ja jotka korjautuvat täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”silmiin kohdistuvat korjautuvat vaikutukset” ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2.

ET_{50}: Altistusaika, joka tarvitaan, jotta kudoksen elinkyky vähenee 50 prosenttia applikoitaessa vertailukemikaalia tiettynä kiinteänä pitoisuutena.

Väärien negatiivisten tulosten osuus: Kaikkien positiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti negatiivisiksi. Se on yksi testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Väärien positiivisten tulosten osuus: Kaikkien negatiivisten aineiden osuus, jotka testimenetelmä yksilöi virheellisesti positiivisiksi. Se on yksi testimenetelmän suorituskyvyn indikaattoreista.

Vaara: Aineen tai tilanteen sisäinen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

HCE: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium.

▼M8

HPLC: Korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

IC_{50}: Pitoisuus, jossa vertailukemikaali alentaa kudoksen elinkykyä 50 prosentilla kiinteän altistusajan jälkeen (esimerkiksi 30 minuutin käsittely SDS:llä).

Rajoittamaton annos: RhCE-kudosmalliin applikoidun testikemikaalin määrä, joka ylittää määrän, joka tarvitaan epiteelin pinnan peittämiseksi kokonaisuudessaan ja tasaisesti.

Silmiin kohdistuvat korjautumattomat vaikutukset: Ks. ”vakava silmävaurio”.

LLOQ: Alempi määritysraja.

LogP: Oktanoli/vesi-jakaantumiskertoimen logaritmi.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Positiivinen kontrolli Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta muodostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

MTT: 3–(4,5-dimetyylitiatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetrasoliumbromidi, tiatsolyylisininen.

Negatiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, josta tiedetään, ettei se aiheuta positiivista vastetta testijärjestelmässä. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää kudoksen 100-prosenttinen elinkyky.

Ei luokiteltu: Kemikaalit, joita ei ole luokiteltu silmiä ärsyttäviksi (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2, YK:n GHS-järjestelmän luokka 2A tai 2B) tai vakavia silmävaurioita aiheuttaviksi (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1). Sama kuin YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”.

NSC_{killed}: Non-Specific Colour in killed tissues, epäspesifinen väri kuolleissa kudoksissa.

NSC_{living}: Non-Specific Colour in living tissues, epäspesifinen väri elävissä kudoksissa.

NSMTT: Non-Specific MTT reduction, epäspesifinen MTT:n pelkistys

OD: Optical Density, optinen tiheys

Suoritusvaatimukset: Tieteellisesti validiksi katsottuun validoituun vertailumenetelmään perustuvat standardit, jotka toimivat perustana arvioitaessa ehdotetun mekaanisesti ja toiminnallisesti samanlaisen testimenetelmän vertailtavuutta. Tähän sisältyvät: i) testimenetelmän oleelliset osat; ii) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun vertailumenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja iii) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (18).

▼M8

Positiivinen kontrolli: Näyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen testijärjestelmässä. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (18).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testimenetelmä voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Luotettavuutta arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa (18).

Korvaava testi: Testi, jolla voidaan korvata testi, joka on säännöllisesti käytössä ja joka on hyväksytty vaarallisuuden määrittämiseen ja/tai riskien arviointiin ja jonka on osoitettu antavan ihmisten tai eläinten terveyden tai tarvittaessa ympäristön kannalta vastaavan tai korkeamman suojelutason hyväksyttyyn testiin verrattuna kaikissa mahdollisissa testaustilanteissa ja kaikkien kemikaalien yhteydessä (18).

Toistettavuus: Samalla kemikaalilla ja saman testiprotokollan mukaisesti toistetuilla testeillä saatujen tulosten keskinäinen vastaavuus (ks. luotettavuus) (18).

Silmiin kohdistuvat korjautuvat vaikutukset: Ks. ”silmä-ärsytys.

RhCE: Reconstructed human Cornea-like Epithelium, rekonstruoitu ihmisen sarveiskalvon kaltainen epiteeli.

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti negatiivisen ja positiivisen kontrollin kanssa.

SD: Standard Deviation, keskihajonta.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (18).

Vakava silmävaurio: Silmän kudosvauriot tai vakava fyysinen näön heikentyminen, joka syntyy, kun testiainetta on annosteltu silmän etupinnalle, eikä se korjaudu täysin 21 päivän kuluessa annostelusta. Sama kuin ”silmiin kohdistuvat korjautumattomat vaikutukset” ja YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1.

Vakiotoimintamenettelyt: Muodolliset kirjalliset menettelyt, joissa kuvataan yksityiskohtaisesti, miten tietyt rutiinimaiset ja testikohtaiset laboratoriotoimet on tehtävä. Hyvä laboratoriokäytäntö edellyttää niitä.

Spesifisyys: Niiden negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testimenetelmän merkityksellisyyttä (18).

▼M8

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä menetelmässä muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testi: Yksittäinen testikemikaali, joka testataan samanaikaisesti vähintään kahdella rinnakkaiskudosnäytteellä asiaan kuuluvissa vakiotoimintamenettelyissä määritetyn mukaisesti.

Kudoksen elinkyky: Parametri, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta rekonstruoidussa kudoksessa (esim. niiden kyky pelkistää vitaaliväri MTT:tä), joka mittaussuureen ja testimenetelmän mukaan korreloi elävien solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

Ylhäältä alaspäin suuntautuva lähestymistapa: Vaiheittainen lähestymistapa, jota käytetään oletettaessa, että kemikaali aiheuttaa vakavia silmävaurioita. Se aloitetaan määrittämällä kemikaalit, jotka aiheuttavat vakavia silmävaurioita (positiivinen tulos), ja muut kemikaalit (negatiivinen tulos).

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Vaiheittainen testausstrategia: Vaiheittainen testausstrategia, jossa testimenetelmiä käytetään peräkkäin. Kaikkia testikemikaalia koskevia olemassa olevia tietoja tarkastellaan tietyssä järjestyksessä käyttäen näyttöön perustuvaa prosessia kussakin vaiheessa sen määrittämiseksi, onko käytettävissä riittävästi tietoja vaaraluokituspäätöstä varten, ennen kuin siirrytään strategian seuraavaan vaiheeseen. Jos testikemikaalin vaarapotentiaali/voimakkuus voidaan määrittää olemassa olevien tietojen perusteella, lisätestausta ei tarvita (18).

ULOQ: Ylempi määritysraja.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (YK:n GHS-järjestelmä): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja -tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja käyttöturvallisuustiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten ja ympäristön suojelemiseksi (esimerkiksi työnantajille, työntekijöille, kuljetushenkilökunnalle, kuluttajille ja pelastushenkilöstölle) (1).

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1: Ks. ”vakava silmävaurio”.

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 2: Ks. ”silmä-ärsytys.

YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka ”Ei luokitusta”: Kemikaalit, jotka eivät täytä YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1 tai 2 (tai YK:n GHS-järjestelmän luokkiin 2A tai 2B) luokittelun vaatimuksia. Sama kuin ”ei luokiteltu”.

UPLC: Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia.

▼M8

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Validi testimenetelmä: Testimenetelmä, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testimenetelmää ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (18).

Validoitu testimenetelmä: Testimenetelmä, josta on tehty validointitutkimuksia sen merkityksellisyyden (ja tarkkuuden) sekä luotettavuuden määrittämiseksi tiettyyn tarkoitukseen. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (18).

VVM: Validoitu vertailumenetelmä.

VVM1: Tässä testimenetelmässä EpiOcular™-silmä-ärsytystesti on validoitu vertailumenetelmä 1.

VVM2: Tässä testimenetelmässä SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti on validoitu vertailumenetelmä 2.

Näyttöön perustuva lähestymistapa: Prosessi, jossa tarkastellaan erilaisten tietojen vahvuuksia ja heikkouksia, kun niiden avulla on tarkoitus tehdä päätelmä testiaineen vaarapotentiaalista tai kun tietojen on määrä tukea kyseistä päätelmää.

▼M8

Lisäys 2

SELLAISTEN KEMIKAALIEN MÄÄRITTÄMISEEN, JOTKA EIVÄT VAADI LUOKITUSTA JA MERKINTÖJÄ SILMÄ-ÄRSYTYKSEN TAI VAKAVAN SILMÄVAURION OSALTA, VALIDOITUJEN RHCE-TESTIEN KESKEISET OSAT

Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
Protokollat	Nesteet (pipetoitavissa 37±1 °C:ssa tai alhaisemmassa lämpötilassa 15 minuutin ajan)	Kiinteät (eivät pipetoitavissa)	Nesteet ja viskoosiset aineet (pipetoitavissa)	Kiinteät (eivät pipetoitavissa)
Mallin pinta-ala	0,6 cm^2	0,6 cm^2	0,5 cm^2	0,5 cm^2
Rinnakkaiskudosnäytteiden lukumäärä	Vähintään 2	Vähintään 2	Vähintään 2	Vähintään 2
Väri-interferenssin esitarkastus	50 µl + 1 ml H_2O / 60 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (värittömät kemikaalit), tai 50 µl + 2 ml isopropanolia, sekoitus 2–3 h HLT:ssä (värilliset testikemikaalit) → Jos testikemikaalin optinen tiheys on 570±20 nm:n aallonpituudella isopropanolin tai veden optisen tiheyden vähentämisen jälkeen > 0,08 (joka vastaa noin viittä prosenttia negatiivisen kontrollin keskimääräisestä optisesta tiheydestä), on tehtävä mukautetut kontrollitestit elävillä kudoksilla.	50 mg + 1 ml H_2O / 60 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH (värittömät testikemikaalit) ja/tai 50 µl + 2 ml isopropanolia, sekoitus 2–3 h HLT:ssä (värilliset ja värittömät testikemikaalit) → Jos testikemikaalin optinen tiheys on 570±20 nm:n aallonpituudella isopropanolin tai veden optisen tiheyden vähentämisen jälkeen > 0,08 (joka vastaa noin viittä prosenttia negatiivisen kontrollin keskimääräisestä optisesta tiheydestä), on tehtävä mukautetut kontrollitestit elävillä kudoksilla.	10 µl + 90 µl H_2O, sekoitus 30±2 min huoneenlämpötilassa (HLT, 18–28°C) → Jos testikemikaali on värillinen, on tehtävä mukautetut kontrollitestit elävillä kudoksilla.	10 µl + 90 µl H_2O, sekoitus 30±2 min huoneenlämpötilassa → Jos testikemikaali on värillinen, on tehtävä mukautetut kontrollitestit elävillä kudoksilla.

▼M8

Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
MTT:n suoran pelkistyksen esitarkastus	Liuos 50 µl + 1 ml MTT 1 mg/ml / 180±15 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit jäädyttämällä tapetuilla kudoksilla (negatiivinen kontrolli: 50 µl steriiliä deionisoitua vettä MTT-liuoksessa).	Liuos 50 mg + 1 ml MTT (1 mg/ml) / 180±15 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit jäädyttämällä tapetuilla kudoksilla (negatiivinen kontrolli: 50 µl steriiliä deionisoitua vettä MTT-liuoksessa)	Liuos 30 µl + 300 µl MTT (1 mg/ml) / 180± 15 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit vedellä tapetuilla kudoksilla (negatiivinen kontrolli: 30 µl steriiliä deionisoitua vettä MTT-liuoksessa).	30 mg + 300 µl MTT (1 mg/ml) / 180± 15 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH → Jos liuos muuttuu siniseksi/violetiksi, on tehtävä mukautetut kontrollitestit vedellä tapetuilla kudoksilla (negatiivinen kontrolli: 30 µl steriiliä deionisoitua vettä MTT-liuoksessa).
Esikäsittely	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää, 30 ± 2 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, valolta suojattuna.	20 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää, 30±2 min, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH, valolta suojattuna.	—	—
Altistusannokset ja niiden applikointi	50 µl (83,3 µl/cm^2)	50 mg (83,3 mg/cm^2) käyttämällä kalibroitua työkalua (esim. täysi lusikallinen, joka on kalibroitu 50 mg:lle natriumkloridia).	10 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää, + 30 ± 2 µl (60 µl/cm^2) Käytä viskoosisille aineille nailonverkkoa.	30 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää, + 30 ± 2 mg (60 mg/cm^2)
Altistus- aika ja -lämpötila	30 min (± 2 min) kasvatusliuoksessa 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	6 tuntia (± 0,25 h) kasvatusliuoksessa 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	30 min (± 2 min) kasvatusliuoksessa 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	4 tuntia (± 0,1 h) kasvatusliuoksessa 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Huuhtelu huoneenlämpötilassa	3 kertaa 100 ml:ssa Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää	3 kertaa 100 ml:ssa Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää	20 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää	25 ml Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää
Immersio altistuksen jälkeen	12 min (± 2 min) HLT:ssä kasvatusliuoksessa	25 min (± 2 min) HLT:ssä kasvatusliuoksessa	30 min (± 2 min), 37°C, 5 % CO_2, 95 % RH, kasvatusliuoksessa	30 min (± 2 min) HLT:ssä kasvatusliuoksessa

▼M8

Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
Inkubointi altistuksen jälkeen	120 min (± 15 min) kasvatusliuoksessa, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	18 h (± 0,25 h) kasvatusliuoksessa, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	Ei mitään	18 h (± 0,5 h) kasvatusliuoksessa, 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Negatiivinen kontrolli	50 µl H_2O Testaus samanaikaisesti	50 µl H_2O Testaus samanaikaisesti	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää Testaus samanaikaisesti	30 ± 2 µl Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaata DPBS:ää Testaus samanaikaisesti
Positiivinen kontrolli	50 µl metyyliasetaattia Testaus samanaikaisesti	50 µl metyyliasetaattia Testaus samanaikaisesti	30 ± 2 µl metyyliasetaattia Testaus samanaikaisesti	30 ± 2 µl metyyliasetaattia Testaus samanaikaisesti
MTT-liuos	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
MTT:n inkubointi- aika ja -lämpötila	180 min (± 15 min), 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15 min), 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15 min), 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH	180 min (± 15 min), 37±2 °C, 5±1 % CO_2, ≥95 % RH
Uuttoliuotin	2 ml isopropanolia (uutto insertin pinta- ja pohjakudoksesta puhkaisemalla kudos)	2 ml isopropanolia (uutto insertin pohjakudoksesta puhkaisemalla kudos)	1,5 ml isopropanolia (uutto insertin pinta- ja pohjakudoksesta)	1,5 ml isopropanolia (uutto insertin pohjakudoksesta)
Uuttoaika ja -lämpötila	2–3 h ravistelijassa (~120 rpm), HLT, yön yli, 4–10 °C	2–3 h ravistelijassa (~120 rpm), HLT, yön yli, 4–10 °C	4 h ravistelijassa (~120 rpm), HLT, tai vähintään yön yli ilman ravistelua, 4–10 °C	Vähintään 2 h ravistelijassa (~120 rpm), HLT
Optisen tiheyden lukemat	570 nm (550–590 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (550–590 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (540–600 nm) ilman vertailusuodatinta	570 nm (540–600 nm) ilman vertailusuodatinta
Kudoksen laadunvalvonta	Käsittely 100 µl:lla 0,3-prosenttista (v/v) Triton X-100:aa 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	Käsittely 100 µl:lla 0,3-prosenttista (v/v) Triton X-100:aa 12,2 min ≤ ET_{50} ≤ 37,5 min	30 minuutin käsittely SDS:llä (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,5 mg/ml	30 minuutin käsittely SDS:llä (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ IC_{50} ≤ 3,2 mg/ml

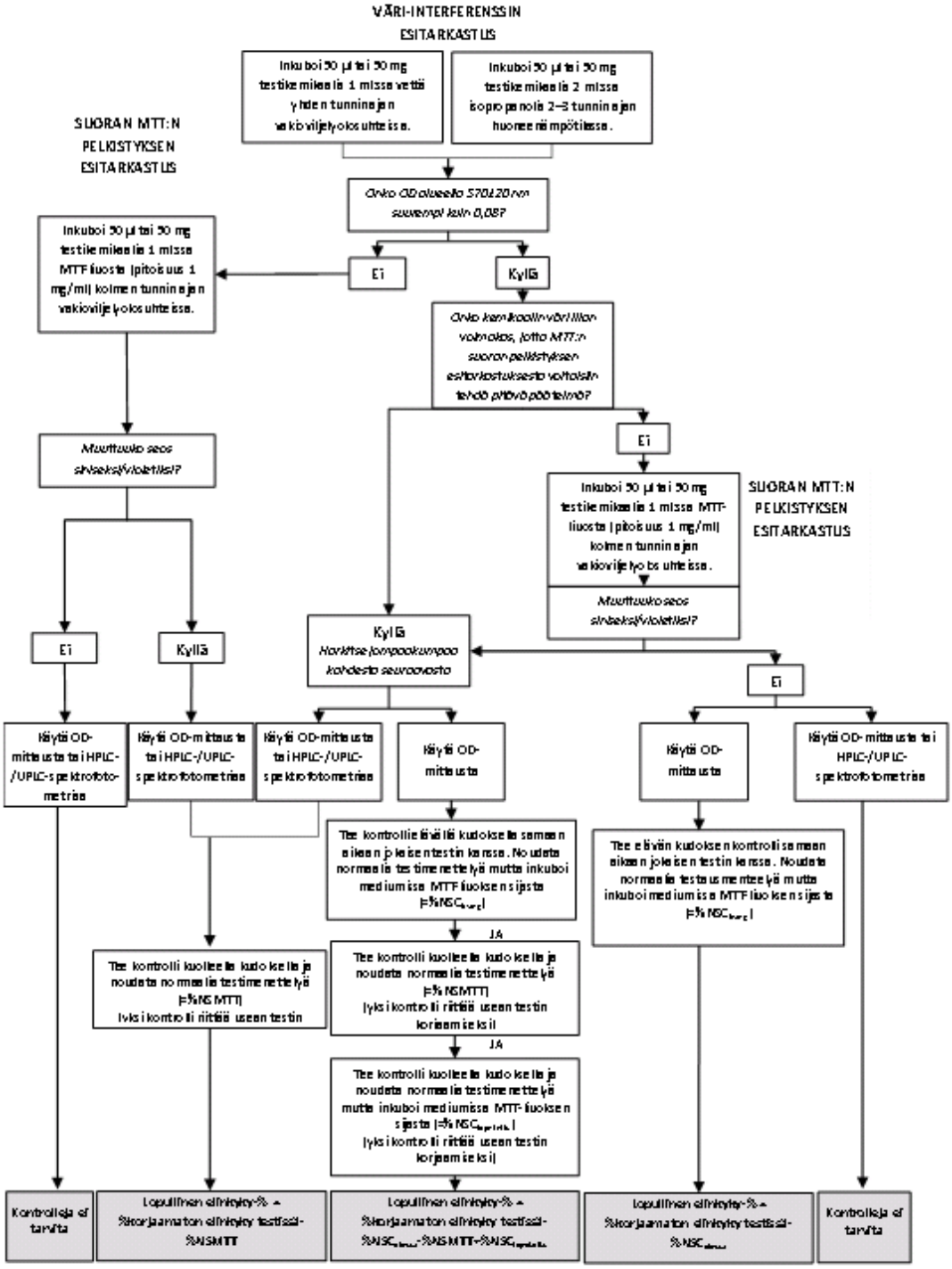
▼M8

Testin osat	EpiOcular™-silmä-ärsytystesti (VVM 1)		SkinEthic™ HCE -silmä-ärsytystesti (VVM 2)	
Hyväksymisperusteet	1. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen optisen tiheyden on oltava > 0,8 ja < 2,5. 2. Positiiviselle kontrollille 30 minuutiksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkyvyn (ilmaistuna prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista) tulee olla < 50 prosenttia. 3. Kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välisen eron tulee olla alle 20 prosenttia.	1. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen optisen tiheyden on oltava > 0,8 ja < 2,5. 2. Positiiviselle kontrollille 6 tunniksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkyvyn (ilmaistuna prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista) tulee olla < 50 prosenttia. 3. Kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välisen eron tulee olla alle 20 prosenttia.	1. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen optisen tiheyden on oltava > 1,0 ja ≤ 2,5. 2. Positiiviselle kontrollille 30 minuutiksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkyvyn (ilmaistuna prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista) tulee olla ≤ 30 prosenttia. 3. Kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välisen eron tulee olla alle 20 prosenttia.	1. Negatiivisella kontrollilla käsiteltyjen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen optisen tiheyden on oltava > 1,0 ja ≤ 2,5. 2. Positiiviselle kontrollille 4 tunniksi altistettujen rinnakkaiskudosnäytteiden keskimääräisen elinkyvyn (ilmaistuna prosenttiosuutena negatiivisesta kontrollista) tulee olla ≤ 20 prosenttia. 3. Kahden rinnakkaiskudosnäytteen elinkyvyn välisen eron tulee olla alle 20 prosenttia.

▼**M8**

Lisäys 3

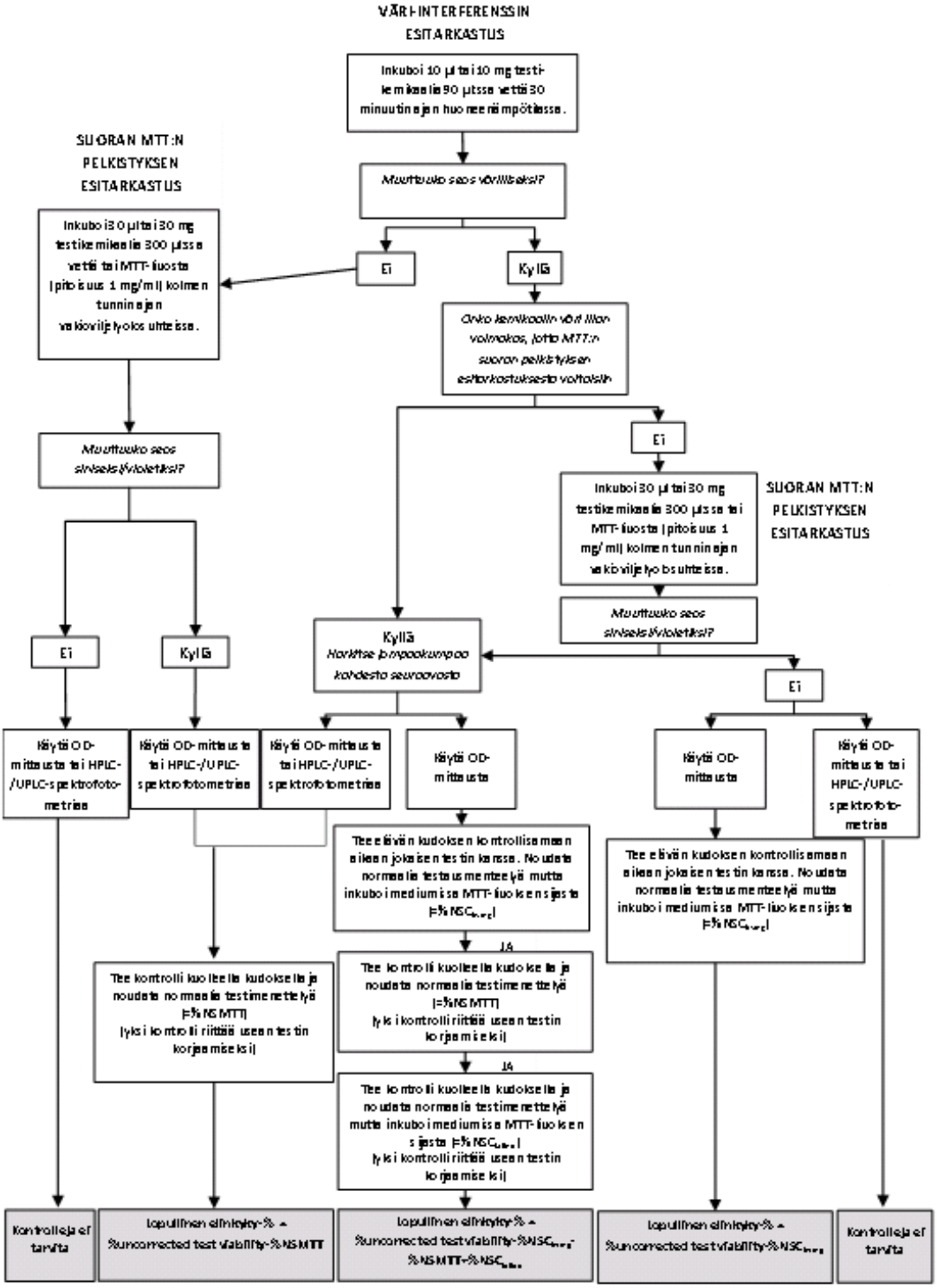
HAVAINNOLLISTAVA VUOKAAVIO: OHJEET SUORIEN MTT:N PELKISTIMIEN JA/TAI VÄRI-INTERFERENSSIÄ AIHEUTTAVIEN KEMIKAALIEN TUNNISTAMISESTA JA KÄSITTELEMISESTÄ VVM1:N VAKIOTOIMINTAMENETTELYJEN PERUSTEELLA



▼**M8**

Lisäys 4

HAVAINNOLLISTAVA VUOKAAVIO: OHJEET SUORIEN MTT:N PELKISTIMIEN JA/TAI VÄRI-INTERFERENSSIÄ AIHEUTTAVIEN KEMIKAALIEN TUNNISTAMISESTA JA KÄSITTELEMISESTÄ VVM2:N VAKIOTOIMINTAMENETTELYJEN PERUSTEELLA



▼**M8**

Lisäys 5

KESKEISET PARAMETRIT JA HYVÄKSYMISPERUSTEET, JOIDEN MUKAAN HPLC-/UPLC-SPEKTROFOTOMETRIAJÄRJESTELMÄ VOIDAAN HYVÄKSYÄ RHCE-KUDOSMALLISTA UUTETUN MTT-FORMATSAANIN MITTAAMISEEN

Parametri	Protokolla peräisin FDA:n ohjeista (36) (38)	Hyväksymisperusteet
Valikoivuus	Analyysi: isopropanoli, eläviä soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute elävistä RhCE-kudosmalleista ilman käsittelyä), kuolleita soluja sisältävä nollaliuos (isopropanoliuute kuolleista RhCE-kudosmalleista ilman käsittelyä) ja väri (esimerkiksi metyleenisininen)	$Area_{interference} \leq 20$ % of $Area_{LLOQ}$ (1)
Täsmäävyys	Laatukontrollit (MTT-formatsaani pitoisuuksina 1,6 µg/ml, 16 µg/ml ja 160 µg/ml) isopropanolilla (n=5)	CV ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Tarkkuus	Laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	%Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta
Matriisivaikutus	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=5)	85 % ≤ % matriisivaikutus ≤ 115 %
Kulkeutuminen	Isopropanolin analyysi ULOQ (2)-standardin mukaan	$Area_{interference} \leq 20$ % of $Area_{LLOQ}$
Toistettavuus (päivänsisäinen)	3 riippumatonta kalibrointikäyrää (perustuen 6 peräkkäiselle 1/3-laimennokselle MTT-formatsaanista isopropanolissa ULOQ-arvosta alkaen, ts. 200 µg/ml); laatukontrollit isopropanolilla (n=5)	Kalibrointikäyrät: %Dev ≤ 15 % tai ≤ 20 % LLOQ:n osalta Laatukontrollit: %Dev ≤ 15 % ja CV ≤ 15 %
Toistettavuus (päivien välinen)	Päivä 1: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3)Päivä 2: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3)Päivä 3: 1 kalibrointikäyrä ja laatukontrollit isopropanolilla (n=3)	
MTT-formatsaanin lyhytaikainen stabiilius RhCE-kudosuutteessa	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja 24 tunnin kuluttua huoneenlämmössä säilytyksestä.	%Dev ≤ 15 %
MTT-formatsaanin pitkäaikainen stabiilius RhCE-kudosuutteessa tarvittaessa	Laatukontrollit eläviä soluja sisältävällä nollaliuoksella (n=3), joka analysoidaan valmistamispäivänä ja muutaman päivän kuluttua -20 °C:ssa säilytyksestä.	%Dev ≤ 15 %

(1) LLOQ: Alempi määritysraja, määritetty kattamaan kudoksen elinkyky, kun se on 1–2 prosenttia, esim. 0,8 µg/ml.
(2) ULOQ: Ylempi määritysraja, määritetty olemaan vähintään kaksi kertaa suurempi kuin suurin odotettu MTT-formatsaanipitoisuus negatiivisten kontrollien isopropanoliuutteissa (~70 µg/ml VVM:ssä), esim. 200 µg/ml.

▼M8

B.70. **IHMISEN REKOMBINANTTIIN ESTROGEENIRESEPTORIIN (hrER) PERUSTUVAT *IN VITRO* -TESTIT, JOILLA HAVAITAAN KEMIKAALIT, JOILLA ON SITOUTUMISAFFINITEETTI ESTROGEENIRESEPTORIIN**

YLEISJOHDANTO

OECD:n tulosperusteinen testiohje

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 493 (2015). Testiohje 493 on tulosperusteinen testiohje, jossa kuvataan sellaisten aineiden havaitsemiseen tarkoitettu ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin perustuva *in vitro* -testimenetelmä, joilla on sitoutumisaffiniteetti estrogeenireseptoriin (hrER:iin sitoutumistestit). Se koostuu kahdesta mekanistisesti ja toiminnallisesti samanlaisesta testistä, jotka on tarkoitettu estrogeenireseptoriin (ERα) sitoutuvien aineiden tunnistamiseen, ja sen tavoitteena on osaltaan edistää uusien samanlaisten tai muunneltujen testimenetelmien kehittämistä OECD:n vaaran arvioinnissa käytettävien uusien tai päivitettyjen testimenetelmien validointia ja kansainvälistä hyväksyntää koskevassa ohjeasiakirjassa esitettyjen validointiperiaatteiden mukaisesti (1). Kokonaisuudessaan validoidut vertailutestimenetelmät (lisäys 2 ja lisäys 3), joihin tämä tulosperusteinen testiohje pohjautuu, ovat seuraavat:

— estrogeenireseptoriin sitoutumista käsittelevä Freybergerin ja Wilsonin (FW) *in vitro* -testi, jossa käytetään kokopitkää ihmisen rekombinanttia estrogeenireseptori alfaa (2), ja

— estrogeenireseptoriin sitoutumista käsittelevä Chemical Evaluation and Research Instituten (CERI) *in vitro* -testi, jossa käytetään ihmisen rekombinanttia ligandia sitovaa domeeniproteiinia (2).

Saatavilla on suoritusvaatimukset (3), jotka helpottavat samaa vaaran kohdetta koskevien samanlaisten testimenetelmien kehittämistä ja validointia. Niiden avulla myös OECD:n testiohjetta 493 voidaan muuttaa oikea-aikaisesti, jotta päivitettyyn PBTG-ohjeeseen voidaan lisätä uusia samanlaisia testejä. Samanlaisia testejä lisätään ohjeeseen kuitenkin vasta sitten, kun OECD on tarkistanut ne ja vahvistanut, että suoritusvaatimukset täyttyvät. Testiohjeeseen 493 sisältyviä testejä voidaan käyttää OECD:n jäsenvaltioiden estrogeenireseptoriin sitoutumista koskeviin testituloksiin liittyvien vaatimusten yhteydessä samalla OECD:n sopimuksen mukaista tietojen vastavuoroista hyväksyntää hyödyntäen.

Taustaa ja tähän testimenetelmään sisältyviä testejä koskevat periaatteet

2. OECD aloitti vuonna 1998 tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien testiohjeiden uudistuksen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten. Mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva OECD:n toimintamalli tarkistettiin vuonna 2012. Alkuperäinen ja tarkistettu toimintamalli sisältyvät liitteinä OECD:n ohjeasiakirjaan Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (4). Toimintamallissa on viisi tasoa, joista kukin vastaa biologisen monimutkaisuuden eri tasoa. Tässä testimenetelmässä kuvatut estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevat testit kuuluvat tasolle 2, joka sisältää ”i*n vitro -testit, jotka tuottavat tietoa tietyistä endokriinisistä mekanismeista/reiteistä*”. Tämä testimenetelmä sisältää reseptoriin sitoutumista tarkastelevia *in vitro* -testejä, jotka on kehitetty tunnistamaan ihmisen estrogeenireseptori alfan (ERα) ligandeja.

▼**M8**

3. Estrogeenireseptoriin sitoutumista tarkastelevan *in vitro* -testin merkityksellisyys biologisten tehtävien kannalta on osoitettu selvästi. Estrogeenireseptoriin sitoutumista tarkastelevat testit on suunniteltu tunnistamaan kemikaalit, jotka voivat vaikuttaa haitallisesti estrogeenihormonin vaikutusreitteihin, ja kahden viime vuosikymmenen aikana niitä on käytetty laajalti estrogeenireseptorien kudoksiin jakautumisen luonnehtimisessa ja estrogeenireseptorin agonistien/antagonistien määrittämisessä. Näillä testeillä tutkitaan ligandin ja reseptorin yhteisvaikutusta, joka on estrogeenin signaalireitin ensimmäinen vaihe ja hyvin tärkeä kaikkien selkärankaisten lisääntymistoiminnoille.

4. Estrogeenien ja estrogeenireseptoreiden yhteisvaikutus voi vaikuttaa estrogeenin säätelemien geenien transkriptioon ja aiheuttaa ei-genomisia vaikutuksia, mikä voi käynnistää tai estää solujen prosesseja, myös niitä, joita tarvitaan solujen proliferaatiossa, sikiön normaalissa kehityksessä ja lisääntymistoiminnoissa (5) (6) (7). Normaalien estrogeenin säätelemien järjestelmien häiritseminen saattaa aiheuttaa haittavaikutuksia, jotka kohdistuvat normaaliin kehitykseen (ontogeneesiin), lisääntymisterveyteen ja lisääntymisjärjestelmän eheyteen. Epäasianmukainen estrogeenireseptorin signalointi voi johtaa esimerkiksi hormoniriippuvaisen syövän riskin kasvamiseen, hedelmällisyyden heikentymiseen sekä sikiön kasvun ja kehityksen muutoksiin (8).

5. *In vitro* -sitoutumistestit perustuvat aineen ja tietyn reseptorin ligandin sitoutumiskohdan, joka säätelee geenin transkriptiota, suoraan vuorovaikutukseen. Keskeinen osa ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptori alfaan (hrERα) sitoutumistestissä on mitata radioleimatun ligandin ([^{3}H]17β-estradioli) kykyä sitoutua estrogeenireseptoriin testikemikaalin (eli kilpailijan) suurenevien pitoisuuksien yhteydessä. Testikemikaalit, joilla on voimakas affiniteetti estrogeenireseptoriin, kilpailevat radioleimatun ligandin kanssa pienemmällä pitoisuudella kuin ne kemikaalit, joiden affiniteetti reseptoriin on heikompi. Tässä testissä on kaksi keskeistä osaa: saturaatiositoutumiskoe, jolla luonnehditaan reseptorin ja ligandin vuorovaikutuksen parametreja ja dokumentoidaan estrogeenireseptorin spesifisyyttä, ja kilpaileva sitoutumiskoe, jolla luonnehditaan testikemikaalin ja radioleimatun ligandin kilpailua estrogeenireseptoriin sitoutumisessa.

6. CERI- ja FW-sitoutumistestien validointitutkimukset ovat osoittaneet, että ne ovat merkityksellisiä ja luotettavia käyttötarkoitukseensa (2).

7. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet määritellään lisäyksessä 1.

Reseptoriin sitoutumistestien soveltamisala ja rajoitukset

8. Näitä testejä ehdotetaan käytettäväksi seulonnassa ja priorisoinnissa, mutta niistä voidaan saada tietoa myös haittavaikutusreitin käynnistävästä molekyylitason tapahtumasta, jota voidaan käyttää näyttöön perustuvassa lähestymistavassa. Niissä tutkitaan kemikaalin sitoutumista ERα:n ligandin sitoutumisalueella *in vitro* -järjestelmässä. Tuloksia ei siis tule suoraan ekstrapoloida intaktin endokriinisen järjestelmän monimutkaiseen signalointiin ja säätelyyn *in vivo*.

▼**M8**

9. Luonnollisen ligandin, 17β-estradiolin, sitoutuminen on ensimmäinen vaihe molekyylitason tapahtumasarjassa, joka aktivoi kohdegeenien transkription ja kulminoituu fysiologiseen muutokseen (9). Sitoutumista ERα:n ligandin sitoutumisalueelle pidetään yhtenä keskeisistä mekanismeista, jotka aiheuttavat estrogeenireseptorivälitteisiä hormonaalisia häiriöitä, vaikka on myös muita mekanismeja, joiden välityksellä niitä voi aiheutua. Niitä ovat esimerkiksi i) yhteisvaikutukset ERα:n muiden kuin ligandin sitoutumistaskun kohtien kanssa, ii) yhteisvaikutukset muiden estrogeenin signaloinnin kannalta oleellisten reseptoreiden, ERβ:n ja G-proteiinikytkentäisen estrogeenireseptorin sekä muiden endokriinisen järjestelmän reseptorien ja entsymaattisten järjestelmien kanssa, iii) hormonisynteesi, iv) hormonien metabolinen aktivaatio ja/tai inaktivaatio, v) hormonien jakautuminen kohdekudoksiin ja vi) hormonien poistuminen elimistöstä. Kummassakaan tähän testimenetelmään kuuluvista testeistä ei käsitellä näitä vaikutustapoja.

10. Tässä testimenetelmässä tarkastellaan aineiden kykyä sitoutua ihmisen estrogeenireseptori alfaan, eikä siinä erotella sen agonisteja tai antagonisteja. Näissä testeissä ei käsitellä myöskään myöhempiä tapahtumia, kuten geenien transkriptiota tai fysiologisia muutoksia. Koska validoinnissa käytettiin vain yksittäisiä yhdestä ainesosasta koostuvia aineita, testimenetelmän soveltuvuutta seosten testaamiseen ei ole arvioitu. Teoriassa testejä voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta koostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

11. Soluvapailla reseptorijärjestelmillä ei ole luontaista metabolointikykyä, eikä niitä ole validoitu metabolisten entsyymijärjestelmien yhteydessä. Metabolinen aktivaatio saattaisi kuitenkin olla mahdollista sisällyttää tutkimuksen rakenteeseen, mutta se edellyttäisi uusia validointitutkimuksia.

12. Kemikaaleja, jotka voivat denaturoida proteiinia (esimerkiksi reseptoriproteiinia), kuten pinta-aktiiviset aineet, tai kemikaaleja, jotka voivat muuttaa testin puskuriaineen pH:ta, ei voida testata, tai niitä voidaan testata vain sellaisina pitoisuuksina, jotka eivät aiheuta tällaisia yhteisvaikutuksia. Muutoin pitoisuusalue, joka voidaan testata näillä testeillä, rajoittuu siihen, miten testikemikaali liukenee puskuriaineeseen.

13. Taulukossa 1 esitetään tiedoksi testin tulokset 24 aineesta, jotka testattiin kummallakin tässä testimenetelmässä kuvatulla kokonaisuudessaan validoidulla testillä. Julkaistujen raporttien perusteella näistä aineista 17 on luokiteltu estrogeenireseptoriin sitoutuviksi aineiksi ja 8 sitoutumattomiksi aineiksi. Tutkimuksissa on käytetty estrogeenireseptorin transkriptionaalista aktivaatiota koskevia *in vitro* -testejä ja/tai kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevaa testiä (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Taulukossa 1 esitettyjen tietojen osalta kahdella testillä saadut luokitukset kaikista aineista 10^{-4}M:een saakka olivat miltei täysin yhtäpitävät, ja jokainen aine luokiteltiin oikein joko estrogeenireseptoriin sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi. Täydentäviä tietoja tämän ryhmän aineista ja muista aineista, jotka testattiin estrogeenireseptoriin sitoutumista tarkastelevissa testeissä validointitutkimuksissa, on hrER-sitoutumistestin suoritusvaatimuksissa (3) lisäyksessä 2 (taulukot 1, 2 ja 3).

▼M8

Taulukko 1

Ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevissa FW- ja CERI-testeissä testattujen aineiden luokittelu estrogeenireseptoriin sitoutuviksi tai sitoutumattomiksi aineiksi verrattuna odotuksenmukaiseen vasteeseen

	Aineen nimi	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste	FW-testi		CERI-testi		MeSHin kemiallinen luokka	Tuoteluokka
				Pitoisuus- alue (M)	Luokittelu	Pitoisuus- luokka (M)	Luokittelu		
1	17β-estradioli	50-28-2	*Sitoutuva*	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Sitoutuva	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
2	Noretinodreli	68-23-5	*Sitoutuva*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Sitoutuva	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Sitoutuva	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
3	Noretindroni	68-22-4	*Sitoutuva*	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Sitoutuva	3×10^{-9} – 30×10^{-4}	Sitoutuva	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
4	Di-*n*-butyyliftalaatti	84-74-2	*Sitoutumaton* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton (**) (+)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton (**) (+)	Hiilivety (syklinen), esteri	Pehmitin, kemiallinen välituote
5	DES	56-53-1	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääke
6	17α-etinyyliestradioli	57-63-6	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
7	Mesoheksestroli	84-16-2	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääke
8	Genisteiini	446-72-0	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (heterosyklinen), flavonoidi	Luonnontuote

▼M8

	Aineen nimi	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste	FW-testi		CERI-testi		MeSHin kemiallinen luokka	Tuoteluokka
				Pitoisuus- alue (M)	Luokittelu	Pitoisuus- luokka (M)	Luokittelu		
9	Ekuoli	531-95-3	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Fytoestrogeenin metaboliitti	Luonnontuote
10	Butyyliparabeeni (*n* butyyli-4-hydroksibentsoaatti)	94-26-8	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Parabeeni	Säilöntäaine
11	Nonyylifenoli (seos)	84852-15-3	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Alkyylifenoli	Välituote
12	*o,p'*-DDT	789-02-6	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Orgaaninen klooriyhdiste	Hyönteisten torjunta-aine
13	Kortikosteroni	50-22-6	*Sitoutumaton* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	Steroidi	Luonnontuote
14	Tsearalenoni	17924-92-4	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (heterosyklinen), laktoni	Luonnontuote
15	Tamoksifeeni	10540-29-1	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet, eläinlääke
16	5α-dihydrotestosteroni	521-18-6	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Steroidi, ei-fenolinen	Luonnontuote
17	Bisfenoli A	80-05-7	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Fenoli	Kemiallinen välituote
18	4-*n*-heptyylifenoli	1987-50-4	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Epäselvä ([a])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Alkyylifenoli	Välituote

▼M8

	Aineen nimi	CAS-nro	Odotuksenmukainen vaste	FW-testi		CERI-testi		MeSHin kemiallinen luokka	Tuoteluokka
				Pitoisuus- alue (M)	Luokittelu	Pitoisuus- luokka (M)	Luokittelu		
19	Keponi (klordekoni)	143-50-0	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Hiilivety (halogenoitu)	Torjunta-aine
20	Bents(a)antraseeni	56-55-3	*Sitoutumaton*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutumaton ([b])	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutumaton ([b])	Aromaattinen hiilivety	Välituote
21	Enterolaktoni	78473-71-9	*Sitoutuva*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutuva	Fytoestrogeeni	Luonnontuote
22	Progesteroni	57-83-0	*Sitoutumaton* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	Steroidi	Luonnontuote
23	Oktyylitrietoksisilaani	2943-75-1	*Sitoutumaton*	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Sitoutumaton	Silaani	Pintakäsittelyaine
24	Atratsiini	1912-24-9	*Sitoutumaton* (*)	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Sitoutumaton	Heterosyklinen yhdiste	Rikkakasvien torjunta-aine

(*) Liukoisuusraja < 1×10^{-4}M.

(**) Di-n-butyyliftalaatin (DBP:n) käyttö ja luokittelu sitoutumattomaksi aineeksi perustui enintään 10^{-4} M:n testaamiseen, koska aineen oli todettu olevan liukenematon, kun konsentraatio oli 10^{-3}M (ts. sameus) joissakin laboratorioissa esivalidointitutkimusten aikana.

([+]) Validointitutkimuksessa di-*n*-butyyliftalaatti (DBP) testattiin koodattuna testiaineena, ja konsentraatiot olivat enintään 10^{-3} M. Näissä olosuhteissa joissakin laboratorioissa todettiin, että radioligandin sitoutuminen väheni suurimman konsentraation (10^{-3} M) yhteydessä ja/tai että käyrän sovitus oli epäselvä. Näissä testiajoissa DBP luokiteltiin luokkaan ”epäselvä” tai ”sitoutuva” kolmessa viidestä laboratoriosta, joissa käytettiin CERI-testiä, ja viidessä kuudesta laboratoriosta, joissa käytettiin FW-testiä (ks. lähdeviite (2), kohdat IV.B.3a, b ja VI.A).

([a]) Luokitus ei ollut yhdenmukainen odotuksenmukaisen luokituksen kanssa. Sen perusteella, että kolme viidestä laboratoriosta luokitteli 4-*n*-heptyylifenolin luokkaan ”epäselvä” tai ”sitoutumaton”, keskimääräinen luokitus oli epäselvä. Tarkempi tutkimus osoitti, että tämä johtui kemikaalin liukoisuuden rajoituksista, jotka estivät täyden sitoutumiskäyrän muodostumisen.

([b]) Validointitutkimuksen aikana bents(a)antraseeni luokiteltiin uudelleen sitoutumattomaksi aineeksi (ts. negatiiviseksi), sillä julkaistu kirjallisuus osoitti, että tästä aineesta ilmoitettu estrogeeninen vaikutus *in vitro* (16) johtuu pääasiassa sen metabolisesta aktivaatiosta (17)(18). Aineen entsymaattinen metabolinen aktivaatio ei ole odotuksenmukainen soluvapaissa hrER-sitoutumistesteissä, siten kuin niitä on käytetty tässä laboratorioiden välisessä validointitutkimuksessa. Näin ollen tämän aineen oikea luokitus on ”sitoutumaton”, kun sitä käytetään FW- ja CERI-testien kokeellisissa olosuhteissa.

▼M8

hrER-SITOUTUMISTESTIN OSAT

Testin keskeiset osat

14. Tätä testimenetelmää sovelletaan testeihin, joissa käytetään estrogeenireseptoria ja sopivan voimakasta ligandia, jota voidaan käyttää testin merkkiaineena ja joka voi syrjäytyä testikemikaalin pitoisuuksien kasvaessa. Sitoutumistesteissä on seuraava kaksi keskeistä osaa: 1) saturaatiositoutuminen ja 2) kilpaileva sitoutuminen. Saturaatiositoutumistestiä käytetään vahvistamaan reseptorivalmisteiden spesifisyys ja aktiivisuus, kun taas kilpailevalla sitoutumistestillä arvioidaan testikemikaalin kykyä sitoutua ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin (hrER).

Kontrollit

15. Perustelut ehdotetulle samanaikaiselle vertailuestrogeenille ja kontrolleille on esitettävä. Samanaikaiset kontrollit (liuotin, kantaja-aine), positiiviset kontrollit (estrogeenireseptoriin sitoutuva aine, voimakas ja heikko affiniteetti), negatiivinen kontrolli (sitoutumaton aine) (tarpeen mukaan) osoittavat, että testi toimii testiolosuhteissa ja on perusteena kokeiden välisille vertailuille; ne ovat yleensä osa tietyn kokeen hyväksymisperusteita (1). Vertailuestrogeenin ja kontrollien (ts. heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine) täydellisiä pitoisuuskäyriä on käytettävä yhdellä levyllä jokaisessa testiajossa. Kaikkien muiden levyjen tulee sisältää 1) suuri (likimain radioleimatun ligandin syrjäytyminen kokonaan) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus kutakin E2:ta ja heikosti sitoutuva aine kolmena rinnakkaisnäytteenä, 2) liuotinkontrolli ja epäspesifi sitoutuva aine kolmena rinnakkaisnäytteenä.

Laadunvalvonnan vakiomenettelyt

16. Kuvatut laadunvalvonnan vakiomenettelyt on toteutettava jokaisen testin yhteydessä, jotta varmistetaan, että aktiiviset reseptorit, kemikaalien asianmukaiset pitoisuudet ja toleranssirajat pysyvät vakaina useissa rinnakkaisnäytteissä ja että kyky tuottaa odotuksenmukainen estrogeenireseptoriin sitoutumisen vaste myös pidemmällä aikavälillä säilyy.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen

17. Ennen tuntemattomien kemikaalien testaamista jollakin tähän testimenetelmään kuuluvalla testillä jokaisen laboratorion on osoitettava pätevyytensä testin käyttämisessä tekemällä saturaatiotestejä, joilla varmistetaan estrogeenireseptorivalmisteen spesifisyys ja aktiivisuus, ja kilpailevia sitoutumistestejä vertailuestrogeenilla ja kontrolleilla (heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine). Laboratorion on luotava aikaisemmat tiedot sisältävä tietokanta, jossa on 3–5 itsenäisestä ja eri päivinä tehdystä kokeesta saadut tulokset vertailuestrogeenista ja kontrolleista. Laboratorion vertailuestrogeenikontrolli ja aikaisemmat kontrollit perustuvat näihin kokeisiin, ja niitä käytetään osittain arvioitaessa testin hyväksyttävyyttä myöhempiin testiajoihin.

18. Testijärjestelmän responsiivisuus vahvistetaan myös testaamalla taulukossa 2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Luettelo pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista koostuu joukosta estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevien testien suoritusvaatimuksissa esitettyjä vertailuaineita (3). Nämä aineet ovat kaupallisesti saatavilla, ja ne edustavat sellaisten kemikaalien luokkia, jotka yleensä liitetään estrogeenireseptoriin sitoutumiseen. Lisäksi niiden vaikutuksen voimakkuuden vaihteluväli on estrogeenireseptorien sitojien kannalta sopiva (ts. voimakkaasta heikkoon), ja niiden joukossa on myös tähän reseptoriin sitoutumattomia aineita (ts. negatiivisia aineita). Jokaisen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen osalta testattavien pitoisuuksien tulee kattaa taulukossa 2 esitetty vaihteluväli. Jokaisesta aineesta on tehtävä vähintään kolme koetta, ja tulosten on oltava odotuksenmukaisen kemiallisen aktiivisuuden mukaiset. Jokainen koe on tehtävä itsenäisesti (ts. tuoreilla reseptorin, kemikaalien ja reagenssien laimennoksilla), ja jokaisesta pitoisuudesta on testattava kolme rinnakkaisnäytettä. Pätevyys osoitetaan sillä, että jokainen pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu aine luokitellaan oikein (positiiviseksi/negatiiviseksi). Jokaisen laboratorioteknikon on tehtävä pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu testi testimenetelmän mukaisia testejä opetellessaan.

▼M8

Taulukko 2

Luettelo kontrolleista ja pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuista aineista kilpailevissa hrER-sitoutumistesteissä (1)

Nro	Aineen nimi	CAS-nro (2)	Odotuksenmuk. vaste (3) (4)	Testipitoisuuden vaihteluväli (M)	MeSH:n kemiallinen luokka (5)	Tuoteluokka (6)
Kontrollit (vertailuestrogeeni, heikosti sitoutuva aine, sitoutumaton aine)						
1	17-εστραδιολι	50-28-2	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
2	Noretinodreli (tai) noretindroni	68-23-5 (tai) 68-22-4	Sitoutuva	3×10^{-9} – 30×10^{-6}	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
3	Oktyylitrietoksisilaani	2943-75-1	Sitoutumaton	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Silaani	Pintakäsittelyaine
Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet (6)						
4	Dietyylistilbestroli	56-53-1	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääke
5	17α-etinyyliestradioli	57-63-6	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Steroidi	Lääkkeet, eläinlääke
6	Mesoheksestroli	84-16-2	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hiilivety (syklinen), fenoli	Lääkkeet, eläinlääke
7	Tamoksifeeni	10540-29-1	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Hiilivety (syklinen)	Lääkkeet, eläinlääke
8	Genisteiini	446-72-0	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Heterosyklinen yhdiste, flavonoidi	Luonnontuote
9	Bisfenoli A	80-05-7	Sitoutuva	1×10^{-10} – 1×10^{-3}	Fenoli	Kemiallinen välituote
10	Tsearalenoni	17924-92-4	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Heterosyklinen yhdiste, laktoni	Luonnontuote

▼M8

Nro	Aineen nimi	CAS-nro ([2])	Odotuksenmuk. vaste ([3]) ([4])	Testipitoisuuden vaihteluväli (M)	MeSH:n kemiallinen luokka ([5])	Tuoteluokka ([6])
11	Butyyliparabeeni	94-26-8	Sitoutuva	1×10^{-11} – 1×10^{-3}	Karboksyylihappo, fenoli	Säilöntäaine
12	Atratsiini	1912-24-9	Sitoutumaton	1×10^{-11} – 1×10^{-6}	Heterosyklinen yhdiste	Rikkakasvien torjunta-aine
13	Di-n-butyyliftalaatti (DBP) ([7])	84-74-2	Sitoutumaton ([8])	1×10^{-10} – 1×10^{-4}	Hiilivety (syklinen), esteri	Pehmitin, kemiallinen välituote
14	Kortikosteroni	50-22-6	Sitoutumaton	1×10^{-11} – 1×10^{-4}	Steroidi	Luonnontuote

([1]) Jos pätevyyden osoittamiseen tarkoitettua ainetta ei ole enää kaupallisesti saatavilla, voidaan käyttää ainetta, jolla on sama luokitus estrogeenireseptoriin sitoutumisen osalta sekä verrattavissa oleva voimakkuus ja kemiallinen luokka.

([2]) Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

([3]) Luokitus ERα:aan sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin sitoutumista koskevien CERI- ja FW-testien validointitutkimuksessa (2).

([4]) Estrogeenireseptoriin sitoutumisaktiviteetti perustui ICCVAMin estrogeenireseptoriin sitoutumista ja TA-testejä koskevissa tausta-asiakirjoissa oleviin tietoihin (9) sekä julkaistuista ja arvioiduista vertailututkimuksista saatuihin empiirisiin ja muihin tietoihin (10) (11) (12) (13) (14) (15).

([5]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan kemialliseen luokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen lääketieteen asiasanaston (MeSH) mukaisesti. Se on kansainvälisesti hyväksytty standardoitu luokittelumalli (saatavana osoitteessa http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Aineet luokiteltiin yhteen tai useampaan tuoteluokkaan Yhdysvaltojen National Library of Medicinen vaarallisten aineiden tietokannan mukaisesti (saatavana osoitteessa http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB)

([7]) DBP:tä voidaan käyttää vaihtoehtoisena kontrollina sitoutumattomasta aineesta; enimmäispitoisuus saa olla 10^{-4} M.

([8]) Tämän aineen liukoisuusraja on 10^{-4} M. Di-n-butyyliftalaatin (DBP:n) käyttö ja luokittelu sitoutumattomaksi aineeksi perustui enintään 10^{-4} M:n testaamiseen, koska aineen oli todettu olevan liukenematon, kun konsentraatio oli 10^{-3}M (ts. sameus) joissakin laboratorioissa esivalidointitutkimusten aikana.

▼M8

Testikemikaalien liukoisuuden testaus ja pitoisuusalueen määritys

19. Ensin on tehtävä alustava testi, jossa määritetään jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja ja testiä tehtäessä käytettävä asianmukainen pitoisuusalue. Jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja on määritettävä alustavasti liuottimessa ja vahvistettava myöhemmin testiolosuhteissa. Testissä testattava lopullinen pitoisuus saa olla enintään 1 mM. Pitoisuusalueen määritystesti koostuu liuotinkontrollista ja kahdeksasta logaritmiseen asteikkoon perustuvasta sarjalaimennoksesta, jotka aloitetaan suurimmasta hyväksyttävästä pitoisuudesta (esim. 1 mM tai vähemmän liukoisuusrajan mukaan) ja todetun sameuden tai sakan määrän mukaan. Toisen ja kolmannen kokeen pitoisuuksia on mukautettava tarpeen mukaan, jotta pitoisuus-vastekäyrää voidaan luonnehtia paremmin.

Testiajon hyväksymisperusteet

20. Testiajon hyväksyminen tai hylkääminen perustuu jokaisessa kokeessa käytetyistä vertailuestrogeenista ja kontrolleista saatujen tulosten arviointiin. Ensinnäkin levyn 1 osalta kunkin kokeen vertailukontrollien täysien pitoisuuskäyrien on täytettävä suoritusvaatimukset ja käyrän sovituksen parametrit (esim. IC_{50} ja Hillslope), jotka perustuvat CERI- ja FW-testien protokollista (lisäys 2 ja 3) ilmoitettuihin tuloksiin sekä testin tekevän laboratorion aiempiin vertailutietoihin. Kaikki kontrollit (vertailuestrogeeni, heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine) on luokiteltava oikein jokaisessa kokeessa. Toiseksi on arvioitava, ovatko kaikki seuraavilla levyillä olevat kontrollit yhdenmukaisia levyn 1 kanssa. Testikemikaalista on käytettävä riittävän monta pitoisuutta, jotta kilpailevan sitoutumiskäyrän huippu voidaan määrittää selvästi. Rinnakkaisnäytteiden vaihtelun on oltava kohtuullista ja tieteellisesti perusteltavissa testikemikaalin jokaisen pitoisuuden ja kolmen itsenäisen testiajon osalta. Laboratorion kyky tehdä testi johdonmukaisesti on osoitettava luomalla tietokanta vertailuestrogeenin ja kontrollien aiemmista tiedoista ja ylläpitämällä sitä. Keskihajontalukuja tai variaatiokertoimia voidaan käyttää vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvaa ainetta sisältävän kontrollin käyrän sovitusparametrien keskiarvoina useista kokeista laboratorionsisäisen toistettavuuden mittarina. Kontrollilevyjen tulosten tarkastelussa on käytettävä asiantuntijoita jokaisen testiajon ja jokaisen testikemikaalin osalta.

Lisäksi on noudatettava seuraavia hyväksymisperusteisiin liittyviä periaatteita:

— Tietojen on oltava riittävät, jotta estrogeenireseptoriin sitoutuminen voidaan arvioida kvantitatiivisesti.

— Testattujen pitoisuuksien on pysyttävä testikemikaalin liukoisuusalueen rajoissa.

Aineiston analysointi

21. Saturaatiositoutumista ja kilpailevaa sitoutumista koskevien tietojen analysoinnille määritetyssä menettelyssä on noudatettava reseptorin ja ligandin yhteisvaikutusten luonnehtimisen keskeisiä periaatteita. Saturaatiositoutumista koskevat tiedot analysoidaan yleensä käyttämällä epälineaarista regressiomallia, jolla tarkastellaan kokonaissitoutumista ja epäspesifistä sitoutumista. Ligandin depleetiota koskevaa korjausta (esim. Swillens, 1995 (19)) voidaan tarvita määritettäessä Bmax- ja Kd-arvoja. Kilpailevaa sitoutumista koskevien testien tiedot yleensä muunnetaan (esimerkiksi testikemikaalin

▼M8

prosentuaalinen spesifi sitoutuminen ja pitoisuus (log M)). Jokaisen testikemikaalin log (IC_{50}) -estimaatit on määritettävä käyttämällä asianmukaista epälineaarisen käyrän sovitusohjelmaa, jotta ne sopivat Hillin yhtälön neljään parametriin. Alustavan analyysin jälkeen on tarkistettava käyrän sovituksen parametreilla ja silmämääräisesti, miten hyvin sitoutumistiedot sopivat luotuun kilpailevan sitoutumisen käyrään. Joissakin tapauksissa lisäanalyysi voi olla tarpeen, jotta käyrän sovitus olisi paras mahdollinen (esimerkiksi rajoittamalla käyrän ylä- ja/tai alapäätä käyttämällä 10 prosentin sääntöä, ks. lisäys 4 ja lähdeviite 2 (kohta III.A.2).

22. Hyväksymisperusteiden (20 kohta) täyttyminen tarkoittaa, että testijärjestelmä toimii asianmukaisesti, mutta se ei takaa, että tietty testi tuottaisi tarkkaa tietoa. Ensimmäisen testin tulosten toistuminen on paras osoitus siitä, että testi tuottaa tarkkaa tietoa.

Yleiset aineiston tulkintaperusteet

23. Tällä hetkellä estrogeeniin sitoutumista koskevan aineiston tulkintaan ei ole yleisesti hyväksyttyä menetelmää. hrER-välitteisten vaikutusten laadullisten (ts. sitoutuva/sitoutumaton aine) ja/tai määrällisten (ts. log IC_{50}, suhteellinen sitoutumisaffiniteetti (RBA) jne.) arviointien on perustuttava empiiriseen aineistoon ja vankkaan tieteelliseen näkemykseen.

Testiraportti

24. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testi:

— käytetty testi

Kontrolli-/vertailu-/testikemikaali

— alkuperä, erän numero, viimeinen käyttöpäivä, jos saatavilla

— itse testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa, jos tiedossa

— tarvittaessa pH-arvon, osmolaliteetin ja saostumisen mittaus siinä kasvatusliuoksessa, johon testikemikaalia lisättiin,

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi,

— rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallisen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

▼**M8**

Liuotin/kantaja-aine:

— luonnehdinta (luonne, toimittaja ja erä)

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet

— testikemikaalin liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Reseptorit:

— reseptorien lähde (toimittaja, luettelonro, erä, reseptorin laji, toimittajalta saatu aktiivisen reseptorin pitoisuus, todistus toimittajalta)

— reseptorien luonnehdinta (myös tulokset saturaatiositoutumisesta): Kd, Bmax

— reseptorien säilytys

— radioleimattu ligandi:

— toimittaja, luettelonro, erä, spesifi aktiivisuus.

Testiolosuhteet:

— liukoisuusrajoitukset testiolosuhteissa

— sitoutumispuskurin koostumus

— reseptorin pitoisuus

— merkkiaineen (esim. radioleimatun ligandin) pitoisuus

— testikemikaalin pitoisuudet

— kantaja-aineen prosentuaalinen osuus lopullisessa testissä

— inkubaatiolämpötila ja -aika

— sitoutuneen/vapaan ligandin erottelumenetelmä

— positiiviset ja negatiiviset kontrollit / vertailuaineet

— kriteerit, joiden perusteella testit määritellään positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Hyväksyttävyyden tarkastus:

— samanaikaisten positiivisten kontrollien/vertailuaineiden IC_{50}- ja Hillslope-arvot

Tulokset:

— raakatiedot ja sitoutunutta/vapaata ligandia koskevat tiedot

— denaturoinnin vahvistustarkastus tarvittaessa

— jos se on saatavana, pienin vaikuttava pitoisuus (LEC)

— RBA- ja/tai IC_{50}-arvot sen mukaan, mikä on tarpeen

— pitoisuus-vastesuhde, jos mahdollista

— mahdolliset tilastoanalyysit sekä virhe- ja luottamusvälitiedot (ts. SEM, SD, CV tai 95 %:n luottamusväli) ja kuvaus siitä, miten nämä arvot saatiin.

▼**M8**

Tulosten tarkastelu:

— 10 prosentin säännön soveltaminen

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: s. 20–6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): s. 1073–89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): s. 63–6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293–342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225–231.

(13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. s. 1–188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111–120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213–221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58–67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835–848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197–1203.

▼**M8**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT JA LYHENTEET

10 prosentin sääntö: Mahdollisuus sulkea analyysista pois datapisteet, joissa rinnakkaisnäytteiden [^{3}H]17β-estradiolin spesifisen prosentuaalisen sitoutumisen keskiarvo on vähintään 10 prosenttia suurempi kuin pienemmällä pitoisuudella saatu keskiarvo (ks. lisäys 4).

Hyväksymisperusteet: Kontrollikokeiden suorittamista ja vertailustandardeja koskevat vähimmäisvaatimukset. Kaikkien hyväksymisperusteiden on täytyttävä, jotta koe olisi validi.

Tarkkuus (vastaavuus): Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testin suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testin oikeiden tulosten osuutta (1).

TM: Hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva OECD:n toimintamalli.

Kemikaali: Aine tai seos.

CV: Variaatiokerroin

E2: 17β-estradioli

HH: hormonitoiminnan häiriöt

hERα: Ihmisen estrogeenireseptori alfa

ER: Estrogeenireseptori

Estrogeeninen vaikutus: Kemikaalin kyky jäljitellä 17β-estradiolin kykyä sitoutua estrogeenireseptoreihin. Tällä testimenetelmällä voidaan havaita hERα-reseptoriin sitoutuminen.

IC50: Puolet estävän testikemikaalin suurimmasta vaikuttavasta pitoisuudesta.

ICCVAM: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (vaihtoehtoisten menetelmien validoinnin virastojenvälinen koordinointikomitea).

Laboratorioidenvälinen toistettavuus: Se, missä määrin eri pätevät laboratoriot voivat saada aikaan laadullisesti ja määrällisesti samanlaisia tuloksia käyttämällä samaa tutkimusprotokollaa ja testaamalla samoja aineita. Laboratorioidenvälinen toistettavuus määritetään esivalidointi- ja validointimenettelyissä, ja sillä osoitetaan, missä määrin testi voidaan onnistuneesti toteuttaa eri laboratorioissa (1).

Laboratorionsisäinen toistettavuus: Se, missä määrin tietyn laboratorion pätevä henkilöstö voi saada onnistuneesti aikaan samat tulokset käyttämällä tiettyä tutkimusprotokollaa eri ajankohtina. (1).

LEC: Lowest effective concentration eli testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla saadaan vaste (ts. testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla induktiokerroin eroaa tilastollisesti samanaikaisesta kantaja-ainekontrollista).

▼**M8**

Me-too-testi: Puhekielinen nimitys testimenetelmälle, joka on rakenteellisesti ja funktionaalisesti samanlainen kuin validoitu ja hyväksytty vertailutestimenetelmä. Tarkoittaa samaa kuin samanlainen testimenetelmä.

TPTO: Tulosperusteinen testiohje

Suoritusvaatimukset: Validoituun testimenetelmään perustuvat vaatimukset, joiden avulla arvioidaan ehdotetun toiminnallisesti ja mekanistisesti samanlaisen testin vertailtavuutta. Vaatimuksiin sisältyy 1) testin oleelliset osat; 2) vähimmäisluettelo vertailukemikaaleista, jotka on valittu niiden kemikaalien joukosta, joita on käytetty osoittamaan validoidun testimenetelmän hyväksyttävää suorituskykyä; ja 3) vertailukelpoiset validoidusta testimenetelmästä saatuihin tuloksiin perustuvat tarkkuuden ja luotettavuuden tasot, jotka ehdotetun testimenetelmän olisi osoitettava, kun sitä arvioidaan vertailukemikaalien vähimmäisluettelon avulla (1).

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet: Joukko suoritusvaatimuksiin sisältyviä vertailuaineita, joita laboratoriot voivat käyttää vakiotestiin liittyvän teknisen osaamisensa osoittamisessa. Näiden aineiden valintaperusteisiin kuuluu yleensä se, että niiden on edustettava erilaisia vasteita ja oltava kaupallisesti saatavilla. Lisäksi niistä on oltava käytettävissä laadukkaita vertailutietoja.

Pätevyys: Osoitettu kyky tehdä testi asianmukaisesti ennen tuntemattomien aineiden testaamista.

Vertailuestrogeeni: 17ß-estradioli (E2, CAS 50-28-2).

Vertailutestimenetelmät: Testit, joihin TPTO 493 perustuu.

RBA: Relative Binding Affinity, suhteellinen sitoutumisaffiniteetti. Aineen suhteellinen sitoutumisaffiniteetti lasketaan prosenttiosuutena aineen log (IC_{50}) -arvosta (IC_{50}) suhteessa 17β-estradiolin log (IC_{50}) -arvoon.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testin tarkkuus (vastaavuus) (1).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Se arvioidaan laskemalla toistettavuus samassa laboratoriossa ja eri laboratorioissa.

SD: Keskihajonta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Validoitu testimenetelmä: Testi, josta on tehty validointitutkimuksia sen merkityksellisyyden (ja tarkkuuden) sekä luotettavuuden määrittämiseksi tiettyyn tarkoitukseen. On syytä pitää mielessä, että validoidun testimenetelmän suorituskyky tarkkuuden ja luotettavuuden osalta ei välttämättä ole riittävä, jotta se voitaisiin hyväksyä ehdotettuun tarkoitukseen (1).

Validointi: Prosessi, jossa tietyn lähestymistavan, menetelmän, testin, prosessin tai arvioinnin luotettavuus ja merkityksellisyys vahvistetaan määrättyyn tarkoitukseen (1).

▼**M8**

Lisäys 2

FREYBERGER-WILSONIN SATURAATIOSITOUTUMISTA JA KILPAILEVAA SITOUTUMISTA ESTROGEENIRESEPTORIIN (ERα) KOSKEVAT IN VITRO -TESTIT, JOISSA KÄYTETÄÄN KOKOPITKÄÄ REKOMBINANTTIA ERα:ÄÄ.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. Tässä saturaatiositoutumista ja kilpailevaa sitoutumista estrogeenireseptoriin (ERα) tarkastelevassa *in vitro* -testissä käytetään kokopitkää ihmisen reseptoria ERα(hrERα), joka on tuotettu bakuloviruksella infektoiduissa hyönteissoluissa ja eristetty niistä. Freybergerin ja Wilsonin kehittämälle tutkimusprotokollalle tehtiin kansainvälinen monen laboratorion suorittama validointitutkimus (2), joka osoitti, että se on merkityksellinen ja luotettava testin käyttötarkoituksen kannalta.

2. Tämä testi on sellaisten aineiden tunnistamiseen tarkoitettu seulontamenettely, jotka voivat sitoutua kokopitkään hrERα:aan. Sillä määritetään testikemikaalin kyky kilpailla 17β-estradiolin kanssa hrERα:aan sitoutumisesta. Kvantitatiivisia testituloksia voivat olla esimerkiksi IC_{50} (testikemikaalin se pitoisuus, joka tarvitaan siihen, että puolet [^{3}H]-17β-estradiolista syrjäytetään hrERα:sta) ja testikemikaalin suhteelliset sitoutumisaffiniteetit hrERα:aan 17β-estradioliin verrattuna. Kemikaalien seulonnassa hyväksyttäviä laadullisia tuloksia voivat olla testikemikaalien luokittelut joko hrERα:aan sitoutuviksi tai sitoutumattomiksi aineiksi tai epäselviksi sitoutumiskäyriä koskevien kriteerien perusteella.

3. Testissä käytetään radioaktiivista ligandia, mikä edellyttää laboratoriolta radioaktiivisten materiaalien käyttölupaa. Kaikissa menettelyissä, joissa käytetään radioisotooppeja ja vaarallisia kemikaaleja, on noudatettava kansallisen lainsäädännön määräyksiä ja menettelyjä.

4. Kohdat ”**YLEISJOHDANTO**” ja ”**IHMISEN REKOMBINANTTIIN ESTROGEENIRESEPTORIIN SITOUTUMISTA TARKASTELEVAN TESTIN OSAT**” on luettava ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testiohjeessa käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATTEET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

5. Ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptori alfaan (hrERα) sitoutumista tarkastelevassa testissä mitataan radioleimatun ligandin ([3H]17β-estradioli) kykyä sitoutua estrogeenireseptoriin testikemikaalin (eli kilpailijan) suurenevien pitoisuuksien yhteydessä. Testikemikaalit, joilla on voimakas affiniteetti estrogeenireseptoriin, kilpailevat radioleimatun ligandin kanssa pienemmällä pitoisuudella kuin ne kemikaalit, joiden affiniteetti reseptoriin on heikompi.

6. Tässä testissä on kaksi keskeistä osaa: saturaatiositoutumiskoe, jolla luonnehditaan reseptorin ja ligandin yhteisvaikutuksen parametreja, ja kilpaileva sitoutumiskoe, jolla luonnehditaan testikemikaalin ja radioleimatun ligandin kilpailua estrogeenireseptoriin sitoutumisessa.

7. Saturaatiositoutumiskokeen tarkoituksena on luonnehtia tietyn reseptorien erän sitoutumisaffiniteettia ja määrää kilpailevaa sitoutumista tarkastelevan kokeen valmistelussa. Saturaatiositoutumiskokeessa mitataan tasapaino-olosuhteissa kiinteän estrogeenireseptoripitoisuuden affiniteettia sen luonnolliseen ligandiin nähden (esitettynä dissosiaatiovakiolla, Kd) ja aktiivisten reseptorikohtien määrää (Bmax).

▼M8

8. Kilpailevassa sitoutumiskokeessa mitataan aineen affiniteettia kilpailla [3H]17β-estradiolin kanssa estrogeenireseptoriin sitoutumisessa. Affiniteetti kvantifioidaan sellaisella testikemikaalin pitoisuudella, joka tasapaino-olosuhteissa estää 50 prosenttia [3H]17β-estradiolin spesifisestä sitoutumisesta (”50 prosenttia estävä pitoisuus” tai IC50). Tätä voidaan arvioida käyttämällä myös suhteellista sitoutumisaffiniteettia (RBA, suhteessa estradiolin IC50-arvoon, joka on mitattu erikseen samassa ajossa). Kilpailevassa sitoutumiskokeessa mitataan [3H]17β-estradiolin sitoutumista kiinteänä pitoisuutena samalla, kun läsnä on laaja kirjo (kahdeksan suuruusluokkaa) testikemikaalipitoisuuksia. Sen jälkeen tiedot sovitetaan, mikäli mahdollista, jotta voidaan muodostaa Hillin yhtälö (Hill, 1910), jolla kuvataan sitä, miten yhdessä paikassa oleva kilpaileva sitoutuva aine syrjäyttää radioligandin. Sen perusteella, missä määrin radioleimattua estradiolia syrjäytetään, luonnehditaan testikemikaalia sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi tai epäselvän vasteen tuottavaksi.

MENETTELY

hrERα-proteiinin hyväksyttävän suorituskyvyn osoittaminen

9. Ennen kuin saturaatiositoutumistestiä ja kilpailevan sitoutumisen testiä aletaan käyttää rutiininomaisesti, on osoitettava, että jokainen uusi hrERα-erä toimii asianmukaisesti siinä laboratoriossa, jossa sitä käytetään. Suorituskyky osoitetaan kaksivaiheisella menettelyllä. Nämä vaiheet ovat seuraavat:

— Tehdään [^{3}H]-17β-estradiolin saturaatiositoutumistesti, jolla osoitetaan hrERα-spesifisyys ja saturaatio. Näiden tietojen epälineaarisella regressioanalyysilla (esim. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja sen jälkeen tehtävällä Scatchardin kuvaajalla osoitetaan [^{3}H]-17β-estradiolin sitoutumisaffiniteetti hrERα:aan (Kd) ja reseptorien määrä (Bmax) jokaisessa hrERα-erässä.

— Tehdään kilpailevaa sitoutumista tarkasteleva testi käyttämällä kontrolliaineita (vertailuestrogeeni (17β-estradioli)), heikosti sitoutuva aine (esimerkiksi noretinodreli tai noretindroni) ja sitoutumatonta ainetta (oktyylitrietoksisilaani, OTES). Jokaisen laboratorion on luotava aiemmista tiedoista koostuva tietokanta, jolla dokumentoidaan IC_{50} -arvojen ja muiden oleellisten arvojen yhdenmukaisuus vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen osalta eri kokeissa ja eri hrERα-erissä. Kontrolliaineiden kilpailevan sitoutumisen käyrien parametrien on oltava 95 prosentin luottamusvälin rajoissa (ks. taulukko 1). Nämä raja-arvot on laadittu tämän testin validointitutkimukseen osallistuneista laboratorioista saatujen tietojen perusteella (2).

Taulukko 1

Vertailuestrogeenille ja heikosti sitoutuvalle aineelle kehitetyt suorituskykyvaatimukset (FW hrER -sitoutumistesti)

Aine	Parametri	Keskiarvo (a)	Keskihajonta (n)	95 %:n luottamusväli (b)	
				Alaraja	Yläraja
17β-estradioli	Ylin (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Alin (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillslope	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	$LogIC_{50}$ (M)	-8,92 ()	0,18 (67)	-8,97	-8,88

▼M8

Aine	Parametri	Keskiarvo (a)	Keskihajonta (n)	95 %:n luottamusvälit (b)	
				Alaraja	Yläraja
Noretinodreli	Ylin (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Alin (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillslope	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	Log IC	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Noretindroni(c)	Ylin (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Alin (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillslope	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	$LogIC_{50}$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

(a) Keskiarvo (n) ± keskihajonta (SD) laskettiin käyttämällä käyrän sovituksen parametriestimaatteja (neljän parametrin Hillin yhtälö) kontrolliajoista, jotka tehtiin neljässä laboratoriossa validointitutkimuksen aikana (ks. lähdeviitteen 2 liite N).

(b) 95 prosentin luottamusvälit on tarkoitettu ohjeeksi hyväksymisperusteiden soveltamiseen.

(c) Noretindronin testaus oli valinnaista validointitutkimuksen alatehtävä 4:ssä (ks. lähdeviite 2, alatehtävä 4). Keskiarvo ± SD (n) laskettiin siis käyttämällä käyrän sovituksen estimaatteja (neljän parametrin Hillin yhtälö) kontrolliajoista, jotka tehtiin kahdessa laboratoriossa.

IC_{50}*-arvon vaihteluväliin vaikuttaa kussakin laboratoriossa käytetyn reseptorivalmisteen Kd ja radioleimatun ligandin pitoisuus.* IC_{50} *-arvon vaihteluvälin asianmukainen mukautus testin tekemisessä käytettyjen olosuhteiden perusteella on hyväksyttävää.*

Laboratorion pätevyyden osoittaminen

10. Ks. 17 ja 18 kohta ja taulukko 2 kappaleesta ”h**rER-SITOUTUMISTESTIN OSAT**” tämän testimenetelmän osalta. Kummassakin testissä (saturaatiositoutumisen ja kilpailevan sitoutumisen testissä) pitää olla kolme itsenäistä testiajoa (ts. tuoreilla reseptori-, kemikaali- ja reagenssilaimennoksilla), jotka tehdään eri päivinä, ja jokaisessa testiajossa on oltava kolme rinnakkaisnäytettä.

Reseptorin (hrERα) pitoisuuden määrittäminen

11. Aktiivisen reseptorin pitoisuus vaihtelee jonkin verran erän ja säilytysolosuhteiden mukaan. Tämän vuoksi toimittajalta saadun aktiivisen reseptorin pitoisuus on määritettävä. Näin varmistetaan, että aktiivisen reseptorin pitoisuus on testiajossa asianmukainen.

12. Kilpailevaa sitoutumista vastaavissa olosuhteissa (ts. 1 nM [^{3}H]-estradiolia) reseptorista on inkuboitava 0,25, 0,5, 0,75 ja 1 nM:n nimellispitoisuudet ilman (kokonaissitoutuminen) 1 μM:n pitoisuutta leimaamatonta estradiolia ja sen kanssa (epäspesifi sitoutuminen). Spesifinen sitoutuminen, joka lasketaan kokonais- ja epäspesifin sitoutumisen erotuksena, esitetään suhteessa reseptorin nimellispitoisuuteen. Reseptorin pitoisuus, josta saatavat spesifiset sitoutumisarvot ovat 20 prosenttia lisätystä radioleimatusta aineesta, suhteutetaan vastaavaan reseptorin nimellispitoisuuteen, joka on se reseptorin pitoisuus, jota pitää käyttää saturaatiositoutumisen ja kilpailevan sitoutumisen kokeissa. Tämän ehdon täyttää usein hrER:n loppupitoisuus 0,5 nM.

▼M8

13. Jos 20 prosentin ehtoa ei voida täyttää toistuvasti, koejärjestely on tarkistettava mahdollisten virheiden varalta. Jos 20 prosentin ehtoa ei voida täyttää, se voi olla merkki siitä, että rekombinanttierässä on hyvin vähän aktiivista reseptoria. Tällöin on syytä harkita toisen reseptorierän käyttämistä.

Saturaatiotesti

14. Tässä testissä on arvioitava kahdeksan suurenevaa pitoisuutta [^{3}H]17β-estradiolista kolmena rinnakkaisnäytteenä seuraavan kolmen ehdon mukaisesti (ks. taulukko 2):

— Ilman leimaamatonta 17β-estradiolia ja estrogeenireseptorin kanssa. Tässä määritetään kokonaissitoutuminen määrittämällä radioaktiivisuus niissä kuopissa, joissa on vain [3H]17β-estradiolia.

— Leimattuun 17β-estradioliin nähden 1 000 kertaa suuremman leimaamattoman 17β-estradiolipitoisuuden ja estrogeenireseptorin kanssa. Tämän ehdon tarkoituksena on saturoida aktiiviset sitoutumiskohdat leimaamattomalla 17β-estradiolilla ja määrittää epäspesifinen sitoutuminen mittaamalla kuoppien radioaktiivisuus. Mahdollisen jäljellä olevan radioaktiivisen estradiolin, joka voi sitoutua reseptoriin, katsotaan sitoutuvan epäspesifiseen kohtaan, koska ei-radioaktiivista estradiolia pitäisi olla niin suuri pitoisuus, että se sitoutuu kaikkiin saatavilla oleviin spesifisiin kohtiin reseptorissa.

— Ilman leimaamatonta 17β-estradiolia ja ilman estrogeenireseptoria (kokonaisradioaktiivisuuden määrittäminen).

[^{3}H]-17β-estradiolia ja leimaamatonta 17β-estradiolia sisältävien liuosten valmistaminen

15. [^{3}H]-17β-estradiolin laimennokset on valmistettava lisäämällä testipuskuria 12 nM:n varastoliuokseen [^{3}H]-17β-estradiolia, jotta saadaan pitoisuudet, jotka vaihtelevat välillä 0,12 nM ja 12 nM. Lisäämällä 40 µl näitä liuoksia 96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen testikuoppiin (lopullinen tilavuus 160 µl) saadaan lopulliset testipitoisuudet, jotka vaihtelevat välillä 0,03–3,0 nM. Testipuskurin, [^{3}H]-17β-estradiolia sisältävän varastoliuoksen ja laimennosten valmistaminen sekä pitoisuuksien määrittäminen on selostettu perusteellisesti FW-testin protokollassa (2).

16. Etanolia sisältävien 17β-estradioliliuosten laimennokset on valmistettava lisäämällä testipuskuria siten, että saadaan kahdeksan suurenevaa pitoisuutta välillä 0,06 µM ja 6 µM. Lisäämällä 80 µl näitä liuoksia 96-kuoppaisten mikrotiitterilevyjen testikuoppiin (lopullinen tilavuus 160 µl) saadaan lopulliset testipitoisuudet, jotka vaihtelevat välillä 0,03 µM ja 3 µM. Leimaamattoman 17β-estradiolin lopullinen pitoisuus yksittäisissä epäspesifisissä sitoutumistestin kuopissa pitää olla 1 000 kertaa suurempi kuin leimatun [^{3}H]-17β- estradiolin pitoisuuden. Leimaamattomien 17β-estradiolilaimennosten valmistaminen on selostettu FW-testin protokollassa (2).

17. Testissä on käytettävä sellaista reseptorin nimellispitoisuutta, jolla spesifiseksi sitoutumiseksi saadaan 20±5 prosenttia (ks. 12 ja 13 kohta). hrERα-liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

18. 96-kuoppaiset mikrotiitterilevyt valmistellaan taulukossa 2 kuvatun mukaisesti kolmella rinnakkaisnäytteellä pitoisuutta kohti. Lisäyksessä 2.2 on esimerkkejä siitä, miten [^{3}H]-17β-estradiolin, leimaamattoman 17β-estradiolin, puskurin ja reseptorin pitoisuus ja määrä levyillä jaotellaan.

▼**M8**

Taulukko 2

Mikrotiitterilevyn järjestys saturaatiositoutumistestissä

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Kokonaissitoutuminen (liuotin)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2+ ER+ 0,10 μM E_2			Epäspesifinen sitoutuminen
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER+ 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E_2			
F													
G													
H													

[3H] E2: [3H]-17β-estradioli
ER: Estrogeenireseptori
E_2: Leimaamaton 17β-estradioli

19. Testin mikrotiitterilevyjä on inkuboitava 2–8 °C:n lämpötilassa 16–20 tuntia, ja ne on asetettava sekoittajaan inkuboinnin ajaksi.

hrERα:aan sitoutuneen [3H]-17β-estradiolin mittaaminen

20. [^{3}H]-17β-estradioli, joka on sitoutunut hrERα:aan, on erotettava vapaasta [^{3}H]-17β-estradiolista lisäämällä jokaiseen kuoppaan 80 μl kylmää DCC-suspensiota ja ravistelemalla mikrotiitterilevyjä 10 minuuttia ja sentrifugoimalla niitä sen jälkeen 10 minuuttia kierrosluvulla 2 500 rpm. Jotta voidaan minimoida sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin dissosioituminen hrERα:sta tässä prosessissa, on erittäin tärkeää, että puskurit ja testilevyt pidetään 2–8 °C:ssa ja että jokainen vaihe tehdään nopeasti. Mikrotiitterilevyjen ravistelija on tarpeen, jotta levyt voidaan käsitellä tehokkaasti ja nopeasti.

21. Kuopista on otettava 50 μl supernatanttia, joka sisältää hrERα:aan sitoutunutta [^{3}H]-17β-estradiolia, erittäin varovasti, jotta kuopat eivät kontaminoidu joutumalla kosketuksiin DCC:n kanssa. Tämä määrä supernatanttia on laitettava toiselle mikrotiitterilevylle.

22. Jokaiseen kuoppaan (A1–B12 ja D1–E12) on lisättävä 200 μl tuikenestettä, joka pystyy muuntamaan ydinsäteilyn liike-energian valoenergiaksi. Kuopat G1–H12 (yksilöity kokonais-dpm:n mittaamiseen) edustavat [^{3}H]-17β-estradiolin sarjalaimennoksia (40 μl), jotka on laitettava suoraan mittauslevyn kuopissa olevaan tuikenesteeseen, kuten taulukossa 3 on näytetty. Nämä kuopat sisältävät siis vain 200 μl tuikenestettä ja asianmukaisen laimennoksen [3H]-17β-estradiolia. Näillä mittauksilla osoitetaan, paljonko [^{3}H]-17β-estradiolia dpm:issä lisättiin kaikkiin kokonaissitoutumista ja epäspesifiä sitoutumista mittaaviin kuoppiin.

▼M8

Taulukko 3

Mikrotiitterilevyn järjestys saturaatiositoutumistestissä, radioaktiivisuuden mittaus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,10 nM [^{3}H] E_2 + ER			Kokonaissitoutuminen (liuotin)
B	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER			1,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,03 μM E_2			0,06 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,06 μM E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,08 μM E_2			0,10 nM [3H] E_2+ ER+ 0,10 μM E_2			Epäspesifinen sitoutuminen
E	0,30 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,30 μM E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2 + ER + 0,60 μM E_2			1,0 nM [^{3}H] E2 + ER+ 1,0 μM E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2 + ER + 3,0 μM E_2			
F													
G	0,03 nM [^{3}H] E_2 (kokonais-dpm:t)			0,06 nM [^{3}H] E_2			0,08 nM [^{3}H] E_2			0,10 nM [^{3}H] E_2			Kokonais-dpm:t (*)
H	0,30 nM [^{3}H] E_2			0,60 nM [^{3}H] E_2			1,0 nM [^{3}H] E_2			3,0 nM [^{3}H] E_2			

[3H] E2: [3H]-17β-estradioli
ER: Estrogeenireseptori
E2: Leimaamaton 17β-estradioli
dpm:t: disintegrations per minute, hajoamista minuutissa
(*) Radioaktiiviset sarjalaimennokset [^{3}H]-leimattua estradiolia on lisättävä suoraan 200 μl:aan tuikenestettä kuopissa G1–H12.

23. Mittaukset on aloitettava vähintään kahden tunnin viipeellä, ja laskenta-ajan tulee olla 40 minuuttia kuoppaa kohti. Kuoppakohtaisen dpm-arvon määrittämisessä on käytettävä mikrotiitterilevyn tuikelaskuria ja vaimennuskorjausta. Vaihtoehtoisesti näytteet voidaan mitata tavanomaisella laskurilla, jos mikrotiitterilevyjen tuikelaskuria ei ole saatavilla. Tällöin voidaan lyhentää laskenta-aikaa.

Kilpailevan sitoutumisen testi

24. Kilpailevan sitoutumisen testissä mitataan yhden [^{3}H]-17β-estradiolipitoisuuden sitoutumista samaan aikaan suurenevien testikemikaalipitoisuuksien kanssa. Jokaisesta pitoisuudesta on oltava kolme rinnakkaisnäytettä yhdessä testiajossa. Lisäksi on tehtävä kolme eriaikaista testiajoa jokaisesta testikemikaalista. Testi on tehtävä yhdellä tai useammalla 96-kuoppaisella mikrotiitterilevyllä.

Kontrollit

25. Testiä tehtäessä jokaiseen kokeeseen tulee sisältyä samanaikainen liuotinkontrolli ja muut kontrollit (ts. vertailuestrogeeni, heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine). Vertailuestrogeenin ja kontrollien (ts. heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine) täydellisiä pitoisuuskäyriä on käytettävä yhdellä levyllä jokaisessa testiajossa. Kaikilla muilla levyillä on oltava i) suuri (suurin syrjäyttävä) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus E2:sta ja heikosti sitoutuvasta aineesta kolmena rinnakkaisnäytteenä, ii) liuotinkontrolli ja epäspesifi sitoutuva aine, kukin vähintään kolmena rinnakkaisnäytteenä. Testipuskurin, kontrollien, [^{3}H]-17β-estradioli-, hrERα- ja testikemikaaliliuosten valmistamismenettelyt on selostettu lähdeviitteessä 2 (ks. FW-testin protokollan liite K).

▼**M8**

Liuotinkontrolli:

26. Liuotinkontrolli osoittaa, ettei liuotin vaikuta testijärjestelmään. Sillä mitataan myös kokonaissitoutumista. Suositeltu liuotin on etanoli. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää DMSO:ta, jos testikemikaalin suurin pitoisuus ei liukene etanoliin. Etanolin tai DMSO:n pitoisuus lopullisissa testikuopissa on 1,5 prosenttia, eikä se saa ylittää kahta prosenttia.

Puskurikontrolli:

27. Puskurikontrolli ei saa sisältää liuotinta eikä testikemikaalia mutta kaikkia muita testin aineita. Puskurikontrollin tuloksia verrataan liuotinkontrollin tuloksiin sen varmistamiseksi, ettei käytetty liuotin vaikuta testijärjestelmään.

Voimakkaasti sitoutuva aine (vertailuestrogeeni)

28. 17β-estradioli (CAS 50-28-2) on endogeeninen ligandi, ja se sitoutuu suurella affiniteetilla estrogeenireseptorin alatyyppi alfaan. Jokaisesta kilpailevaa sitoutumista tarkastelevasta hrERα-testistä on laadittava vakiokäyrä käyttämällä leimaamatonta 17β-estradiolia, jotta voidaan arvioida vaihtelua, kun testi tehdään samassa laboratoriossa myöhemmin uudestaan. Leimaamattomasta 17β-estradiolista on valmistettava kahdeksan liuosta etanoliin, ja testikuoppien pitoisuudet saavat vaihdella välillä 100 nM–10 pM (-7[logM] ja -11[logM]) niin, että niiden pitoisuudet ovat seuraavat: -7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], - 9,5[logM], -10[logM], -11[logM]. Suurin pitoisuus leimaamatonta 17β-estradiolia (1 μM) toimii myös epäspesifisen sitoutumisen indikaattorina. Taulukossa 4 tämä pitoisuus on yksilöity tunnisteella ”NSB”, vaikka se on myös osa vakiokäyrää.

Heikosti sitoutuva aine

29. Testiin on sisällytettävä myös heikosti sitoutuva aine (noretinodreli (CAS 68-23-5) tai noretindroni (CAS 68-22-4)), jotta voidaan osoittaa jokaisen kokeen herkkyys ja arvioida vaihtelua, kun testi tehdään myöhemmin uudestaan. Heikosti sitoutuvasta aineesta on valmistettava kahdeksan liuosta etanoliin, ja testikuoppien pitoisuudet saavat vaihdella välillä 3 nM–30 pM (-8,5[logM] ja -4,5[logM]) niin, että niiden pitoisuudet ovat seuraavat: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM], -8,5[logM].

Sitoutumaton aine

30. Negatiivisena kontrollina (sitoutumattomana aineena) on käytettävä oktyylitrietoksisilaania (OTES, CAS 2 943-75-1). Sen avulla voidaan varmistaa, että ajetun mukaisella testillä havaitaan, kun testikemikaalit eivät sitoudu hrERα:aan. Sitoutumattomasta aineesta on valmistettava kahdeksan liuosta etanoliin, ja testikuoppien pitoisuudet saavat vaihdella välillä 0,1nM–1 000 pM (-10[logM] ja -3[logM]) logaritmisin lisäyksin. Vaihtoehtoisena sitoutumattomana kontrolliaineena voidaan käyttää di-*n*-butyyliftalaattia (DBP:tä). Sen suurimmaksi liukoisuudeksi on osoitettu -4[logM].

hrERα:n pitoisuus

31. Testissä on käytettävä sellaista reseptoripitoisuutta, jolla 1 nM:n radioligandin spesifiseksi sitoutumiseksi saadaan 20±5 prosenttia (ks. lisäys 2:n 12 ja 13 kohta). hrERα-liuos on valmistettava juuri ennen käyttöä.

[3H]-17β-estradioli

32. [^{3}H]-17β-estradiolin pitoisuus testikuopissa on oltava 1,0 nM.

▼**M8**

Testikemikaalit

33. Ensin on tehtävä liukoisuustesti, jossa määritetään jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja ja testiä tehtäessä käytettävä asianmukainen pitoisuusalue. Jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja on määritettävä alustavasti liuottimessa ja vahvistettava myöhemmin testiolosuhteissa. Testissä testattava lopullinen pitoisuus saa olla enintään 1 mM. Pitoisuusalueen määritystesti koostuu liuotinkontrollista ja kahdeksasta logaritmiseen asteikkoon perustuvasta sarjalaimennoksesta, jotka aloitetaan suurimmasta hyväksyttävästä pitoisuudesta (esim. 1 mM tai vähemmän liukoisuusrajan mukaan) ja todetun sameuden tai sakan määrän mukaan (ks. myös 35 kohta). Testikemikaali on testattava käyttämällä kahdeksaa logaritmisella pitoisuudella porrastettua käyrää testiä edeltäneessä pitoisuusalueen määrittämistestissä todetun mukaisesti. Toisen ja kolmannen kokeen pitoisuuksia on mukautettava tarpeen mukaan, jotta pitoisuus-vastekäyrää voidaan luonnehtia paremmin.

34. Testikemikaalin laimennokset on tehtävä asianmukaiseen liuottimeen (ks. lisäys 2:n 26 kohta). Jos testikemikaalin suurin pitoisuus ei liukene sen paremmin etanoliin kuin DMSO:hon ja jos liuottimen määrän lisääminen johtaisi siihen, että liuottimen pitoisuus lopullisessa testiputkessa olisi hyväksyttävää määrää suurempi, suurinta pitoisuutta voidaan pienentää seuraavaan pienempään pitoisuuteen. Tällöin pitoisuussarjan alapäähän voidaan lisätä ylimääräinen pitoisuus. Sarjan muita pitoisuuksia ei tule muuttaa.

35. Testikemikaaliliuoksia on tarkkailtava huolellisesti, kun niitä lisätään testikuoppiin, koska testikemikaali voi sakkautua testikuoppaan lisättäessä. Tiedot kaikista kuopista, joissa on sakkaa, on jätettävä pois käyrän sovituksesta, ja tietojen poisjättämisen syy on ilmoitettava.

36. Jos muista lähteistä on saatavilla aiempia tietoja, joissa on määritetty testikemikaalin log(IC_{50})-arvo, voi olla tarpeen porrastaa laimennokset geometrisesti (esimerkiksi noin 0,5 logaritmiyksikköä odotuksenmukaisesta log(IC_{50})-arvosta). Lopullisen tuloksen on kuvastettava pitoisuuksien riittävää jakautumista log(IC_{50})-arvon kummallakin puolella, ylin ja alin arvo mukaan luettuina, jotta sitoutumiskäyrää voidaan luonnehtia asianmukaisesti.

Testilevyn järjestäminen

37. Testiä varten on tehtävä merkityt mikrotiitterilevyt käyttämällä kuusinkertaista inkubaatiota, jossa on oltava koodit liuotinkontrollille, vertailuestrogeenin suurimmalle pitoisuudelle, joka toimii myös epäspesifisen sitoutumisen (NSB:n) indikaattorina, ja puskurikontrollille. Lisäksi on käytettävä kolminkertaista inkubaatiota, jossa on koodit jokaiselle sitoutumattoman kontrolliaineen (oktyylitrietoksilaanin) kahdeksalle pitoisuudelle, vertailuestrogeenin seitsemälle pienemmälle pitoisuudelle, heikosti sitoutuvan aineen kahdeksalle pitoisuudelle ja jokaisen testikemikaalin (TC) kahdeksalle pitoisuudelle. Esimerkki levyn järjestyksestä vertailuestrogeenin ja kontrollin täysiä pitoisuuskäyriä varten on jäljempänä olevassa taulukossa 4. Testikemikaaleille tehdään omat mikrotiitterilevynsä, ja niillä on oltava levyn kontrollit eli 1) suurin (eniten syrjäyttävä) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus sekä E2:ta

▼M8

että heikosti sitoutuvaa ainetta kolmena rinnakkaisnäytteenä, 2) liuotinkontrolli ja epäspesifi sitoutuva aine, kumpikin kuutena rinnakkaisnäytteenä (taulukko 5). Esimerkki kilpailevan testin mikrotiitterilevyn järjestystä koskevasta taulukosta, jossa käytetään kolmea tuntematonta testikemikaalia, on lisäyksessä 2.3. Taulukoissa 4 ja 5 esitetyt pitoisuudet ovat testin lopullisia pitoisuuksia. E2:n suurimman pitoisuuden on oltava 1×10^{-7} M. Heikosti sitoutuvan aineen osalta on käytettävä suurinta pitoisuutta, jota siitä käytetään levyllä 1. Laboratorion on määritettävä IC_{50}-pitoisuus sen aiempiin tietoihin pohjautuvan tietokannan perusteella. Tämän arvon oletetaan olevan sama kuin validointitutkimuksissa todettu arvo (ks. taulukko 1).

Taulukko 4

Kilpailevan sitoutumisen testin mikrotiitterilevyn järjestys sekä vertailuestrogeenin ja kontrollien täydet pitoisuuskäyrät (levy 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (vain liuotin)			TB (vain liuotin)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1\times10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1\times10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Tyhjä (*)		
D	NE ($1\times10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1\times10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1\times10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1\times10^{-7,5}$)			NE ($1\times10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Tyhjä (radioakt. aineelle) (**)			Tyhjä (radioakt. aineelle) (**)			Puskurikontrolli			Puskurikontrolli		

Tässä esimerkissä heikosti sitoutuva aine on noretinodreli (NE).
(*) Oikeasti tyhjä, kuoppa ei käytössä.
(**) Tyhjä inkuboinnin aikana mutta käytetään lisätyn kokonaisradioaktiivisuuden vahvistamisessa.

Taulukko 5

Kilpailevan sitoutumisen testin mikrotiitterilevyn järjestys sekä testikemikaalien ja levykontrollien täydet pitoisuuskäyrät

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (vain liuotin)			TB (vain liuotin)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1\times10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Tässä esimerkissä heikosti sitoutuva aine on noretinodreli (NE).

▼M8

Kilpailevan sitoutumisen testin tekeminen

38. Kuten taulukossa 6 osoitetaan, kuoppiin on lisättävä 80 µl liuotinkontrollia, puskurikontrollia, vertailuestrogeenia, heikosti sitoutuvaa ainetta ja sitoutumatonta ainetta sekä testikemikaaleja, jotka on valmistettu testipuskuriin. Sen jälkeen jokaiseen kuoppaan tulee lisätä 40 µl [3H]-17β-estradioliliuosta (4 nM). Kun levyjä on sekoitettu varovasti 10–15 minuuttia 2–8 °C:ssa, kuoppiin tulee lisätä 40 µl hrERα-liuosta. Testin mikrotiitterilevyjä on inkuboitava 2–8 °C:n lämpötilassa 16–20 tuntia, ja ne on asetettava sekoittajaan inkuboinnin ajaksi.

Taulukko 6

Kilpailevan hrER-sitoutumistestin osien tilavuus, mikrotiitterilevyt

Tilavuus (µl)	Ainesosa
80	Leimaamaton 17β-estradioli, noretinodreli, OTES, testikemikaalit, liuotin tai puskuri
40	4 nM [^{3}H]-17β-estradioliliuos
40	hrERα-liuos, pitoisuus määritetyn mukaisesti
160	***Kunkin testikuopan kokonaistilavuus***

39. hrERα:aan sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin kvantifiointi, sen jälkeen kun hrERα:aan sitoutunut [^{3}H]-17β-estradioli on erotettu vapaasta [^{3}H]-17β-estradiolista lisäämällä 80 µl kylmää DCC-suspensiota jokaiseen kuoppaan, on tehtävä saturaatiositoutumistestin 20–23 kohdassa kuvatun mukaisesti.

40. Kuopat H1–6 (jotka on merkitty tyhjäksi (radioaktiivisuuden mittaamista varten) taulukossa 4) edustavat [^{3}H]-leimatun estradiolin dpm-arvoa 40 µl:ssa. 40 µl alikvoottia on lisättävä suoraan kuoppien H1–H6 tuikenesteeseen.

Hyväksymisperusteet

Saturaatiositoutumisen testi

41. Spesifisen sitoutumiskäyrän tulisi saavuttaa tasanne käytettäessä suurenevia pitoisuuksia [^{3}H]-17β-estradiolista, mikä osoittaa, että ligandi on saturoinut hrERα:n.

42. [3H]-17β-estradiolin spesifinen sitoutuminen pitoisuudella 1 nM tulee olla hyväksymisalueella, joka on 15–25 prosenttia mitatusta keskimääräisestä kokonaisradioaktiivisuudesta, joka testiajoissa lisättiin. Satunnaiset vähäiset poikkeamat tältä alueelta ovat hyväksyttäviä, mutta jos testiajojen tulokset ovat jatkuvasti tämän alueen ulkopuolella tai jos jokin tietty ajo on tämän alueen ulkopuolella, proteiinipitoisuutta on muutettava ja saturaatiotesti on toistettava.

43. Tietojen on tuotettava lineaarinen Scatchardin kuvaaja.

44. Epäspesifinen sitoutuminen ei saa olla liiallista. Epäspesifisen sitoutumisen arvon on yleensä oltava <35 prosenttia kokonaissitoutumisesta. Tämä osuus voi kuitenkin satunnaisesti ylittää tämän rajan, jos testissä käytetyn radioleimatun 17β-estradiolin pienimmästä pitoisuudesta mitataan hyvin pieni dpm-arvo.

▼**M8**

Kilpailevan sitoutumisen testi

45. Leimaamattoman 17β-estradiolin suurenevien pitoisuuksien tulisi syrjäyttää [^{3}H]-17β-estradioli reseptorista yhteen kohtaan kilpailevan sitoutumisen osalta johdonmukaisesti.

46. Vertailuestrogeenin (ts. 17β-estradiolin) IC_{50}-arvon on oltava likimain sama kuin [^{3}H]-17β-estradiolin molaarinen konsentraatio plus saturaatiositoutumistestissä määritetty Kd-arvo.

47. Spesifisen kokonaissitoutumisen tulisi olla johdonmukaisesti hyväksymisalueella 20 ± 5 prosenttia, kun jokaiseen kuoppaan testiajoissa lisätyn kokonaisradioaktiivisuuden keskimääräinen mitattu pitoisuus on 1 nM. Satunnaiset vähäiset poikkeamat tältä alueelta ovat hyväksyttäviä, mutta jos testiajojen tulokset ovat jatkuvasti tämän alueen ulkopuolella tai jos jokin tietty ajo on tämän alueen ulkopuolella, proteiinipitoisuutta on muutettava.

48. Liuotin ei saa muuttaa testin herkkyyttä tai toistettavuutta. Liuotinkontrollin (TB-kuopat) tuloksia verrataan puskurikontrollin tuloksiin sen varmistamiseksi, ettei käytetty liuotin vaikuta testijärjestelmään. TB- ja puskurikontrollin tulosten tulisi olla verrattavissa, jos liuotin ei ole vaikuttanut testiin.

49. Sitoutumaton aine saa syrjäyttää enintään 25 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolista hrERα:sta, kun testattu konsentraatio on 10^{-3} M (OTES) tai 10^{-4} M (DBP).

50. Vertailuestrogeenille ja kahdelle heikosti sitoutuvalle aineelle (noretinodreli ja noretindroni) on laadittu suoritusvaatimukset FW hrER -sitoutumistestin validointitutkimukseen perustuvien tietojen avulla (lähdeviitteen 2 liite N). Keskiarvolle (n) +/- keskihajonnalle on määritetty 95 prosentin luottamusvälit kaikkien niiden kontrolliajojen perusteella, jotka tehtiin validointitutkimuksiin osallistuneissa laboratorioissa. Nämä luottamusvälit laskettiin vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen käyrän sovitusparametreille (ylin ja alin arvo, Hillslope, $logIC_{50}$). Lisäksi laskettiin heikosti sitoutuvien aineiden log_{10}RBA suhteessa vertailuestrogeeniin. Nämä tiedot ovat saatavilla positiivisten kontrollien suoritusvaatimuksina. Taulukossa 1 esitetään käyrän sovituksen parametrien odotuksenmukaiset alueet, joita voidaan käyttää suoritusvaatimuksina. Käytännössä IC_{50}-arvon alue voi vaihdella hieman reseptorivalmisteen Kd-arvon ja ligandin pitoisuuden perusteella.

51. Testikemikaalien käyrän sovitusparametreille ei ole laadittu suoritusvaatimuksia, koska mahdollisten testikemikaalien valikoima on hyvin laaja, kuten myös mahdollisten affiniteettien ja tulosten vaihtelu (täysi käyrä, osittainen käyrä, ei käyrän sovitusta). Testikemikaalin jokaisen testiajon tulosten tarkastelussa on käytettävä asiantuntijoita. Testikemikaalista on käytettävä riittävän monta pitoisuutta, jotta kilpailevan käyrän huippu (ts. 90–100 prosentin sitoutuminen) voidaan määrittää selvästi. Rinnakkaisnäytteiden vaihtelun on oltava kohtuullista ja tieteellisesti perusteltavissa testikemikaalin jokaisen pitoisuuden ja kolmen eriaikaisen testiajon osalta. Testikemikaalin kontrollien pitäisi täyttää jokaisessa testiajossa FW-testiä koskevat suoritusvaatimukset, ja niiden tulee olla yhdenmukaiset kunkin laboratorion aiempien kontrollitietojen kanssa.

▼M8

AINEISTON ANALYSOINTI

Saturaatiositoutumisen testi

52. Sekä kokonaissitoutuminen että epäspesifinen sitoutuminen mitataan. Näistä arvoista lasketaan tasapaino-olosuhteissa [^{3}H]-17β-estradiolin suurenevien pitoisuuksien spesifinen sitoutuminen vähentämällä epäspesifinen sitoutuminen kokonaissitoutumisesta. Spesifistä sitoutumista vs. [^{3}H]-17β-estradiolin pitoisuutta kuvaavan käyrän tulisi saavuttaa tasanne suurinta spesifistä sitoutumista kuvaavan arvon kohdalla, joka kuvastaa hrERα:n saturoitumista [^{3}H]-17β-estradiolilla. Lisäksi aineiston analyysissa on dokumentoitava [^{3}H]-17β-estradiolin sitoutuminen yksittäiseen suuren affiniteetin sitoutumiskohtaan. Epäspesifinen, kokonais- ja spesifinen sitoutuminen on esitettävä saturaatiositoutumista kuvaavalla käyrällä. Näiden tietojen tarkemmassa analyysissa on käytettävä epälineaarista regressioanalyysia (esim. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), ja lopulliset tiedot tulee esittää Scatchardin kuvaajalla.

53. Aineiston analyysissa on määritettävä Bmax- ja Kd-arvot pelkästään kokonaissitoutumista koskevista tiedoista ja olettamalla, että epäspesifinen sitoutuminen on lineaarista. Toisenlaisen menetelmän käyttäminen on perusteltava. Lisäksi parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Valittu robustin regression menetelmä on ilmoitettava. Ligandin depleetion korjausta (käyttämällä esimerkiksi Swillensin menetelmää, 1995) on käytettävä aina määritettäessä Bmax- ja Kd-arvoja saturaatiositoutumistiedoista.

Kilpailevan sitoutumisen testi

54. Kilpailevan sitoutumisen käyrä esitetään [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisenä sitoutumisena vs. kilpailijan pitoisuutena (log10-yksiköt). Testikemikaalin se pitoisuus, joka estää 50 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisestä enimmäissitoutumisesta, on IC_{50}-arvo.

55. Positiivisten kontrollien (ts. vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen) log(IC_{50})-arvojen estimaatit on määritettävä käyttämällä asianmukaista epälineaarisen käyrän sovitusohjelmaa, jotta ne sopivat Hillin yhtälön neljään parametriin (esimerkiksi BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Ylin ja alin arvo sekä kulmakerroin ja log(IC_{50}) on yleensä jätettävä rajoittamattomiksi näitä käyriä sovitettaessa. Parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Ligandin depleetion korjausta ei tule käyttää. Alustavan analyysin jälkeen jokainen sitoutumiskäyrä on tarkistettava, jotta se varmasti sopii malliin asianmukaisesti. Heikosti sitoutuvan aineen suhteellinen sitoutumisaffiniteetti (RBA) lasketaan prosenttiosuutena heikosti sitoutuvan aineen log (IC_{50}) -arvosta suhteessa 17β-estradiolin log (IC_{50}) -arvoon. Positiivisten kontrollien ja sitoutumattoman kontrollin tuloksia on arvioitava käyttämällä testin suorituskyvyn mittareita, jotka on esitetty tämän lisäyksen 245–50 kohdassa.

56. Kaikkien testikemikaalien tiedot on analysoitava käyttämällä vaiheittaista lähestymistapaa, jotta varmistetaan, että tiedot analysoidaan asianmukaisesti ja että kukin kilpailevan sitoutumisen käyrä luokitellaan oikein. On suositeltavaa, että testikemikaalin jokaiselle ajolle tehdään aluksi standardoitu aineistoanalyysi, joka on identtinen vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvista aineista koostuvien kontrollien yhteydessä käytetyn analyysin kanssa (ks. 55 kohta edellä). Kun se on tehty, on tehtävä käyrän sovitusparametrien tekninen tarkastus ja tarkastettava silmämääräisesti, miten hyvin tiedot sopivat luotuun kilpailevan sitoutumisen käyrään jokaisesta ajosta. Jos tämän teknisen tarkastuksen aikana tehdään havaintoja, joiden mukaan spesifisesti sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin prosentuaalinen osuus pienenee pitoisuuden mukaan, jokaisen kemikaalipitoisuuden teknisten rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu on vähäistä ja kolmen ajon sovitusparametrit ovat johdonmukaisia, ne ovat hyvä osoitus siitä, että testi ja aineistoanalyysit on tehty asianmukaisesti.

▼**M8**

Tietojen tulkinta

57. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan hrERα:aan sitoutuva aine, jos sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa ja jos vastekäyrän alin piste tietojen vaihteluvälin alueella on 50 prosentin alapuolella (kuva 1).

58. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan hrERα:aan sitoutumaton aine, jos

— sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa ja sovitetun vastekäyrän alin piste tietojen vaihteluvälin alueella on 75 prosentin alapuolella, tai

— sitoutumiskäyrää ei voida sovittaa ja alin tasoitettu keskimääräinen prosentuaalinen sitoutuminen aineiston pitoisuusryhmissä on 75 prosentin yläpuolella

59. Testikemikaalit katsotaan epäselviksi, jos kumpikaan edellä esitetyistä ehdoista ei täyty (ts. jos sovitetun vastekäyrän alin piste on 76–51 prosentin välillä).

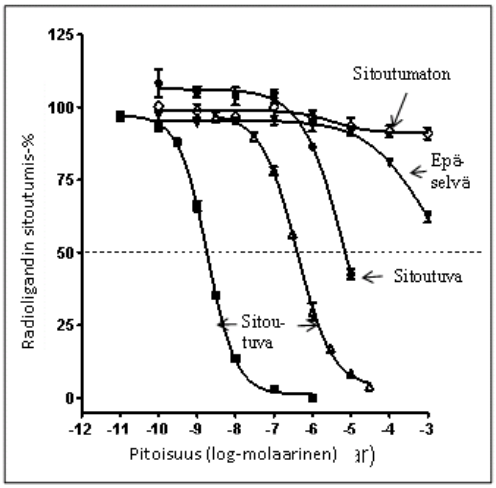
Taulukko 7

Luokitteluperusteet testikemikaalin kilpailevan sitoutumiskäyrän perusteella

Luokittelu	Perusteet
Sitoutuva[a]	Sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa. **Vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 50 prosentin alapuolella**.
Sitoutumaton[b]	Jos sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa, **sovitetun vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 75 prosentin yläpuolella**. Jos sitoutumiskäyrää ei voida sovittaa, **alin tasoitettu keskimääräinen prosentuaalinen sitoutuminen aineiston pitoisuusryhmissä on 75 prosentin yläpuolella.**
Epäselvä[c]	Mikä tahansa testiaine, joka ei ole sitoutuva eikä sitoutumaton aine (esim. sovitetun vastekäyrän alin piste on 76–51 prosentin välillä).

Kuva 1

Esimerkkejä testikemikaalin luokittelusta kilpailevan sitoutumiskäyrän perusteella



▼**M8**

60. Laboratoriossa testikemikaalista tehdyt useat ajot yhdistetään antamalla jokaiselle ajolle numeeriset arvot ja laskemalla ajojen keskiarvot taulukossa 8 osoitetun mukaisesti. Jokaisen laboratorion yhdistettyjen ajojen tuloksia verrataan jokaisen testikemikaalin odotuksenmukaiseen luokitukseen.

Taulukko 8

Yhdessä laboratoriossa tehtyihin useisiin ajoihin perustuva menetelmä testikemikaalin luokitteluun

Arvon antaminen jokaiselle ajolle:	
Luokittelu	**Numeerinen arvo**
Sitoutuva	2
Epäselvä	1
Sitoutumaton	0
Luokittelu ajojen numeerisen arvon keskiarvon perusteella:	
Luokittelu	**Numeerinen arvo**
Sitoutuva	Keskiarvo ≥ 1,5
Epäselvä	0,5 ≤ keskiarvo < 1,5
Sitoutumaton	Keskiarvo< 0,5

TESTIRAPORTTI

61. Ks. 24 kohta kappaleesta ”h**rER-SITOUTUMISTESTIN OSAT**” tämän testimenetelmän osalta.

▼**M8**

Lisäys 2.1

SANASTO

[^{3}H]E2: Tritiumilla radioleimattu 17β-estradioli

DCC: Dekstraanilla pinnoitettu hiili

E_2: Leimaamaton 17β-estradioli (inertti)

Testipuskuri: 10 mM Tris, 10 mg naudan seerumin albumiinia / ml, 2 mM DTT:tä, 10 prosenttia glyserolia, 0,2 mM leupeptiiniä, pH 7,5

hrERα: Ihmisen rekombinantti estrogeenireseptori alfa

Rinnakkaisnäyte: Yksi monesta kuopasta, joiden sisällöt ja pitoisuudet ovat samat ja jotka testataan samaan aikaan yhdessä ajossa. Tässä protokollassa jokainen testikemikaalin pitoisuus testataan kolmella rinnakkaisnäytteellä. Tämä tarkoittaa sitä, että testikemikaalin jokaisesta pitoisuudesta on kolme rinnakkaisnäytettä, jotka testataan samaan aikaan.

Testiajo: Täydellinen sarja samaan aikaan testattavia mikrotiitterilevyjen testikuoppia, joista saadaan kaikki tarvittavat tiedot, joilla voidaan luonnehtia testikemikaalin sitoutumista hrERα:aan (ts. testikuoppaan lisätty [^{3}H]-17β-estradioli kokonaisuudessaan, [^{3}H]-17β-estradiolin enimmäissitoutuminen hrERα:aan, epäspesifinen sitoutuminen ja kokonaissitoutuminen testikemikaalin eri pitoisuuksilla). Testiajossa voidaan käyttää sekä yhtä että useaa testikuoppaa (ts. rinnakkaisnäytettä) pitoisuutta kohti, mutta koska tässä protokollassa edellytetään, että rinnakkaisnäytteitä on kolme, yksi ajo koostuu kolmesta testikuopasta pitoisuutta kohti. Lisäksi tässä protokollassa edellytetään, että yhtä kemikaalia kohti tehdään kolme itsenäistä (eli eriaikaista) ajoa.

▼**M8**

Lisäys 2.2

TYYPILLINEN [^{3}H]-17B-ESTRADIOLIN SATURAATIOTESTI KOLMELLA RINNAKKAISNÄYTEKUOPALLA

Tyypillinen [3H]-17β-estradiolin saturaatiotesti kolmella rinnakkaisnäytekuopalla

Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppikoodi	Radioakt. E2:n alkupitoisuus (nM)	Radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Radioakt. E2:n loppupitoisuus (nM)	Ei-radioakt. E2:n alkupitoisuus (uM)	Ei-radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Ei-radioakt. E2:n loppupitoisuus (uM)	Puskurin tilavuus (µl)	Reseptorin tilavuus (µl)	Kuoppien kokonaistilavuus
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

▼**M8**

Tyypillinen [3H]-17β-estradiolin saturaatiotesti kolmella rinnakkaisnäytekuopalla

Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppikoodi	Radioakt. E2:n alkupitoisuus (nM)	Radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Radioakt. E2:n loppupitoisuus (nM)	Ei-radioakt. E2:n alkupitoisuus (uM)	Ei-radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Ei-radioakt. E2:n loppupitoisuus (uM)	Puskurin tilavuus (µl)	Reseptorin tilavuus (µl)	Kuoppien kokonaistilavuus
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

▼**M8**

Tyypillinen [3H]-17β-estradiolin saturaatiotesti kolmella rinnakkaisnäytekuopalla

Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppikoodi	Radioakt. E2:n alkupitoisuus (nM)	Radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Radioakt. E2:n loppupitoisuus (nM)	Ei-radioakt. E2:n alkupitoisuus (uM)	Ei-radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Ei-radioakt. E2:n loppupitoisuus (uM)	Puskurin tilavuus (µl)	Reseptorin tilavuus (µl)	Kuoppien kokonaistilavuus
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Radioakt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Radioakt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Radioakt.	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Radioakt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Radioakt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Radioakt.	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Radioakt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Radioakt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Radioakt.	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Radioakt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Radioakt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Radioakt.	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40

▼M8

Tyypillinen [3H]-17β-estradiolin saturaatiotesti kolmella rinnakkaisnäytekuopalla

Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppikoodi	Radioakt. E2:n alkupitoisuus (nM)	Radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Radioakt. E2:n loppupitoisuus (nM)	Ei-radioakt. E2:n alkupitoisuus (uM)	Ei-radioakt. E2:n tilavuus (µl)	Ei-radioakt. E2:n loppupitoisuus (uM)	Puskurin tilavuus (µl)	Reseptorin tilavuus (µl)	Kuoppien kokonaistilavuus
H1	1	Radioakt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Radioakt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Radioakt.	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Radioakt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Radioakt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Radioakt.	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Radioakt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Radioakt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Radioakt.	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Radioakt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Radioakt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Radioakt.	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Huomaa, että radioaktiiviset kuopat ovat tyhjiä inkuboinnin aikana. 40 µl lisätään vain tuikelaskentaa varten.

▼**M8**

Lisäys 2.3

KILPAILEVAN SITOUTUMISEN TESTIKUOPPIEN JÄRJESTYS

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	A1	1	kokonaissi-toutuminen	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	kokonaissi-toutuminen	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	kokonaissi-toutuminen	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	kokonaissi-toutuminen	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	kokonaissi-toutuminen	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	kokonaissi-toutuminen	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A8	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A9	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A10	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A11	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	A12	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	B1	1	ei-r-akt. E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B2	2	ei-r-akt. E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B3	3	ei-r-akt. E2	S	S1	2,00E-07	40	—	40	80	160	1,0E-07
S	B4	1	ei-r-akt. E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	B5	2	ei-r-akt. E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B6	3	ei-r-akt. E2	S	S2	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	B7	1	ei-r-akt. E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B8	2	ei-r-akt. E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B9	3	ei-r-akt. E2	S	S3	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	B10	1	ei-r-akt. E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B11	2	ei-r-akt. E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	B12	3	ei-r-akt. E2	S	S4	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	C1	1	ei-r-akt. E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C2	2	ei-r-akt. E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C3	3	ei-r-akt. E2	S	S5	6,00E-10	40	—	40	80	160	3,0E-10
S	C4	1	ei-r-akt. E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C5	2	ei-r-akt. E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C6	3	ei-r-akt. E2	S	S6	2,00E-10	40	—	40	80	160	1,0E-10
S	C7	1	ei-r-akt. E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C8	2	ei-r-akt. E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	C9	3	ei-r-akt. E2	S	S7	2,00E-11	40	—	40	80	160	1,0E-11
S	C10	1	tyhjä	tyhjä	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	tyhjä	tyhjä	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	tyhjä	tyhjä	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Noretinodreli	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D2	1	Noretinodreli	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D3	1	Noretinodreli	NE	WP1	6,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	D4	1	Noretinodreli	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D5	1	Noretinodreli	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D6	1	Noretinodreli	NE	WP2	2,00E-05	40	—	40	80	160	1,0E-05
S	D7	1	Noretinodreli	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D8	1	Noretinodreli	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D9	1	Noretinodreli	NE	WP3	6,00E-06	40	—	40	80	160	3,0E-06
S	D10	1	Noretinodreli	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D11	1	Noretinodreli	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	D12	1	Noretinodreli	NE	WP4	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	E1	1	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E2	2	Noretinodreli	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E3	3	Noretinodreli	NE	WP	6.00E-07	40		40	80	160	3,0E-07
S	E4	1	Noretinodreli	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E5	2	Noretinodreli	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E6	3	Noretinodreli	NE	WP	2,00E-07	40		40	80	160	1,0E-07
S	E7	1	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	E8	2	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E9	3	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-08	40	—	40	80	160	3,0E-08
S	E10	1	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E11	2	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	E12	3	Noretinodreli	NE	WP	6,00E-09	40	—	40	80	160	3,0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,00E-03	40	—	40	80	160	1,0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,00E-04	40	—	40	80	160	1,0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,00E-05	40	—	40	80	160	3,0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,00E-07	40	—	40	80	160	3,0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,00E-08	40	—	40	80	160	1,0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,00E-09	40	—	40	80	160	1,0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,00E-10	40	—	40	—	160	1,0E-10
S	H1	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	Radioakt.	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Puskurikont-rolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Puskurikont-rolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Puskurikont-rolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Puskurikont-rolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Puskurikont-rolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Puskurikont-rolli	BC	BC	—	40	80	40	—	160	—

Huomaa, että radioaktiiviset kuopat ovat tyhjiä inkuboinnin aikana. 40 µl lisätään vain tuikelaskentaa varten.

▼M8

Kilpailevan sitoutumisen testikuoppien järjestys												
Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	A1	1	kokonaissitoutuminen	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	kokonaissitoutuminen	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A8	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A9	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A10	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A11	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	A12	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S0	2,00E-06	40	—	40	80	160	1,0E-06
P1	B1	1	Testikemikaali 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B2	2	Testikemikaali 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B3	3	Testikemikaali 1	TC1	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	B4	1	Testikemikaali 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B5	2	Testikemikaali 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B6	3	Testikemikaali 1	TC1	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	B7	1	Testikemikaali 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B8	2	Testikemikaali 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B9	3	Testikemikaali 1	TC1	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	B10	1	Testikemikaali 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B11	2	Testikemikaali 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	B12	3	Testikemikaali 1	TC1	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Kilpailevan sitoutumisen testikuoppien järjestys												
Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	C1	1	Testikemikaali 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C2	2	Testikemikaali 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C3	3	Testikemikaali 1	TC1	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	C4	1	Testikemikaali 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C5	2	Testikemikaali 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C6	3	Testikemikaali 1	TC1	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	C7	1	Testikemikaali 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C8	2	Testikemikaali 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C9	3	Testikemikaali 1	TC1	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	C10	1	Testikemikaali 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C11	2	Testikemikaali 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	C12	3	Testikemikaali 1	TC1	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	D1	1	Testikemikaali 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D2	2	Testikemikaali 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D3	3	Testikemikaali 2	TC2	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	D4	1	Testikemikaali 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D5	2	Testikemikaali 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D6	3	Testikemikaali 2	TC2	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	D7	1	Testikemikaali 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D8	2	Testikemikaali 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D9	3	Testikemikaali 2	TC2	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	D10	1	Testikemikaali 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D11	2	Testikemikaali 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	D12	3	Testikemikaali 2	TC2	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼M8

Kilpailevan sitoutumisen testikuoppien järjestys												
Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	E1	1	Testikemikaali 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E2	2	Testikemikaali 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E3	3	Testikemikaali 2	TC2	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	E4	1	Testikemikaali 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E5	2	Testikemikaali 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E6	3	Testikemikaali 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	E7	1	Testikemikaali 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E8	2	Testikemikaali 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E9	3	Testikemikaali 2	TC2	7	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	E10	1	Testikemikaali 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E11	2	Testikemikaali 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	E12	3	Testikemikaali 2	TC2	8	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	F1	1	Testikemikaali 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F2	2	Testikemikaali 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F3	3	Testikemikaali 3	TC3	1	2,00E-03	40	0	40	80	160	1,0E-03
P1	F4	1	Testikemikaali 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F5	2	Testikemikaali 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F6	3	Testikemikaali 3	TC3	2	2,00E-04	40	0	40	80	160	1,0E-04
P1	F7	1	Testikemikaali 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F8	2	Testikemikaali 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F9	3	Testikemikaali 3	TC3	3	2,00E-05	40	0	40	80	160	1,0E-05
P1	F10	1	Testikemikaali 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F11	2	Testikemikaali 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06
P1	F12	3	Testikemikaali 3	TC3	4	2,00E-06	40	0	40	80	160	1,0E-06

▼**M8**

Kilpailevan sitoutumisen testikuoppien järjestys

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varasto (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	G1	1	Testikemikaali 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G2	2	Testikemikaali 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G3	3	Testikemikaali 3	TC3	5	2,00E-07	40	0	40	80	160	1,0E-07
P1	G4	1	Testikemikaali 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G5	2	Testikemikaali 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G6	3	Testikemikaali 3	TC3	6	2,00E-08	40	0	40	80	160	1,0E-08
P1	G7	1	Testikemikaali 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G8	2	Testikemikaali 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G9	3	Testikemikaali 3	TC3	7	2,00E-09	40	0	40	80	160	1,0E-09
P1	G10	1	Testikemikaali 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G11	2	Testikemikaali 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	G12	3	Testikemikaali 3	TC3	8	2,00E-10	40	0	40	80	160	1,0E-10
P1	H1	1	Noretinodreli	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Noretinodreli	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Noretinodreli	NE		IC50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Noretinodreli	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Noretinodreli	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Noretinodreli	NE		1,00E-4,5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	ei-r-akt. E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	ei-r-akt. E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	ei-r-akt. E2 S			IC50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	ei-r-akt. E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	ei-r-akt. E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	ei-r-akt. E2 S			1,00E-7	40	0	40	80	160	

▼**M8**

Lisäys 3

ESTROGEENIRESEPTORIIN SITOUTUMISTA KÄSITTELEVÄ CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTEN (CERI) *IN VITRO* -TESTI, JOSSA KÄYTETÄÄN IHMISEN REKOMBINANTIN ESTROGEENIRESEPTORI ALFAN LIGANDIA SITOVAA PROTEIININ DOMEENIA

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

1. Tässä estrogeenireseptorin (ERα) saturaatiota ja kilpailevaa sitoutumista käsittelevässä testissä käytetään ihmisen ERα:n (hrERα) ligandia sitovaa domeenia (LBD). Tämän proteiinimallin tuottaja on japanilainen Chemicals Evaluation Research Institute (CERI). Se on saatavana glutationi-S-transferaasi (GST) -fuusioproteiinina, ja se ilmentyy *E. coli* -bakteerissa. CERIn kehittämälle tutkimusprotokollalle tehtiin kansainvälinen monen laboratorion suorittama validointitutkimus (2), joka osoitti, että se on merkityksellinen ja luotettava testin käyttötarkoituksen kannalta.

2. Tämä testi on sellaisten aineiden tunnistamiseen tarkoitettu seulontamenettely, jotka voivat sitoutua hrERα:aan. Sillä määritetään testikemikaalin kyky kilpailla 17β-estradiolin kanssa hrERα-LBD:hen sitoutumisesta. Kvantitatiivisia testituloksia voivat olla esimerkiksi IC_{50} (testikemikaalin se pitoisuus, joka tarvitaan siihen, että puolet [^{3}H]-17β-estradiolista syrjäytetään hrERα:sta) ja testikemikaalin suhteelliset sitoutumisaffiniteetit hrERα:aan 17β-estradioliin verrattuna. Kemikaalien seulonnassa hyväksyttäviä laadullisia tuloksia voivat olla testikemikaalien luokittelut joko hrERα:aan sitoutuviksi tai sitoutumattomiksi aineiksi tai epäselviksi sitoutumiskäyriä koskevien kriteerien perusteella.

3. Testissä käytetään radioaktiivista ligandia, mikä edellyttää laboratoriolta radioaktiivisten materiaalien käyttölupaa. Kaikissa menettelyissä, joissa käytetään radioisotooppeja ja vaarallisia kemikaaleja, on noudatettava kansallisen lainsäädännön määräyksiä ja menettelyjä.

4. Kohdat ”**YLEISJOHDANTO**” ja ”**IHMISEN REKOMBINANTTIIN ESTROGEENIRESEPTORIIN SITOUTUMISTA TARKASTELEVAN TESTIN OSAT**” on luettava ennen kuin tätä testiä käytetään sääntelytarkoituksiin. Tässä testiohjeessa käytetyt määritelmät ja lyhenteet esitetään lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATTEET (KS. MYÖS YLEISJOHDANTO)

5. Ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptori alfaan (hrERα) sitoutumista tarkastelevassa testissä mitataan radioleimatun ligandin ([^{3}H]17β-estradioli) kykyä sitoutua estrogeenireseptoriin testikemikaalin (eli kilpailijan) suurenevien pitoisuuksien yhteydessä. Testikemikaalit, joilla on voimakas affiniteetti estrogeenireseptoriin, kilpailevat radioleimatun ligandin kanssa pienemmällä pitoisuudella kuin ne kemikaalit, joiden affiniteetti reseptoriin on heikompi.

6. Tässä testissä on kaksi keskeistä osaa: saturaatiositoutumiskoe, jolla luonnehditaan reseptorin ja ligandin yhteisvaikutuksen parametreja, ja kilpaileva sitoutumiskoe, jolla luonnehditaan testikemikaalin ja radioleimatun ligandin kilpailua estrogeenireseptoriin sitoutumisessa.

▼M8

7. Saturaatiositoutumiskokeen tarkoituksena on luonnehtia tietyn reseptorien erän sitoutumisaffiniteettia ja määrää kilpailevaa sitoutumista tarkastelevan kokeen valmistelussa. Saturaatiositoutumiskokeessa mitataan tasapaino-olosuhteissa kiinteän estrogeenireseptoripitoisuuden affiniteettia sen luonnolliseen ligandiin nähden (esitettynä dissosiaatiovakiolla, Kd) ja aktiivisten reseptorikohtien tiheyttä (Bmax).

8. Kilpailevassa sitoutumiskokeessa mitataan aineen affiniteettia kilpailla [^{3}H]17β-estradiolin kanssa estrogeenireseptoriin sitoutumisessa. Affiniteetti kvantifioidaan sellaisella testikemikaalin pitoisuudella, joka tasapaino-olosuhteissa estää 50 prosenttia [^{3}H]17β-estradiolin spesifisestä sitoutumisesta (”50 prosenttia estävä pitoisuus” tai IC_{50}). Tätä voidaan arvioida käyttämällä myös suhteellista sitoutumisaffiniteettia (RBA, suhteessa estradiolin IC_{50}-arvoon, joka on mitattu erikseen samassa ajossa). Kilpailevassa sitoutumiskokeessa mitataan [^{3}H]17β-estradiolin sitoutumista kiinteänä pitoisuutena samalla, kun läsnä on laaja kirjo (kahdeksan suuruusluokkaa) testikemikaalipitoisuuksia. Sen jälkeen tiedot sovitetaan, mikäli mahdollista, siten, että voidaan muodostaa Hillin yhtälö (Hill, 1910), jolla kuvataan sitä, miten yhdessä paikassa oleva kilpaileva sitoutuva aine syrjäyttää radioligandin. Sitä, missä määrin radioleimattu estradioli syrjäytetään, käytetään testikemikaalin luonnehtimisessa sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi tai epäselvän vasteen tuottavaksi.

MENETTELY

hrERα-proteiinin hyväksyttävän suorituskyvyn osoittaminen

9. Ennen kuin saturaatiositoutumistestiä ja kilpailevan sitoutumisen testiä aletaan käyttää rutiininomaisesti, on osoitettava, että jokainen uusi hrERα-erä toimii asianmukaisesti siinä laboratoriossa, jossa sitä käytetään. Suorituskyky osoitetaan kaksivaiheisella menettelyllä. Nämä vaiheet ovat seuraavat:

— Tehdään [3H]-17β-estradiolin sitoutumistesti, jolla osoitetaan hrERα-spesifisyys ja saturaatio. Näiden tietojen epälineaarisella regressioanalyysilla (esim. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) ja sen jälkeen tehtävällä Scatchardin kuvaajalla osoitetaan [3H]-17β-estradiolin sitoutumisaffiniteetti hrERα:aan (Kd) ja reseptorien määrä (Bmax) tietyssä hrERα-erässä.

— Tehdään kilpailevaa sitoutumista tarkasteleva testi käyttämällä kontrolliaineita (vertailuestrogeeni (17β-estradioli), heikosti sitoutuva aine (esimerkiksi noretinodreli tai noretindroni) ja sitoutumatonta ainetta (oktyylitrietoksisilaani, OTES). Jokaisen laboratorion on luotava aiemmista tiedoista koostuva tietokanta, jolla dokumentoidaan IC50-arvojen ja muiden oleellisten arvojen yhdenmukaisuus vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen osalta eri kokeissa ja eri hrERα-erissä. Lisäksi kontrolliaineiden kilpailevan sitoutumisen käyrien parametrien on oltava 95 prosentin luottamusvälin rajoissa (ks. taulukko 1). Nämä raja-arvot on laadittu tämän testin validointitutkimukseen osallistuneista laboratorioista saatujen tietojen perusteella (2).

Taulukko 1

Vertailuestrogeenille ja heikosti sitoutuvalle aineelle kehitetyt suorituskykyvaatimukset (CERI hrER -sitoutumistesti)

Aine	Parametri	Keskiarvo [a]	Keskihajonta (n)	95 %:n luottamusvälit [b]	
				Alaraja	Yläraja
17β-estradioli	Ylin	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Alin	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43

▼M8

Aine	Parametri	Keskiarvo (a)	Keskihajonta (n)	95 %:n luottamusvälit (b)	
				Alaraja	Yläraja
	HillSlope	–1,22	0,20 (70)	–1,27	–1,17
	$LogIC_{50}$	–8,93	0,23 (70)	–8,98	–8,87
Noretinodreli	Ylin	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Alin	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	HillSlope	–1,04	0,21 (68)	–1,09	–0,99
	$LogIC_{50}$	–6,19	0,40 (68)	–6,29	–6,10
Noretindroni (c)	Ylin	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Alapuoli	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillslope	–1,18	0,32 (23)	–1,31	–1,04
	$LogIC_{50}$	–6,01	0,54 (23)	–6,25	–5,78

(a) Keskiarvo (n) ± keskihajonta (SD) (otoskoko n) laskettiin käyttämällä käyrän sovituksen estimaatteja (neljän parametrin Hillin yhtälö) kontrolliajoista, jotka tehtiin neljässä laboratoriossa validointitutkimuksen aikana (ks. lähdeviitteen 2 liite N).

(b) 95 prosentin luottamusvälit on tarkoitettu ohjeeksi hyväksymisperusteiden soveltamiseen.

(c) Noretindronin testaus oli valinnaista validointitutkimuksen alatehtävä 4:ssä (ks. lähdeviite 2, alatehtävä 4). Keskiarvo ± SD (n) laskettiin siis käyttämällä käyrän sovituksen estimaatteja (neljän parametrin Hillin yhtälö) kontrolliajoista, jotka tehtiin kahdessa laboratoriossa.

IC_{50}-arvon vaihteluväliin vaikuttaa kussakin laboratoriossa käytetyn reseptorivalmisteen Kd ja radioleimatun ligandin pitoisuus. IC_{50}-arvon vaihteluvälin asianmukainen mukautus testin tekemisessä käytettyjen olosuhteiden perusteella on hyväksyttävää.

Laboratorion pätevyyden osoittaminen

10. Ks. 17 ja 18 kohta ja taulukko 2 kappaleesta ”**hrER-SITOUTUMISTESTIN OSAT**” tämän testimenetelmän osalta. Kummassakin testissä (saturaatiositoutumisen ja kilpailevan sitoutumisen testissä) pitää olla kolme itsenäistä testiajoa (ts. tuoreilla reseptori-, kemikaali- ja reagenssilaimennoksilla), jotka tehdään eri päivinä, ja jokaisessa testiajossa on oltava kolme rinnakkaisnäytettä.

Reseptorin (hrERα) pitoisuuden määrittäminen

11. Aktiivisen reseptorin pitoisuus vaihtelee jonkin verran erän ja säilytysolosuhteiden mukaan. Tämän vuoksi toimittajalta saadun aktiivisen reseptorin pitoisuus on määritettävä. Näin varmistetaan, että aktiivisen reseptorin pitoisuus on testiajossa asianmukainen.

12. Kilpailevaa sitoutumista vastaavissa olosuhteissa (ts. 0,5 nM [^{3}H]-estradiolia) reseptorista on inkuboitava 0,1, 0,2, 0,4 ja 0,6 nM:n nimellispitoisuudet ilman (kokonaissitoutuminen) 1 µM:n pitoisuutta leimaamatonta estradiolia ja sen kanssa (epäspesifi sitoutuminen). Spesifinen sitoutuminen, joka lasketaan

▼M8

kokonais- ja epäspesifin sitoutumisen erotuksena, esitetään suhteessa reseptorin nimellispitoisuuteen. Reseptorin pitoisuus, josta saatavat spesifiset sitoutumisarvot ovat 40 prosenttia lisätystä radioleimatusta aineesta, suhteutetaan vastaavaan reseptorin pitoisuuteen, joka on se reseptorin pitoisuus, jota pitää käyttää saturaatiositoutumisen ja kilpailevan sitoutumisen kokeissa. Tämän ehdon täyttää usein lopullinen hrER:n pitoisuus 0,2 nM.

13. Jos 40 prosentin ehtoa ei voida täyttää toistuvasti, koejärjestely on tarkistettava mahdollisten virheiden varalta. Jos 40 prosentin ehtoa ei voida täyttää, se voi olla merkki siitä, että rekombinanttierässä on hyvin vähän aktiivista reseptoria. Tällöin on syytä harkita toisen reseptorierän käyttämistä.

Saturaatiotesti

14. Tässä testissä on arvioitava kahdeksan suurenevaa pitoisuutta [^{3}H]17β-estradiolista kolmena rinnakkaisnäytteenä seuraavan kolmen ehdon mukaisesti (ks. taulukko 2):

a. Ilman leimaamatonta 17β-estradiolia ja estrogeenireseptorin kanssa. Tässä määritetään kokonaissitoutuminen määrittämällä radioaktiivisuus niissä kuopissa, joissa on vain [^{3}H]17β-estradiolia.

b. Leimattuun 17β-estradioliin nähden 2000 kertaa suuremman leimaamattoman 17β-estradiolipitoisuuden ja estrogeenireseptorin kanssa. Tämän ehdon tarkoituksena on saturoida aktiiviset sitoutumiskohdat leimaamattomalla 17β-estradiolilla ja määrittää epäspesifinen sitoutuminen mittaamalla kuoppien radioaktiivisuus. Mahdollisen jäljellä olevan radioaktiivisen estradiolin, joka voi sitoutua reseptoriin, katsotaan sitoutuvan epäspesifiseen kohtaan, koska ei-radioaktiivista estradiolia pitäisi olla niin suuri pitoisuus, että se sitoutuu kaikkiin saatavilla oleviin spesifisiin kohtiin reseptorissa.

c. Ilman leimaamatonta 17β-estradiolia ja ilman estrogeenireseptoria (kokonaisradioaktiivisuuden määrittäminen).

[^{3}H]-17β-estradiolia, leimaamatonta 17β-estradiolia ja hrERα:aa sisältävien liuosten valmistaminen

15. [^{3}H]-17β-estradiolista on valmistettava 40 nM:n liuos 1 μM:n varastoliuoksesta [^{3}H]-17β-estradiolia DMSO:ssa lisäämällä DMSO:ta (200 nM:n valmistamiseksi) ja testipuskuria huoneenlämpötilassa (40 nM:n valmistamiseksi). Tätä 40 nM:n liuosta käyttämällä valmistetaan [^{3}H]-17β-estradiolista laimennokset, joiden pitoisuus vaihtelee välillä 0,313 nM ja 40 nM, testipuskurilla huoneenlämpötilassa (taulukon 2 rivin 12 mukaisesti). Lopulliset testipitoisuudet (0,0313–4,0 nM) saadaan lisäämällä 10 μl näistä liuoksista 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn asianmukaisiin kuoppiin (ks. taulukot 2 ja 3). Testipuskurin valmistaminen, [^{3}H]-17β-estradiolia sisältävän alkuperäisen varastoliuoksen spesifisen aktiivisuuden laskeminen sekä laimennosten valmistaminen ja pitoisuuksien määrittäminen on selostettu CERI-testin protokollassa (2).

16. Leimaamatonta 17β-estradiolia sisältävien liuosten laimennokset on valmistettava 1 nM:n 17β-estradiolivarastoliuoksesta lisäämällä testipuskuria siten, että saadaan kahdeksan suurenevaa pitoisuutta välillä 0,625 μM ja 80 μM. Lopulliset testipitoisuudet (0,0625–8 nM) saadaan lisäämällä 10 μl näistä liuoksista 96-kuoppaisen mikrotiitterilevyn niihin kuoppiin, jotka on tarkoitettu epäspesifisen sitoutumisen mittaamiseen (ks. taulukot 2 ja 3). Leimaamattomien 17β-estradiolilaimennosten valmistaminen on selostettu perusteellisesti CERI-testin protokollassa (2).

▼**M8**

17. Testissä on käytettävä sellaista reseptoripitoisuutta, jolla spesifiseksi sitoutumiseksi saadaan 40±10 prosenttia (ks. 12 ja 13 kohta). hrERα-liuos on valmistettava jääkylmästä testipuskurista juuri ennen käyttöä eli vasta sen jälkeen, kun kaikki kokonaissitoutumista, epäspesifiä sitoutumista ja pelkästään radioaktiivista ligandia sisältävät kuopat on täytetty.

18. 96-kuoppaiset mikrotiitterilevyt valmistellaan taulukossa 2 kuvatun mukaisesti kolmella rinnakkaisnäytteellä yhtä [^{3}H]-17β-estradiolin pitoisuutta kohti. Taulukossa 3 esitetään, miten [^{3}H]-17β-estradiolin, leimaamattoman 17β-estradiolin, puskurin ja reseptorin määrä määritetään.

Taulukko 2

Mikrotiitterilevyn järjestys saturaatiositoutumistestissä

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	TB:n mittaukseen			NSB:n mittaukseen			Pelkän radioakt. ligandin määritykseen				Leimaamattomat E2-laimennokset levyn sarakkeissa 4–6	[3H]E2-laimennokset levyn sarakkeissa 1–9
A	0,0313 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,0313 nM [3H] E2+ 0,0625 μM E2+ ER			0,0313 nM				0,625 μM	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,0625 nM [3H] E2+ 0,125 μM E2+ ER			0,0625 nM				1,25 μM	0,625 nM
C	0,125 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,125 nM [3H] E2+ 0,25 μM E2+ ER			0,125 nM				2,5 μM	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3}H] E_2+ ER			0,250 nM [3H] E2+ 0,5 μM E2+ ER			0,250 nM				5 μM	2,5 nM
E	0,50 nM [H] E_2+ ER			0,50 nM [3H] E2+ 1 μM E2+ ER			0,50 nM				10 μM	5 nM
F	1,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			1,00 nM [3H] E2+ 2 μM E2+ ER			1,00 nM				20 μM	10 nM
G	2,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			2,00 nM [3H] E2+ 4 μM E2+ ER			2,00 nM				40 μM	20 nM
H	4,00 nM [^{3}H] E_2+ ER			4,00 nM [3H] E2+ 8 μM E2+ ER			4,00 nM				80 μM	40 nM

TB: kokonaissitoutuminen,
NSB: epäspesifinen sitoutuminen
[^{3}H] E_2: [^{3}H]17β-estradioli
E2: leimaamaton 17β-estradioli
(*) Tässä ilmoitetut pitoisuudet ovat jokaisen kuopan loppupitoisuuksia
(**) Leimaamattoman E2:n ja [^{3}H]E2:n laimennokset voidaan valmistaa eri levyllä.

▼**M8**

Taulukko 3

Saturaatiomikrotiitterilevyn reagenssitilavuudet

Rivinumero		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Valmisteluvaiheet		TB-kuopat			NSB-kuopat			Pelkkä radioakt. ligandi		
Yllä olevien reaktiokuoppien osien tilavuus ja lisäysjärjestys	Puskuri	60 µl			50 µl			90 µl		
	leimaamaton E2 taulukon 2 riviltä 11	–			10 µl			–		
	[3H]E2 taulukon 2 riviltä 12	10 µl			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			–		
Kokonaisreaktiotilavuus		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubointi		**KAHDEN TUNNIN INKUBAATIOREAKTION JÄLKEEN**						Radioaktiivisuuden kvantifiointi heti valmistuksen jälkeen. Ei inkubointia		
Käsittely 0,4-prosenttisella DCC:llä		Kyllä			Kyllä			**Ei**		
0,4-pros. DCC:n tilavuus		100 µl			100 µl			-		
Suodatus		Kyllä			Kyllä			Ei		
DPM-ARVOJEN MITTAUS										
Tuikeliuokseen lisätty tilavuus kvantifiointia varten		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Jos dpm-arvojen mittauksessa käytetään mikrolevyjen nestetuikelaskuria, pelkkää radioaktiivista ligandia ei tule lisätä samalle levylle TB- ja NSB-kuoppien kanssa. Pelkkä radioaktiivinen ligandi on laitettava eri levylle.

(**) Jos DCC:n erottamiseen käytetään sentrifugia, 50 µl supernatanttia on mitattava nestetuikelaskurilla, jotta vältetään DCC:n kontaminoituminen.

19. Kokonaissitoutumisen ja epäspesifisen sitoutumisen määrittämiseen tarkoitettuja testin mikrotiitterilevyjä on inkuboitava kaksi tuntia huoneenlämpötilassa (22–28 °C).

hrERα:aan sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin mittaaminen

20. Kahden tunnin inkuboinnin jälkeen hrERα:aan sitoutunut [^{3}H]-17β-estradioli on erotettava vapaasta [^{3}H]-17β-estradiolista lisäämällä kuoppiin 100 µl jääkylmää 0,4-prosenttista DCC-suspensiota. Sen jälkeen levyt on asetettava jään päälle 10 minuutiksi, ja reaktioseos ja DCC-suspensio on suodatettava mikrotiitterilevyn suodattimella DCC:n poistamiseksi. Sen jälkeen nestetuikelaskentaputkissa olevaan tuikenesteeseen on lisättävä 100 µl filtraattia ja on määritettävä nestetuikelaskennalla, montako hajoamista minuutissa (dpm-arvot) kussakin putkessa tapahtuu.

▼M8

21. Jos mikrolevyn suodatinta ei ole saatavilla, DCC voidaan poistaa myös sentrifugoimalla. Kuopista on otettava 50 µl supernatanttia, joka sisältää hrERα:aan sitoutunutta [^{3}H]-17β-estradiolia, erittäin varovasti, jotta kuopat eivät kontaminoidu joutumalla kosketuksiin DCC:n kanssa, ja tämä määrä on käytettävä tuikelaskennassa.

22. Pelkkä radioaktiivinen ligandi -ehtoa käytetään määrittämään, montako hajoamista minuutissa (dpm-arvo) testikuoppiin lisätyssä [^{3}H]-17β-estradiolissa on. Radioaktiivisuus on määritettävä heti valmistamisen jälkeen. Näitä kuoppia ei tule inkuboida eikä käsitellä DCC-suspensiolla, vaan niiden sisältö on siirrettävä suoraan tuikenesteeseen. Näillä mittauksilla osoitetaan, paljonko [^{3}H]-17β-estradiolia dpm:issä lisättiin kaikkiin kokonaissitoutumista ja epäspesifiä sitoutumista mittaaviin kuoppiin.

Kilpailevan sitoutumisen testi

23. Kilpailevan sitoutumisen testissä mitataan yhden [^{3}H]-17β-estradiolipitoisuuden sitoutumista samaan aikaan suurenevien testikemikaalipitoisuuksien kanssa. Jokaisesta pitoisuudesta on oltava kolme rinnakkaisnäytettä yhdessä testiajossa. Lisäksi on tehtävä kolme eriaikaista testiajoa jokaisesta testikemikaalista. Testi on tehtävä yhdellä tai useammalla 96-kuoppaisella mikrotiitterilevyllä.

Kontrollit

24. Testiä tehtäessä jokaiseen kokeeseen tulee sisältyä samanaikainen liuotinkontrolli ja muut kontrollit (ts. vertailuestrogeeni, heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine). Vertailuestrogeenin ja kontrollien (ts. heikosti sitoutuva aine ja sitoutumaton aine) täydellisiä pitoisuuskäyriä on käytettävä yhdellä levyllä jokaisessa testiajossa. Kaikilla muilla levyillä on oltava i) suuri (suurin syrjäyttävä eli arviolta radioleimatun ligandin kokonaan syrjäyttävä) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus E2:sta ja heikosti sitoutuvasta aineesta kolmena rinnakkaisnäytteenä, ii) liuotinkontrolli ja epäspesifi sitoutuva aine kolmena rinnakkaisnäytteenä. Testipuskurin, [^{3}H]-17β-estradioli-, hrERα- ja testikemikaaliliuosten valmistamismenettelyt on selostettu perusteellisesti CERI-testin protokollassa (2).

Liuotinkontrolli:

25. Liuotinkontrolli osoittaa, ettei liuotin vaikuta testijärjestelmään. Sillä mitataan myös kokonaissitoutumista. Suositeltu liuotin on DMSO. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää etanolia, jos testikemikaalin suurin pitoisuus ei liukene DMSO:hon. DMSO:n pitoisuuden lopullisissa testikuopissa tulee olla 2,05 %, ja sitä voidaan suurentaa 2,5 prosenttiin, jos testikemikaali liukenee huonosti. Yli 2,5 prosentin DMSO-pitoisuuksia ei tule käyttää, koska suuremmat liuotinpitoisuudet voivat häiritä testiä. Jos testikemikaali ei liukene DMSO:hon mutta liukenee etanoliin, sitä voidaan käyttää enintään 2 prosentin pitoisuutena ilman, että se häiritsee testiä.

Puskurikontrolli:

26. Puskurikontrolli ei saa sisältää liuotinta eikä testikemikaalia mutta kaikkia muita testin aineita. Puskurikontrollin tuloksia verrataan liuotinkontrollin tuloksiin sen varmistamiseksi, ettei käytetty liuotin vaikuta testijärjestelmään.

▼M8

Voimakkaasti sitoutuva aine (vertailuestrogeeni)

27. 17β-estradioli (CAS 50-28-2) on endogeeninen ligandi, ja se sitoutuu suurella affiniteetilla estrogeenireseptorin alatyyppi alfaan. Jokaisesta kilpailevaa sitoutumista tarkastelevasta hrERα-testistä on laadittava vakiokäyrä käyttämällä leimaamatonta 17β-estradiolia, jotta voidaan arvioida vaihtelua, kun testi tehdään samassa laboratoriossa myöhemmin uudestaan. Leimaamattomasta 17β-estradiolista on valmistettava kahdeksan liuosta DMSO:ssa ja testipuskurissa, ja vakiokäyrää varten käytettävät testikuoppien loppupitoisuudet on porrastettava näin: 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, $10^{-8,5}$, 10^{-9}, $10^{-9,5}$, 10^{-10}, 10^{-11} M. Suurin pitoisuus leimaamatonta 17β-estradiolia (1 μM) on tarkoitettu myös epäspesifisen sitoutumisen indikaattoriksi. Taulukossa 4 tämä pitoisuus on yksilöity tunnisteella ”NSB”, vaikka se on myös osa vakiokäyrää.

Heikosti sitoutuva aine

28. Testiin on sisällytettävä myös heikosti sitoutuva aine (noretinodreli (CAS 68-23-5) tai vaihtoehtoisesti noretindroni (CAS 68-22-4)), jotta voidaan osoittaa jokaisen kokeen herkkyys ja arvioida vaihtelua, kun testi tehdään myöhemmin uudestaan. Heikosti sitoutuvasta aineesta on valmistettava kahdeksan liuosta DMSO:ssa ja testipuskurissa, ja testikuoppien loppupitoisuudet on porrastettava näin: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6}, $10^{-6,5}$, 10^{-7}, $10^{-7,5}$, 10^{-8} ja 10^{-9} M.

Sitoutumaton aine

29. Negatiivisena kontrollina (sitoutumattomana aineena) on käytettävä oktyylitrietoksisilaania (OTES, CAS 2943-75-1). Sen avulla voidaan varmistaa, että ajetulla testillä havaitaan ne testikemikaalit, jotka eivät sitoudu hrERα:aan. Heikosti sitoutuvasta aineesta on valmistettava kahdeksan liuosta DMSO:ssa ja testipuskurissa, ja testikuoppien loppupitoisuudet on porrastettava näin: 10^{-3},10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10} M. Vaihtoehtoisena sitoutumattomana aineena voidaan käyttää di-n-butyyliftalaattia (DBP, CAS 84-72-2), mutta sitä saa testata vain 10^{-4}M:n pitoisuuteen saakka. DBP:n suurimman liukoisuuden testissä on osoitettu olevan 10^{-4}M.

hrERα:n pitoisuus

30. Testissä on käytettävä sellaista määrää reseptoria, jolla spesifiseksi sitoutumiseksi saadaan 40±10 prosenttia (ks. lisäys 3:n 12 ja 13 kohta). hrERα-liuos on valmistettava laimentamalla funktionaalinen hrERα jääkylmäksi testipuskuriksi juuri ennen käyttöä.

[^{3}H]17β-estradioli

31. [^{3}H]-17β-estradiolin loppupitoisuuden testikuopissa on oltava 0,5 nM.

Testikemikaalit

32. Ensin on tehtävä liukoisuustesti, jossa määritetään jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja ja testiä tehtäessä käytettävä asianmukainen pitoisuusalue. Jokaisen testikemikaalin liukoisuusraja on määritettävä alustavasti liuottimessa ja vahvistettava myöhemmin testiolosuhteissa. Testissä testattava loppupitoisuus saa olla enintään 1 mM. Pitoisuusalueen määritystesti koostuu liuotinkontrollista ja kahdeksasta logaritmiseen asteikkoon perustuvasta sarjalaimennoksesta, jotka aloitetaan suurimmasta hyväksyttävästä pitoisuudesta (esim. 1 mM tai vähemmän liukoisuusrajan mukaan) ja todetun sameuden tai sakan määrän mukaan (ks. lisäys 3:n 35 kohta). Kun testauksessa käytettävä pitoisuusalue on määritetty, testikemikaali on testattava käyttämällä

▼M8

kahdeksaa logaritmista pitoisuutta, jotka on porrastettu asianmukaisesti edeltäneessä pitoisuusalueen määritystestissä määritetyn mukaisesti. Toisen ja kolmannen kokeen pitoisuuksia on mukautettava tarpeen mukaan, jotta pitoisuus-vastekäyrää voidaan luonnehtia paremmin tarvittaessa.

33. Testikemikaalin laimennokset on tehtävä asianmukaiseen liuottimeen (ks. lisäys 3:n 25 kohta). Jos testikemikaalin suurin pitoisuus ei liukene DMSO:hon tai etanoliin ja jos liuottimen määrän lisääminen johtaisi siihen, että liuottimen pitoisuus lopullisessa testiputkessa olisi hyväksyttävää määrää suurempi, suurinta pitoisuutta voidaan pienentää seuraavaan pienempään pitoisuuteen. Tällöin pitoisuussarjan alapäähän voidaan lisätä ylimääräinen pitoisuus. Sarjan muita pitoisuuksia ei tule muuttaa.

34. Testikemikaaliliuoksia on tarkkailtava huolellisesti, kun niitä lisätään testikuoppiin, koska testikemikaali voi sakkautua testikuoppaan lisättäessä. Tiedot kaikista kuopista, joissa on sakkaa, on jätettävä pois käyrän sovituksesta, ja tietojen poisjättämisen syy on ilmoitettava.

35. Jos muista lähteistä on saatavilla aiempia tietoja, joissa on määritetty testikemikaalin log(IC_{50}-arvo, voi olla tarpeen porrastaa laimennokset geometrisesti lähemmäs odotuksenmukaista log(IC_{50})-arvoa (ts. 0,5 logaritmiyksikköä). Lopullisten tulosten on kuvastettava pitoisuuksien riittävää jakautumista log(IC_{50})-arvon kummallekin puolelle, ylin ja alin arvo mukaan luettuina, jotta sitoutumiskäyrää voidaan luonnehtia asianmukaisesti.

Testilevyn järjestäminen

36. Testiä varten on tehtävä merkityt mikrotiitterilevyt käyttämällä kuusinkertaista inkubaatiota liuotinkontrollille, vertailuestrogeenin (E2) suurimmalle pitoisuudelle, joka toimii myös epäspesifisen sitoutumisen (NSB:n) indikaattorina, puskurikontrollille, ja kolminkertaistaa inkubaatiot sitoutumattoman kontrolliaineen (oktyylitrietoksilaanin) kahdeksalle pitoisuudelle, vertailuestrogeenin (E2) seitsemälle pienemmälle pitoisuudelle, heikosti sitoutuvan aineen (noretinodrelin tai noretindronin) kahdeksalle pitoisuudelle ja jokaisen testikemikaalin kahdeksalle pitoisuudelle. Esimerkki levyn järjestyksestä vertailuestrogeenin ja kontrollin täysiä pitoisuuskäyriä varten on jäljempänä olevassa taulukossa 4. Testikemikaaleille tehdään omat mikrotiitterilevynsä, ja niillä on oltava levyn kontrollit (ts. i) suurin (eniten syrjäyttävä) ja kohtalainen (noin IC_{50}) pitoisuus sekä E2:ta että heikosti sitoutuvaa ainetta kolmena rinnakkaisnäytteenä, ii) liuotinkontrolli (kokonaissitoutuminen) ja epäspesifi sitoutuva aine, kumpikin kuutena rinnakkaisnäytteenä (taulukko 5). Esimerkki kilpailevan testin mikrotiitterilevyn järjestystä koskevasta taulukosta, jossa käytetään kolmea tuntematonta kemikaalia, on lisäyksessä 3.3. Taulukossa sekä taulukoissa 4 ja 5 ilmoitetut pitoisuudet tarkoittavat jokaisessa testikuopassa käytettyjä loppupitoisuuksia. E2:n suurimman pitoisuuden on oltava 1×10^{-7} M. Heikosti sitoutuvan aineen osalta on käytettävä suurinta pitoisuutta, jota siitä käytetään levyllä 1. Laboratorion on määritettävä IC_{50}-pitoisuus sen aiempiin tietoihin pohjautuvan tietokannan perusteella. Tämän arvon oletetaan olevan sama kuin validointitutkimuksissa todettu arvo (ks. taulukko 1).

▼**M8**

Taulukko 4

Kilpailevan sitoutumisen testin mikrotiitterilevyn järjestys [1] [2]**, sekä vertailuestrogeenin ja kontrollien täydet pitoisuuskäyrät (levy 1)**

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
	Puskurikontrolli ja positiivinen kontrolli (E2)			Heikosti positiivinen (noretinodreli)			Negatiivinen kontrolli (OTES)			TB ja NSB		
A	Tyhjä (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (liuotinkontrolli) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1\times10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1\times10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1\times10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Puskurikontrolli		
F	E2 ($1\times10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1\times10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Tyhjä (radioakt. aineelle) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1\times10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

([1]) Otos jokaisessa kokeessa käytettävälle vakiomikrotiitterilevylle.
([2]) Huomaa, että tämä mikrotiitterilevy on tehty käyttämällä laimennoslevyllä tehtyjä laimennoksia, jotka on kuvattu edellisissä kohdissa käsitellyissä vaatimuksissa.
Tässä esimerkissä heikosti sitoutuva aine on noretinodreli (NE).
(*) Oikeasti tyhjä, kuoppa ei käytössä.
(**) Tyhjä inkuboinnin aikana mutta käytetään lisätyn kokonaisradioaktiivisuuden vahvistamisessa.

Taulukko 5

Kilpailevan sitoutumisen testin mikrotiitterilevyn järjestys sekä lisälevyt testikemikaaleille (TC) ja levykontrolleille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Testikemikaali 1 (TC-1)			Testikemikaali 2 (TC-2)			Testikemikaali 3 (TC-3)			Kontrollit		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 ($1\times10_{-7}$M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1\times10_{-4.5}$M)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (liuotinkontrolli)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Tässä esimerkissä heikosti sitoutuva aine on noretinodreli (NE).

▼M8

Kilpailevan sitoutumisen testin tekeminen

37. Lukuun ottamatta kokonaissitoutumista mittaavia ja tyhjiä (radioaktiivista ainetta varten tarkoitettuja) kuoppia (ks. taulukko 6) jokaiseen kuoppaan on laitettava 50 µl testipuskuria ja sekoitettava 10 µl:aan liuotinkontrollia, vertailuestrogeenia (E2), heikosti sitoutuvaa ainetta, sitoutumatonta ainetta ja testikemikaaleja sekä 10 µl:aan [3H]-17β-estradioliliuosta (5 nM). Sen jälkeen jokaiselle levylle lisätään 30 µl jääkylmää reseptoriliuosta ja sekoitetaan varovasti. hrERα-liuoksen tulee olla viimeinen lisättävä reagenssi. Testin mikrotiitterilevyjä tulee inkuboida huoneenlämpötilassa (22–28 °C) kahden tunnin ajan.

Taulukko 6

Kilpailevan hrER-sitoutumistestin osien tilavuus, mikrotiitterilevyt

Valmisteluvaiheet		Muut kuin TB-kuopat	TB-kuopat	Tyhjä (radioakt. aineelle)
Yllä olevien reaktiokuoppien osien tilavuus ja lisäysjärjestys	Huoneenlämpöinen testipuskuri	50 µl	60 µl	90 µl
	Leimaamaton E2, heikosti sitoutuva aine, sitoutumaton aine, liuotin ja testikemikaalit (*)	10 µl	-	-
	[3H]-17β-estradioli, joka tuottaa loppupitoisuudeksi 0,5 nM (ts. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	hrERα-pitoisuus määritetyn mukaisesti (ks. 12 ja 13 kohta)	30 µl	30 µl	-
Kunkin testikuopan kokonaistilavuus		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Asianmukaisesti valmistettu, jotta saadaan hyväksyttävän liuotinpitoisuuden mukainen loppupitoisuus.

38. hrERα:n sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin kvantifiointi, sen jälkeen kun hrERα:aan sitoutunut [^{3}H]-17β-estradioli on erotettu vapaasta [^{3}H]-17β-estradiolista lisäämällä 100 µl jääkylmää DCC-suspensiota jokaiseen kuoppaan, on tehtävä lisäyksen 3 saturaatiositoutumistestiä koskevissa 21–23 kohdissa kuvatun mukaisesti.

39. Kuopat G10–12 ja H10–12 (jotka on merkitty tyhjäksi (radioaktiivisuuden mittaamista varten) taulukossa 4) edustavat [^{3}H]-leimatun estradiolin dpm-arvoa 10 µl:ssa. 10 µl alikvoottia on lisättävä suoraan tuikenesteeseen.

Hyväksymisperusteet

Saturaatiositoutumisen testi

40. Spesifisen sitoutumiskäyrän tulisi saavuttaa tasanne käytettäessä suurenevia pitoisuuksia [^{3}H]-17β-estradiolista, mikä osoittaa, että ligandi on saturoinut hrERα:n.

41. [3 H]-17β-estradiolin spesifinen sitoutuminen pitoisuudella 0,5 nM tulee olla hyväksymisalueella, joka on 30–50 prosenttia mitatusta keskimääräisestä kokonaisradioaktiivisuudesta, joka testiajoissa lisättiin. Satunnaiset vähäiset poikkeamat tältä alueelta ovat hyväksyttäviä, mutta jos testiajojen tulokset ovat jatkuvasti tämän alueen ulkopuolella tai jos jokin tietty ajo on tämän alueen ulkopuolella, proteiinipitoisuutta on muutettava ja saturaatiotesti on toistettava.

▼**M8**

42. Tietojen on tuotettava lineaarinen Scatchardin kuvaaja.

43. Epäspesifinen sitoutuminen ei saa olla liiallista. Epäspesifisen sitoutumisen arvon on yleensä oltava <35 prosenttia kokonaissitoutumisesta. Tämä osuus voi kuitenkin satunnaisesti ylittää tämän rajan, jos testissä käytetyn radioleimatun 17β-estradiolin pienimmästä pitoisuudesta mitataan hyvin pieni dpm-arvo.

Kilpailevan sitoutumisen testi

44. Leimaamattoman 17β-estradiolin suurenevien pitoisuuksien tulisi syrjäyttää [^{3}H]-17β-estradioli reseptorista yhteen kohtaan kilpailevan sitoutumisen osalta johdonmukaisesti.

45. Vertailuestrogeenin (ts. 17β-estradiolin) IC_{50}-arvon on oltava likimain sama kuin [^{3}H]-17β-estradiolin molaarinen konsentraatio plus saturaatiositoutumistestissä määritetty Kd-arvo.

46. Spesifisen kokonaissitoutumisen tulisi olla johdonmukaisesti hyväksymisalueella 40 ± 10 prosenttia, kun jokaiseen kuoppaan testiajoissa lisätyn kokonaisradioaktiivisuuden keskimääräinen mitattu pitoisuus on 0,5 nM. Satunnaiset vähäiset poikkeamat tältä alueelta ovat hyväksyttäviä, mutta jos testiajojen tulokset ovat jatkuvasti tämän alueen ulkopuolella tai jos jokin tietty ajo on tämän alueen ulkopuolella, proteiinipitoisuutta on muutettava.

47. Liuotin ei saa muuttaa testin herkkyyttä tai toistettavuutta. Liuotinkontrollin (TB-kuopat) tuloksia verrataan puskurikontrollin tuloksiin sen varmistamiseksi, ettei käytetty liuotin vaikuta testijärjestelmään. TB- ja puskurikontrollin tulosten tulisi olla verrattavissa, jos liuotin ei ole vaikuttanut testiin.

48. Sitoutumaton aine saa syrjäyttää enintään 25 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolista hrERα:sta, kun testattu konsentraatio on 10^{-3} M (OTES) tai 10^{-4} M (DBP).

49. Vertailuestrogeenille ja kahdelle heikosti sitoutuvalle aineelle (noretinodreli ja noretindroni) on laadittu suoritusvaatimukset CERI hrER -sitoutumistestin validointitutkimukseen perustuvien tietojen avulla (lähdeviitteen 2 liite N). Keskiarvolle (n) +/- keskihajonnalle on määritetty 95 prosentin luottamusvälit kaikkien niiden kontrolliajojen perusteella, jotka tehtiin neljässä validointitutkimuksiin osallistuneissa laboratorioissa. Nämä 95 prosentin luottamusvälit laskettiin vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvien aineiden käyrän sovitusparametreille (ylin ja alin arvo, Hillslope ja $logIC_{50}$). Lisäksi laskettiin heikosti sitoutuvien aineiden log_{10}RBA suhteessa vertailuestrogeeniin. Taulukossa 1 esitetään käyrän sovituksen parametrien odotuksenmukaiset alueet, joita voidaan käyttää suoritusvaatimuksina. Käytännössä IC_{50}-arvon alue voi vaihdella hieman reseptorivalmisteen kokeellisesti johdetun Kd-arvon ja testissä käytetyn ligandin pitoisuuden perusteella.

50. Testikemikaalien käyrän sovitusparametreille ei ole laadittu suoritusvaatimuksia, koska mahdollisten testikemikaalien valikoima on hyvin laaja, kuten myös mahdollisten affiniteettien ja tulosten vaihtelu (täysi käyrä, osittainen käyrä, ei käyrän sovitusta). Testikemikaalin jokaisen testiajon tulosten tarkastelussa on käytettävä asiantuntijoita. Testikemikaalista on käytettävä

▼M8

riittävän monta pitoisuutta, jotta kilpailevan käyrän huippu (ts. 90–100 prosentin sitoutuminen) voidaan määrittää selvästi. Rinnakkaisnäytteiden vaihtelun on oltava kohtuullista ja tieteellisesti perusteltavissa testikemikaalin jokaisen pitoisuuden ja kolmen eriaikaisen testiajon osalta. Testikemikaalin kontrollien pitäisi täyttää jokaisessa testiajossa CERI-testiä koskevat suoritusvaatimukset, ja niiden tulee olla yhdenmukaiset kunkin laboratorion aiempien kontrollitietojen kanssa.

AINEISTON ANALYSOINTI

Saturaatiositoutumisen testi

51. Sekä kokonaissitoutuminen että epäspesifinen sitoutuminen mitataan. Näistä arvoista lasketaan [^{3}H]-17β-estradiolin suurenevien pitoisuuksien spesifinen sitoutuminen vähentämällä epäspesifinen sitoutuminen kokonaissitoutumisesta. Spesifiä sitoutumista vs. [^{3}H]-17β-estradiolin pitoisuutta kuvaavan käyrän tulisi saavuttaa tasanne suurinta spesifistä sitoutumista kuvaavan arvon kohdalla, joka kuvastaa hrERα:n saturoitumista [^{3}H]-17β-estradiolilla. Lisäksi aineiston analyysissa on dokumentoitava [^{3}H]-17β-estradiolin sitoutuminen yksittäiseen suuren affiniteetin sitoutumiskohtaan. Epäspesifinen, kokonais- ja spesifinen sitoutuminen on esitettävä saturaatiositoutumista kuvaavalla käyrällä. Näiden tietojen tarkemmassa analyysissa on käytettävä epälineaarista regressioanalyysia (esim. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995), ja lopulliset tiedot tulee esittää Scatchardin kuvaajalla.

52. Aineiston analyysissa on määritettävä Bmax- ja Kd-arvot pelkästään kokonaissitoutumista koskevista tiedoista ja olettamalla, että epäspesifinen sitoutuminen on lineaarista. Toisenlaisen menetelmän käyttäminen on perusteltava. Lisäksi parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Valittu robustin regression menetelmä on ilmoitettava. Ligandin depleetion korjausta (käyttämällä esimerkiksi Swillensin menetelmää, 1995) on käytettävä aina määritettäessä Bmax- ja Kd-arvoja saturaatiositoutumistiedoista.

Kilpailevan sitoutumisen testi

53. Kilpailevan sitoutumisen käyrä esitetään [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisenä sitoutumisena vs. kilpailijan pitoisuutena (log10-yksiköt). Testikemikaalin se pitoisuus, joka estää 50 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisestä enimmäissitoutumisesta, on IC_{50}-arvo.

54. Positiivisten kontrollien (ts. vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen) log(IC_{50})-arvojen estimaatit on määritettävä käyttämällä asianmukaista epälineaarisen käyrän sovitusohjelmaa, jotta ne sopivat Hillin yhtälön neljään parametriin (esimerkiksi BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Ylin, alin, kulmakerroin ja log(IC_{50}) on yleensä jätettävä rajattomiksi näitä käyriä sovitettaessa. Parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Ligandin depleetion korjausta ei tule käyttää. Alustavan analyysin jälkeen jokainen sitoutumiskäyrä on tarkistettava, jotta se varmasti sopii malliin asianmukaisesti. Heikosti sitoutuvan aineen suhteellinen sitoutumisaffiniteetti (RBA) lasketaan prosenttiosuutena heikosti sitoutuvan aineen log (IC_{50}) -arvosta suhteessa 17β-estradiolin log (IC_{50}) -arvoon. Positiivisten kontrollien ja sitoutumattoman kontrollin tuloksia on arvioitava käyttämällä testin suorituskyvyn mittareita, jotka on esitetty tämän lisäyksen 344–49 kohdassa.

▼M8

55. Kaikkien testikemikaalien tiedot on analysoitava käyttämällä vaiheittaista lähestymistapaa, jotta varmistetaan, että tiedot analysoidaan asianmukaisesti ja että kukin kilpailevan sitoutumisen käyrä luokitellaan oikein. On suositeltavaa, että testikemikaalin jokaiselle ajolle tehdään aluksi standardoitu aineistoanalyysi, joka on identtinen vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvista aineista koostuvien kontrollien yhteydessä käytetyn analyysin kanssa (ks. tämän lisäyksen 354 kohta). Kun se on tehty, on tehtävä käyrän sovitusparametrien tekninen tarkastus ja tarkastettava silmämääräisesti, miten hyvin tiedot sopivat luotuun kilpailevan sitoutumisen käyrään jokaisesta ajosta. Jos tämän teknisen tarkastuksen aikana tehdään havaintoja, joiden mukaan spesifisesti sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin prosentuaalinen osuus pienenee pitoisuuden mukaan, jokaisen testikemikaalipitoisuuden teknisten rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu on vähäistä ja kolmen ajon sovitusparametrit ovat johdonmukaisia, ne ovat hyvä osoitus siitä, että testi ja aineistoanalyysit on tehty asianmukaisesti.

Tietojen tulkinta

56. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan hrERα:aan sitoutuva aine, jos sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa ja jos vastekäyrän alin piste tietojen vaihteluvälin alueella on 50 prosentin alapuolella (kuva 1).

57. Jos kaikki hyväksymisperusteet täyttyvät, testikemikaalin katsotaan olevan hrERα:aan sitoutumaton aine, jos

— sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa ja sovitetun vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 75 prosentin alapuolella, tai

— sitoutumiskäyrää ei voida sovittaa ja alin tasoitettu keskimääräinen prosentuaalinen sitoutuminen aineiston pitoisuusryhmissä on 75 prosentin yläpuolella

58. Testikemikaalit katsotaan epäselviksi, jos kumpikaan edellä esitetyistä ehdoista ei täyty (ts. jos sovitetun vastekäyrän alin piste on 76–51 prosentin välillä).

Taulukko 7

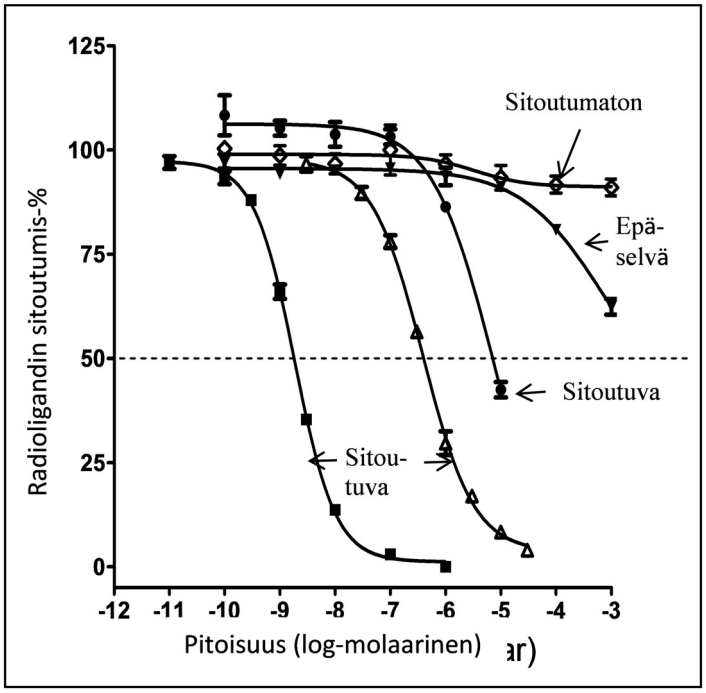
Luokitteluperusteet testikemikaalin kilpailevan sitoutumiskäyrän perusteella

Luokittelu	Perusteet
Sitoutuva[a]	Sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa. **Vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 50 prosentin alapuolella**.
Sitoutumaton[b]	Jos sitoutumiskäyrä voidaan sovittaa, **sovitetun vastekäyrän alin piste koko aineistossa on 75 prosentin yläpuolella**. Jos sitoutumiskäyrää ei voida sovittaa, **alin tasoitettu keskimääräinen prosentuaalinen sitoutuminen aineiston pitoisuusryhmissä on 75 prosentin yläpuolella.**
Epäselvä[c]	Mikä tahansa testiaine, joka ei ole sitoutuva eikä sitoutumaton aine (esim. sovitetun vastekäyrän alin piste on 76–51 prosentin välillä).

▼M8

Kuva 1

Esimerkkejä testikemikaalin luokittelusta kilpailevan sitoutumiskäyrän perusteella



59. Laboratoriossa testikemikaalista tehdyt useat ajot yhdistetään antamalla jokaiselle ajolle numeeriset arvot ja laskemalla ajojen keskiarvot taulukossa 8 osoitetun mukaisesti. Jokaisen laboratorion yhdistettyjen ajojen tuloksia verrataan jokaisen testikemikaalin odotuksenmukaiseen luokitukseen.

Taulukko 8

Yhdessä laboratoriossa tehtyihin useisiin ajoihin perustuva menetelmä testikemikaalin luokitteluun

Arvon antaminen jokaiselle ajolle:	
Luokittelu	**Numeerinen arvo**
Sitoutuva	2
Epäselvä	1
Sitoutumaton	0

Luokittelu ajojen numeerisen arvon keskiarvon perusteella:

Luokittelu	**Numeerinen arvo**
Sitoutuva	Keskiarvo ≥ 1,5
Epäselvä	0,5 ≤ keskiarvo < 1,5
Sitoutumaton	Keskiarvo < 0,5

TESTIRAPORTTI

60. Ks. 24 kohta kappaleesta ”hrER-SITOUTUMISTESTIN OSAT” tämän testimenetelmän osalta.

▼**M8**

Lisäys 3.1

SANASTO

[^{3}H]E2: Tritiumilla radioleimattu 17β-estradioli

DCC: Dekstraanilla pinnoitettu hiili

E_2: Leimaamaton 17β-estradioli (inertti)

Testipuskuri: 10 mM Tris-HCl:ää, pH 7,4, joka sisältää 1 mM EDTAa, 1 mM EGTAa, 1 mM NaVO3:a, 10 prosenttia glyserolia, 0,2 mM leupeptiiniä, 1 mM ditiotreitolia ja 10 mg/ml naudan seerumin albumiinia.

hrERα: Ihmisen rekombinantti estrogeenireseptori alfa (ligandin sitoutumisdomeeni)

Rinnakkaisnäyte: Yksi monesta kuopasta, joiden sisällöt ja pitoisuudet ovat samat ja jotka testataan samaan aikaan yhdessä ajossa. Tässä protokollassa jokainen testikemikaalin pitoisuus testataan kolmella rinnakkaisnäytteellä. Tämä tarkoittaa sitä, että testikemikaalin jokaisesta pitoisuudesta on kolme rinnakkaisnäytettä, jotka testataan samaan aikaan.

Testiajo: Täydellinen sarja samaan aikaan testattavia mikrotiitterilevyjen testikuoppia, joista saadaan kaikki tarvittavat tiedot, joilla voidaan luonnehtia testikemikaalin sitoutumista hrERα:aan (ts. testikuoppaan lisätty [^{3}H]-17β-estradioli kokonaisuudessaan, [^{3}H]-17β-estradiolin enimmäissitoutuminen hrERα:an, epäspesifinen sitoutuminen ja kokonaissitoutuminen testikemikaalin eri pitoisuuksilla). Testiajossa voidaan käyttää sekä yhtä että useaa testikuoppaa (ts. rinnakkaisnäytettä) pitoisuutta kohti, mutta koska tässä protokollassa edellytetään, että rinnakkaisnäytteitä on kolme, yksi ajo koostuu kolmesta testikuopasta pitoisuutta kohti. Lisäksi tässä protokollassa edellytetään, että yhtä kemikaalia kohti tehdään kolme itsenäistä (eli eriaikaista) ajoa.

▼**M8**

Lisäys 3.2

KILPAILEVAN SITOUTUMISEN TESTIKUOPPIEN JÄRJESTYS

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	A1	1	Tyhjä	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Tyhjä	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Tyhjä	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	ei-r-akt. E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B2	2	ei-r-akt. E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	B3	3	ei-r-akt. E2	S	S1	1,00E-10	30	50	10	10	100	1,0E-11
S	C1	1	ei-r-akt. E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C2	2	ei-r-akt. E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	C3	3	ei-r-akt. E2	S	S2	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	D1	1	ei-r-akt. E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D2	2	ei-r-akt. E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	D3	3	ei-r-akt. E2	S	S3	3,16E-09	30	50	10	10	100	3,2E-10
S	E1	1	ei-r-akt. E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E2	2	ei-r-akt. E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	E3	3	ei-r-akt. E2	S	S4	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	F1	1	ei-r-akt. E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F2	2	ei-r-akt. E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	F3	3	ei-r-akt. E2	S	S5	3,16E-08	30	50	10	10	100	3,2E-09
S	G1	1	ei-r-akt. E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	G2	2	ei-r-akt. E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	G3	3	ei-r-akt. E2	S	S6	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	H1	1	ei-r-akt. E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H2	2	ei-r-akt. E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	H3	3	ei-r-akt. E2	S	S7	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	A4	1	Noretinodreli	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A5	2	Noretinodreli	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	A6	3	Noretinodreli	NE	WP1	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B4	1	Noretinodreli	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B5	2	Noretinodreli	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	B6	3	Noretinodreli	NE	WP2	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C4	1	Noretinodreli	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C5	2	Noretinodreli	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	C6	3	Noretinodreli	NE	WP3	3,16E-07	30	50	10	10	100	3,2E-08
S	D4	1	Noretinodreli	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D5	2	Noretinodreli	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D6	3	Noretinodreli	NE	WP4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E4	1	Noretinodreli	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E5	2	Noretinodreli	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07
S	E6	3	Noretinodreli	NE	WP5	3,16E-06	30	50	10	10	100	3,2E-07

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	F4	1	Noretinodreli	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F5	2	Noretinodreli	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	F6	3	Noretinodreli	NE	WP6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	G4	1	Noretinodreli	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G5	2	Noretinodreli	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	G6	3	Noretinodreli	NE	WP7	3,16E-05	30	50	10	10	100	3,2E-06
S	H4	1	Noretinodreli	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H5	2	Noretinodreli	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	H6	3	Noretinodreli	NE	WP8	3,16E-04	30	50	10	10	100	3,2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8DB-P7	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES88	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
S	A10	1	kokonaissitoutuminen	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	kokonaissitoutuminen	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	-
S	B11	5	kokonaissitoutuminen	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	kokonaissitoutuminen	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C11	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	C12	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D10	4	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	D11	5	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennosleyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	D12	6	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
S	E10	1	Puskurikont-rolli	BC	BC1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Puskurikont-rolli	BC	BC2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Puskurikont-rolli	BC	BC3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Puskurikont-rolli	BC	BC4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Puskurikont-rolli	BC	BC5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Puskurikont-rolli	BC	BC6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Tyhjä (radio-akt. aineelle)	Radio-akt.	H1	—	90	—	10	—	100	—
S	G11 (*)	2	Tyhjä (radio-akt. aineelle)	Radio-akt.	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Tyhjä (radio-akt. aineelle)	Radio-akt.	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Tyhjä (radio-akt. aineelle)	Radio-akt.	H4	—	90	—	10	—	100	—

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
S	H11 (*)	5	Tyhjä (radio-akt. aineelle)	Radio-akt.	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Tyhjä (radio-akt. aineelle)	Radio-akt.	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Tuntematon 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A2	2	Tuntematon 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A3	3	Tuntematon 1	U1	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B1	1	Tuntematon 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B2	2	Tuntematon 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B3	3	Tuntematon 1	U1	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C1	1	Tuntematon 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C2	2	Tuntematon 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C3	3	Tuntematon 1	U1	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D1	1	Tuntematon 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D2	2	Tuntematon 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D3	3	Tuntematon 1	U1	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E1	1	Tuntematon 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E2	2	Tuntematon 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E3	3	Tuntematon 1	U1	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F1	1	Tuntematon 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F2	2	Tuntematon 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F3	3	Tuntematon 1	U1	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G1	1	Tuntematon 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G2	2	Tuntematon 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G3	3	Tuntematon 1	U1	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H1	1	Tuntematon 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H2	2	Tuntematon 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	H3	3	Tuntematon 1	U1	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A4	1	Tuntematon 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A5	2	Tuntematon 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A6	3	Tuntematon 2	U2	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B4	1	Tuntematon 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B5	2	Tuntematon 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B6	3	Tuntematon 2	U2	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C4	1	Tuntematon 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C5	2	Tuntematon 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C6	3	Tuntematon 2	U2	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D4	1	Tuntematon 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D5	2	Tuntematon 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D6	3	Tuntematon 2	U2	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E4	1	Tuntematon 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E5	2	Tuntematon 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E6	3	Tuntematon 2	U2	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F4	1	Tuntematon 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F5	2	Tuntematon 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F6	3	Tuntematon 2	U2	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G4	1	Tuntematon 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G5	2	Tuntematon 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G6	3	Tuntematon 2	U2	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H4	1	Tuntematon 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H5	2	Tuntematon 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H6	3	Tuntematon 2	U2	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A7	1	Tuntematon 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	A8	2	Tuntematon 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	A9	3	Tuntematon 3	U3	1	1,00E-09	30	50	10	10	100	1,0E-10
P1	B7	1	Tuntematon 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B8	2	Tuntematon 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	B9	3	Tuntematon 3	U3	2	1,00E-08	30	50	10	10	100	1,0E-09
P1	C7	1	Tuntematon 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C8	2	Tuntematon 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	C9	3	Tuntematon 3	U3	3	1,00E-07	30	50	10	10	100	1,0E-08
P1	D7	1	Tuntematon 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D8	2	Tuntematon 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	D9	3	Tuntematon 3	U3	4	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,0E-07
P1	E7	1	Tuntematon 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E8	2	Tuntematon 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E9	3	Tuntematon 3	U3	5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F7	1	Tuntematon 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F8	2	Tuntematon 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	F9	3	Tuntematon 3	U3	6	1,00E-04	30	50	10	10	100	1,0E-05
P1	G7	1	Tuntematon 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G8	2	Tuntematon 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	G9	3	Tuntematon 3	U3	7	1,00E-03	30	50	10	10	100	1,0E-04
P1	H7	1	Tuntematon 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H8	2	Tuntematon 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	H9	3	Tuntematon 3	U3	8	1,00E-02	30	50	10	10	100	1,0E-03
P1	A10	1	Kontrolli E2 (maks.)	S	E2max1	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A11	2	Kontrolli E2 (maks.)	S	E2max2	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	A12	3	Kontrolli E2 (maks.)	S	E2max3	1,00E-06	30	50	10	10	100	1,00E-07
P1	B10	1	Kontrolli E2 (IC50)	S	E2IC501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	B11	2	Kontrolli E2 (IC50)	S	E2IC502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	B12	3	Kontrolli E2 (IC50)	S	E2IC503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2IC50
P1	C10	1	Kontrolli NE (maks.)	S	Nemax1	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C11	2	Kontrolli NE (maks.)	S	Nemax2	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	C12	3	Kontrolli NE (maks.)	S	Nemax3	1,00E-3,5	30	50	10	10	100	1,00E-4,5
P1	D10	1	Kontrolli NE (IC50)	S	NEIC501	NEIC50x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D11	2	Kontrolli NE (IC50)	S	NEIC502	NEIC50x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	D12	3	Kontrolli NE (IC50)	S	NEIC503	NEIC50x10	30	50	10	10	100	NEIC50
P1	E10	1	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S1	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E11	2	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S2	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	E12	3	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S3	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F10	4	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S4	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F11	5	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S5	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	F12	6	ei-r-akt. E2 (suuri)	NSB	S6	1,00E-05	30	50	10	10	100	1,0E-06
P1	G10	1	kokonaissitoutuminen	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	kokonaissitoutuminen	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	kokonaissitoutuminen	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—

▼**M8**

Levy	Paikka	Rinnakkaisnäyte	Kuopan tyyppi	Kuopan koodi	Pitoisuuskoodi	Kilpailijan alkupitoisuus (M)	hrER-varastoliuos (µl)	Puskurin tilavuus (µl)	Merkkiaineen (r-akt. E2) tilavuus (µl)	Tilavuus laimennoslevyltä (µl)	Lopputilavuus (µl)	Kilpailijan loppupitoisuus (M)
P1	H10	4	kokonaissitoutuminen	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	kokonaissitoutuminen	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	kokonaissitoutuminen	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Huomaa, että radioaktiiviset kuopat ovat tyhjiä inkuboinnin aikana. 10 µl lisätään vain tuikelaskentaa varten.

▼**M8**

Lisäys 4

KILPAILEVAN HRER-SITOUTUMISTESTIN AINEISTON ANALYSOINNISSA HUOMIOON OTETTAVIA NÄKÖKOHTIA

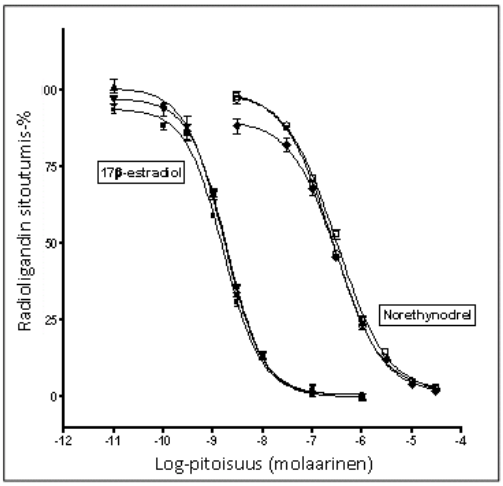
1. Kilpailevassa hrERα-sitoutumistestissä mitataan yhden [^{3}H]-17β-estradiolipitoisuuden sitoutumista samaan aikaan suurenevien testikemikaalipitoisuuksien kanssa. Kilpailevan sitoutumisen käyrä esitetään [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisenä sitoutumisena vs. kilpailijan pitoisuutena (log10-yksiköt). Testikemikaalin se pitoisuus, joka estää 50 prosenttia [^{3}H]-17β-estradiolin spesifisestä enimmäissitoutumisesta, on IC_{50}-arvo.

Vertailuestrogeenia ja heikosti sitoutuvaa ainetta koskevien tietojen analysointi (1)

2. Kontrolliajoista saadut tiedot (ts. [^{3}H]-17β-estradiolin prosentuaalinen spesifinen sitoutuminen ja kontrollikemikaalin log-pitoisuus) muunnetaan tarkempaa analyysia varten. Positiivisten kontrollien (ts. vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvan aineen) log(IC_{50})-arvojen estimaatit on määritettävä käyttämällä asianmukaista epälineaarisen käyrän sovitusohjelmaa, jotta ne sopivat Hillin yhtälön neljään parametriin (esimerkiksi BioSoft; GraphPad Prism) (2). Ylin, alin, kulmakerroin ja log(IC50) voidaan yleensä jättää rajattomiksi näitä käyriä sovitettaessa. Parhaan sovituksen määrittämisessä on käytettävä robustia regressiota, ellei muun menetelmän käyttäminen ole perusteltua. Valittu robustin regression menetelmä on ilmoitettava. FW:n tai CERIn hrER-testeissä ei ole tarvittu ligandin depleetion korjausta, mutta sitä voidaan tarvittaessa harkita. Alustavan analyysin jälkeen jokainen sitoutumiskäyrä on tarkistettava, jotta se varmasti sopii malliin asianmukaisesti. Heikosti sitoutuvan aineen suhteellinen sitoutumisaffiniteetti (RBA) lasketaan prosenttiosuutena heikosti sitoutuvan aineen log (IC_{50}) -arvosta suhteessa 17β-estradiolin log (IC_{50}) -arvoon. Positiivisten kontrollien ja sitoutumaton aine -kontrollin tuloksia on arvioitava käyttämällä testin suorituskyvyn mittareita ja hyväksymisperusteita, jotka on kuvattu tässä testimenetelmässä (20 kohta), lisäyksessä 2 (FW-testi, 41–51 kohta) ja lisäyksessä 3 (CERI-testi, 41–51 kohta). Esimerkkejä kolmesta vertailuestrogeenilla ja heikosti sitoutuvalla aineella tehdystä testiajosta on kuvassa 1.

Kuva 1

Esimerkkejä vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuva aine -kontrollin kilpailevan sitoutumisen käyristä



▼**M8**

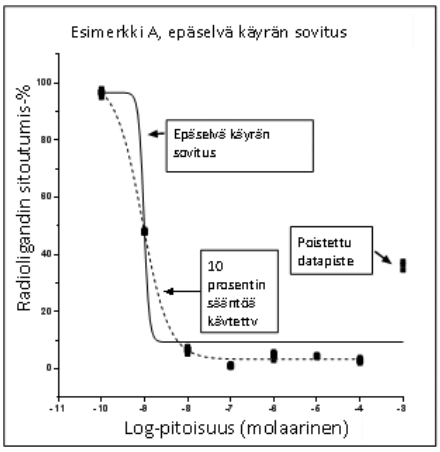
Testikemikaalien tietojen analysointi

3. Kaikkien testikemikaalien tiedot on analysoitava käyttämällä vaiheittaista lähestymistapaa, jotta varmistetaan, että tiedot analysoidaan asianmukaisesti ja että kukin kilpailevan sitoutumisen käyrä luokitellaan oikein. Testikemikaalin jokaiselle ajolle on aluksi tehtävä standardoitu aineistoanalyysi, joka on identtinen vertailuestrogeenin ja heikosti sitoutuvista aineista koostuvien kontrollien yhteydessä käytetyn analyysin kanssa. Kun se on tehty, on tehtävä käyrän sovitusparametrien tekninen tarkastus ja tarkastettava silmämääräisesti, miten hyvin tiedot sopivat luotuun kilpailevan sitoutumisen käyrään jokaisesta ajosta. Jos tämän teknisen tarkastuksen aikana tehdään havaintoja, joiden mukaan spesifisesti sitoutuneen [^{3}H]-17β-estradiolin prosentuaalinen osuus pienenee pitoisuuden mukaan, jokaisen kemikaalipitoisuuden teknisten rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu on vähäistä ja kolmen ajon sovitusparametrit ovat johdonmukaisia, ne ovat hyvä osoitus siitä, että testi ja aineistoanalyysit on tehty asianmukaisesti. Testikemikaalin jokaisen testiajon tulosten tarkastelussa on käytettävä asiantuntijoita, ja tieteellisesti perusteltuja on oltava tietojen, joiden nojalla kukin testikemikaali luokiteltiin sitoutuvaksi tai sitoutumattomaksi aineeksi.

4. Toisinaan tiedot voivat edellyttää erityistä paneutumista, jotta hrER:ään sitoutumista koskevien tietojen analysointi ja tulkinta on asianmukaista. Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että kilpailevaan reseptoriin sitoutumista koskevien tietojen analysointi ja tulkinta voivat vaikeutua, jos spesifisen sitoutumisen prosentuaalinen osuus kasvaa, kun kemikaaleja testataan suurimmilla pitoisuuksilla (kuva 2). Tämä on tunnettu ongelma, johon on törmätty käytettäessä protokollia moniin kilpailevaan reseptoriin sitoutumista koskeviin testeihin (3. Näissä tapauksissa vasteen on todettu olevan pitoisuudesta riippuvainen pienemmillä pitoisuuksilla, mutta kun testikemikaalin pitoisuus saavuttaa liukoisuusrajan, [^{3}H]17β-estradiolin syrjäyttäminen ei enää vähene. Näissä tapauksissa tiedot suuremmista pitoisuuksista osoittavat, että testin biologinen raja on saavutettu. Usein tämä ilmiö on liittynyt esimerkiksi kemikaalin liukenemattomuuteen ja sakkautumiseen suuremmilla pitoisuuksilla, tai se voi kuvastaa sitä, että dekstraanilla pinnoitetun hiilen kapasiteetti kerätä sitoutumatonta radioleimattua ligandia erottamisen aikana ylittyy kemikaalin suurimmilla pitoisuuksilla. Jos tällaiset datapisteet otetaan mukaan sovitettaessa kilpailevan sitoutumisen tietoja S-käyrään, seurauksena voi olla testikemikaalin virheellinen luokittelu estrogeenireseptoriin sitoutumispotentiaalin osalta (kuva 2). Tämän välttämiseksi FW- ja CERI hrER -sitoutumistesteissä on mahdollisuus sulkea analyysista pois datapisteet, joissa rinnakkaisnäytteiden [^{3}H]17β-estradiolin spesifisen prosentuaalisen sitoutumisen keskiarvo on vähintään 10 prosenttia suurempi kuin pienemmällä pitoisuudella saatu keskiarvo (tästä käytetään nimitystä 10 prosentin sääntö). Tätä sääntöä voidaan käyttää tietylle käyrälle vain kerran, ja tietoja täytyy olla vähintään kuudesta pitoisuudesta, jotta käyrä voidaan luokitella oikein.

Kuvio 2

Esimerkkejä kilpailevan sitoutumisen käyristä, joissa käytetään tai ei käytetä 10 prosentin sääntöä

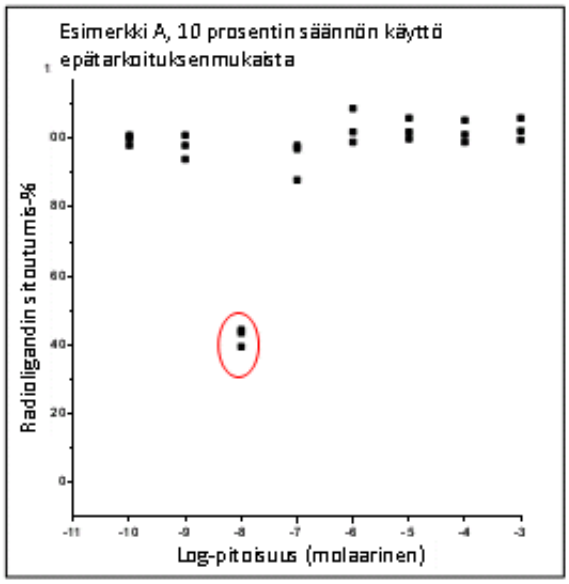


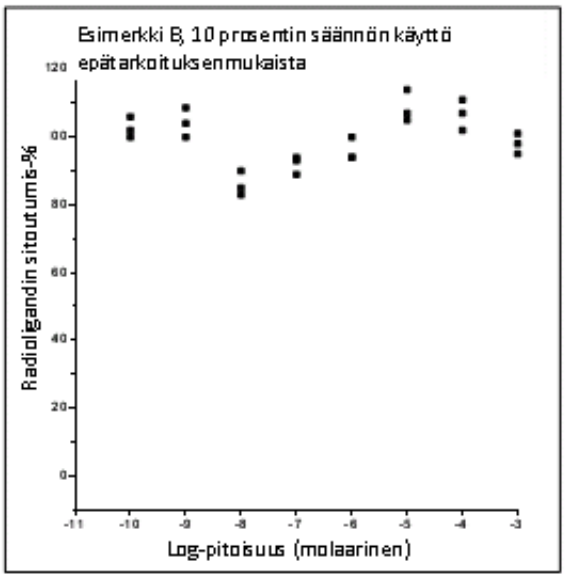
▼**M8**

5. Kymmenen prosentin sääntöä on käytettävä näiden käyrien korjaamisessa asianmukaisesti ja huolellisesti, ja se on varattava niihin tapauksiin, joissa näyttää vahvasti siltä, että aine on ihmisen rekombinanttiin estrogeenireseptoriin sitoutuva aine. FW hrER -sitoutumistestin validointitutkimukseen sisältyviä kokeita tehtäessä todettiin, että 10 prosentin säännön soveltamisella oli joskus tahattomia seurauksia, joita ei voitu ennakoida. Niissä kemikaaleissa, jotka eivät olleet vuorovaikutuksessa reseptorin kanssa (ts. varsinaiset sitoutumattomat aineet), näkyi usein radioligandin 100-prosenttiseen sitoutumiseen nähden vaihtelua, joka oli suurempaa kuin 10 prosenttia testattujen pitoisuuksien vaihteluvälistä. Jos pienin arvo saatiin pienimmällä pitoisuudella, kaikista suuremmista pitoisuuksista saadut tiedot voidaan mahdollisesti poistaa analyysista 10 prosentin sääntöä käyttämällä, vaikka nämä pitoisuudet voivat olla hyödyllisiä sen vahvistamisessa, että kemikaali on sitoutumaton aine. Kuvassa 3 on esimerkkejä tilanteista, jolloin 10 prosentin säännön käyttö ei ole tarkoituksenmukaista.

Kuva 3

Esimerkkejä kilpailevaa sitoutumista koskevista tiedoista, joiden yhteydessä 10 prosentin säännön käyttäminen ei ole tarkoituksenmukaista





▼**M8**

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, s. 187–191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46–56.

▼M8

B.71. **IHON HERKISTYMISTESTIT *IN VITRO*, JOISSA KÄSITELLÄÄN KESKEISTÄ TAPAHTUMAA ELI DENDRIITTISOLUJEN AKTIVOITUMISEN VAIKUTUSTA IHON HERKISTYMISEN HAITTAVAIKUTUSREITTIIN**

YLEISJOHDANTO

Dendriittisolujen aktivoitumiseen keskeisenä tapahtumana perustuva testimenetelmä

1. Ihoa herkistävällä aineella tarkoitetaan Yhdistyneiden kansakuntien (YK) GHS-järjestelmän (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals; maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä) (1) sekä aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta annetun EU-asetuksen 1272/2008 (CLP-asetus) ([1]) määritelmän mukaisesti ainetta, joka aiheuttaa ihokosketuksen seurauksena allergisen reaktion. Ihon herkistymisen taustalla vaikuttavista keskeisistä biologisista tapahtumista vallitsee yleinen yhteisymmärrys. Nykyiset tiedot ihon herkistymiseen liittyvistä kemiallisista ja biologisista mekanismeista on esitetty OECD:n AOP-ohjelmassa tiivistetysti haittavaikutusreittinä (Adverse Outcome Pathway, AOP) (2) herkistymisen käynnistävästä molekyylitason tapahtumasta haittavaikutukseen eli allergiseen kosketusihottumaan. Herkistymisen käynnistävä molekyylitason tapahtuma (eli ensimmäinen keskeinen tapahtuma) on se, että elektrofiiliset aineet muodostavat kovalenttisidoksen ihon proteiinien nukleofiilisiin keskuksiin. Toinen keskeinen tapahtuma tässä haittavaikutusreitissä tapahtuu keratinosyyteissä; se käsittää tulehdusvasteita ja geenien ekspression muutoksia, jotka liittyvät tiettyihin solujen viestinvälitysreitteihin, kuten antioksidatiivisista/elektrofiilisista vaste-elementeistä (ARE) riippuviin reitteihin. Kolmas keskeinen tapahtuma on dendriittisolujen aktivoituminen, jota arvioidaan yleensä tiettyjen solujen pintamerkkiaineiden, kemokiinien ja sytokiininen, ilmenemisen perusteella. Neljäs keskeinen tapahtuma on T-solujen aktivoituminen ja proliferaatio, jota arvioidaan välillisesti hiirille tehdyllä paikallisella imusolmukemääritysmenetelmällä eli LLNA-kokeella (Local Lymph Node Assay) (3).

2. Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 442E (2017). Siinä kuvataan *in vitro* -testejä, joilla tutkitaan mekanismeja, jotka on kuvattu ihon herkistymisen haittavaikutusreitin keskeisen tapahtuman eli dendriittisolujen aktivoitumisen yhteydessä (2). Testimenetelmä koostuu testeistä, joita käytetään apuna ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa YK:n GHS-järjestelmän ja CLP-asetuksen mukaisesti.

Tässä testimenetelmässä kuvatut testit ovat

— ihmisen solulinjaan perustuva aktivointitesti (h-CLAT, human Cell Line Activation Test)

— U937-solulinjaan perustuva aktivointitesti (U-SENS™)

— interleukiini 8:n reportterigeenitesti (IL-8 Luc -testi).

3. Tähän testimenetelmään sisältyvissä testeissä ja niihin liittyvässä OECD:n testiohjeessa voi olla eroja tietojen tuottamiseen käytetyn menettelyn ja mitattujen lukemien osalta, mutta niitä voi käyttää ihon herkistymisen haittavaikutusreitin keskeiseen tapahtumaan eli dendriittisolujen aktivoitumista koskeviin testituloksiin liittyvien maiden vaatimusten yhteydessä samalla, kun hyödynnetään OECD:n sopimuksen mukaista tietojen vastavuoroista hyväksyntää.

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta (EUVL L 353. 31.12.2008. s. 1).

▼M8

Taustaa ja keskeiseen tapahtumaan perustuvaan testimenetelmään sisältyviä testejä koskevat periaatteet

4. Ihon herkistymisen arviointi on tyypillisesti edellyttänyt koe-eläinten käyttöä. Marsujen käyttöön perustuvilla klassisilla menetelmillä – Magnussonin ja Kligmanin GPMT-testillä (Guinea Pig Maximisation Test) ja Buehlerin testillä (TM B.6) (4) – tutkitaan ihon herkistymisen induktio- ja haastevaihetta. Hiirellä tehtävät testit, LLNA (TM B.42) (3) ja sen kaksi ei-radioaktiivista muunnosta, LLNA: DA (TM B.50) (5) ja LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51) (6), joilla kaikilla arvioidaan vain induktiovastetta, ovat saaneet hyväksyntää, sillä marsukokeisiin verrattuna niillä on eläinten hyvinvointiin liittyviä hyötyjä ja niillä mitataan objektiivisesti ihon herkistymisen induktiovaihetta.

5. Viime aikoina mekanistispohjaiset *in chemico*- ja *in vitro* -testimenetelmät on katsottu tieteellisesti päteviksi menetelmiksi ihon herkistymisen haittavaikutusreitin ensimmäisen keskeisen tapahtuman (TM B.59; DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) (7)) ja toisen keskeisen tapahtuman (TM B.60; ARE-Nrf2-lusiferaasi-testimenetelmä (8)) osalta ihon herkistymiseen liittyvän kemikaalien vaarallisuuden arvioinnissa.

6. Tässä testimenetelmässä kuvatuilla testeillä joko kvantifioidaan muutosta solun pintamerkkiaineen (-aineiden) ilmentymisessä, joka liittyy monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumiseen herkistäville aineille altistumisen jälkeen (esim. CD54, CD86), tai muutoksia IL-8:n, dendriittisolujen aktivoitumiseen liittyvän sytokiinin, ilmentymisessä. Ihoa herkistävien aineiden on ilmoitettu indusoivan solukalvon merkkiaineiden (esim. CD40, CD54, CD80, CD83 ja CD86) ilmentymistä sen lisäksi, että ne indusoivat myös proinflammatorisia sytokiineja, kuten IL-1β:aa ja TNF-α:aa, ja useita kemokiinejä, kuten IL-8:aa (CXCL8) ja CCL3:a (9) (10) (11) (12), jotka liittyvät dendriittisolujen aktivoitumiseen (2).

7. Koska dendriittisolujen aktivoituminen on kuitenkin vain yksi keskeinen tapahtuma ihon herkistymisen haittavaikutusreitissä (2) (13), niistä testeistä saadut tiedot, joissa mitataan pelkästään dendriittisolujen aktivoitumisen merkkiaineita, eivät välttämättä riitä siihen, että kemikaalien ihoa herkistävästä vaikutuksesta tai sen puuttumisesta voitaisiin tehdä päätelmiä. Siksi tässä testimenetelmässä kuvatuilla testeillä tuotettuja tietoja suositellaan käytettäväksi tukevina tietoina ihoa herkistävien (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) ja herkistämättömien aineiden erottelussa testauksen ja arvioinnin yhdennettyjen lähestymistapojen (IATA) mukaisesti yhdistämällä ne muihin täydentäviin tietoihin. Ne voivat olla tietoja, jotka on saatu *in vitro* -testeillä, joissa tutkitaan ihon herkistymisen haittavaikutusreitin muita keskeisiä tapahtumia, sekä testittömillä menetelmillä, joihin kuuluu muun muassa interpolointi (read-across) samankaltaisista kemikaaleista (13). Esimerkkejä näillä testeillä tuotettujen tietojen käytöstä määritettyjen lähestymistapojen (jotka on standardoitu sekä käytettävien tiedonlähteiden että ennusteiden johtamisessa tietoihin sovellettavien menettelyjen osalta) mukaisesti on julkaistu (13), ja niitä voidaan käyttää hyödyllisinä elementteinä IATAn mukaisesti.

8. Tässä testimenetelmässä kuvattuja testejä ei voida käyttää yksinään ihoa herkistävien aineiden luokittelemiseen YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokkiin 1A ja 1B (ne viranomaiset, jotka käyttävät näitä kahta valinnaista alaluokkaa) eikä niiden vaikutuksen ennustamiseen turvallisuuden arviointiin liittyvää päätöksentekoa varten. Sääntelykehyksen mukaan näillä menetelmillä saatuja positiivisia tuloksia voidaan kuitenkin käyttää yksinään kemikaalin luokittelussa YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokkaan 1.

▼M8

9. Tässä testimenetelmässä käytetyllä ilmauksella ’testikemikaali’ tarkoitetaan sitä, mitä testataan ([1]), eikä ilmaus liity siihen, voidaanko testejä käyttää yhdestä tai useammasta ainesosasta koostuvien aineiden ja/tai seosten testaamiseen. Testien käytettävyydestä useasta ainesosasta koostuvien aineiden/seosten testaamiseen on tällä hetkellä niukalti tietoa (14) (15). Teknisesti testejä voidaan kuitenkin käyttää useasta ainesosasta koostuvien aineiden ja seosten testaamiseen. Ennen kuin tätä testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen tietojen tuottamiseksi aiottuun sääntelytarkoitukseen, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi ([2]). Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa. Lisäksi useasta ainesosasta koostuvia aineita tai seoksia testattaessa pitää ottaa huomioon sytotoksisten ainesosien mahdollinen häiritsevä vaikutus havaittuihin vasteisiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavana osoitteessa https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html.

(2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En.

(3) Tämän liitteen B.42 luku: Paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä.

(4) Tämän liitteen B.6 luku: Ihon herkistyminen.

(5) Tämän liitteen B.50 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: DA.

(6) Tämän liitteen B.51 luku: Ihoherkistys: paikallinen imusolmukemääritysmenetelmä: BrdU-ELISA.

(7) Tämän liitteen B.59 luku: In chemico -ihoherkistys: DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay).

(8) Tämän liitteen B.60 luku: *In vitro* -ihoherkistys: ARE-Nrf2-lusiferaasitestimenetelmä.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271–96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841–7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031–8.

([1]) Kesäkuussa 2013 pidetyssä OECD:n yhteisessä kokouksessa sovittiin, että ilmausta ”testikemikaali” olisi käytettä aina kun mahdollista aiempaa yhdenmukaisemmin uusissa ja päivitettävissä OECD:n testiohjeissa kuvaamaan sitä, mitä testataan.

([2]) Tätä virkettä ehdotettiin ja se hyväksyttiin kansallisten koordinaattorien työryhmän kokouksessa huhtikuussa 2014.

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390–8.

(13) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275–284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

▼**M8**

Lisäys 1

IN VITRO -IHOHERKISTYS: IHMISEN SOLULINJAAN PERUSTUVA AKTIVOINTITESTI (H-CLAT, HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST)

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. h-CLAT-testissä kvantifioidaan muutokset niiden solujen pintamerkkiaineiden ilmentymisessä, jotka liittyvät monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumisprosessiin (ts. CD86 ja CD54), ihmisen monosyyttileukemiasolulinjassa THP-1 herkistäville aineille altistuksen jälkeen (1) (2). Sen jälkeen solujen CD86- ja CD-54-pintamerkkiaineiden mitattuja ilmentymistasoja käytetään tukemaan ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua.

2. h-CLAT-testi on arvioitu Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen vertailulaboratorion (EURL ECVAM) koordinoimassa validointitutkimuksessa ja sen jälkeen tehdyssä riippumattomassa vertaisarvioinnissa, jonka teki EURL ECVAMin tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC). Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella EURL ECVAM suositteli (3), että h-CLAT-testiä käytetään IATAn osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Kirjallisuudessa annetaan esimerkkejä siitä, miten h-CLAT-testillä saatuja tietoja on käytetty muihin tietoihin yhdistettyinä (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. On osoitettu, että h-CLAT on siirrettävissä sellaisten laboratorioiden välillä, joissa on kokemusta soluviljelytekniikoista ja virtaussytometria-analyysista. Testistä odotettavien ennusteiden laboratorioiden sisäinen ja niiden välinen toistettavuus on 80 prosentin luokkaa (3) (12). Validointitutkimuksesta (13) ja muista julkaistuista tutkimuksista (14) saadut tulokset osoittavat, että LLNA-testin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 85 prosenttia (N=142), herkkyys on 93 prosenttia (94/101) ja spesifisyys 66 prosenttia (27/41) (EURL ECVAMin tekemän uudelleenanalyysin (12) perusteella, kun otetaan huomioon kaikki olemassa oleva tiedot paitsi negatiiviset tulokset niistä kemikaaleista, joiden Log Kow -arvo on suurempi kuin 3,5 4 kohdassa kuvatun mukaisesti). h-CLAT-testistä saatavat väärät negatiiviset ennusteet koskevat todennäköisemmin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on pieni tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (4) (13) (15). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että h-CLAT-menetelmää voidaan käyttää apuna ihon herkistymisvaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat h-CLAT-menetelmän käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

4. Tällä hetkellä saatavana olevien tietojen perusteella on osoitettu, että h-CLAT-menetelmää voidaan käyttää testattaessa kemikaaleja, jotka kuuluvat moniin orgaanisiin funktionaalisiin ryhmiin, joilla on monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden ihoherkistyspotentiaaleissa on suuria eroja (in vivo -tutkimusten mukaan) ja joilla on monenlaisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia (3) (14) (15). h-CLAT-menetelmä soveltuu testikemikaaleille, jotka liukenevat tai muodostavat stabiilin dispersion (ts. kolloidin tai suspension, jossa testikemikaali ei sakkaudu tai separoidu liuottimesta/kantaja-aineesta eri faseihin) asianmukaisessa liuottimessa/kantaja-aineessa (ks. 14 kohta). Testikemikaalit, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, antavat helposti vääriä negatiivisia tuloksia (14). Siksi niistä testikemikaaleista saatuja negatiivisia tuloksia, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, ei tule ottaa huomioon. Sen sijaan näistä

▼M8

testikemikaaleista saatuja positiivisia tuloksia, joiden Log Kow -arvo on yli 3,5, voidaan käyttää tukemaan testikemikaalin määrittämistä ihoa herkistäväksi aineeksi. Lisäksi käytetyn solulinjan rajallisen metabolointikyvyn (16) ja koeolosuhteiden vuoksi myös prohapteenit (eli aineet, jotka vaativat entsymaattista aktivointia esimerkiksi P450-entsyymien kautta) ja prehapteenit (eli aineet, jotka hapetus aktivoi) voivat antaa h-CLAT-testissä negatiivisia tuloksia varsinkin hapettumisvauhdin ollessa hidas (15). Fluoresoivia testikemikaaleja voidaan arvioida h-CLAT-testillä (17), mutta voimakkaasti fluoresoivat testikemikaalit, jotka emittoivat samalla aallonpituudella kuin fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) tai propidiumjodidi (PI), häiritsevät virtaussytometristä tutkimusta, eikä niitä siis voida arvioida oikein FITC-konjugoituja vasta-aineita tai propidiumjodidia käyttämällä. Tässä tapauksessa voidaan käyttää muita fluorokromilla leimattuja vasta-aineita tai muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kunhan voidaan osoittaa, että ne tuottavat samanlaiset tulokset kuin FITC-leimatut vasta-aineet (ks. 24 kohta) tai propidiumjodidi (ks. 18 kohta) esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet (lisäys 1 ja 2). Edellä esitetyn perusteella negatiivisia tuloksia on tulkittava ilmoitettujen rajoitusten valossa ja muiden tietolähteiden perusteella IATAn puitteissa. Jos voidaan osoittaa, ettei h-CLAT-menetelmä sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, testimenetelmää ei pidä käyttää niihin.

5. Kuten edellä on todettu, h-CLAT-menetelmä auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa. Siitä voi kuitenkin myös olla apua herkistyspotentiaalin (4) (5) (9) arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten h-CLAT-menetelmän tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa.

6. Määritelmät esitetään lisäyksessä 1.1.

TESTIN PERIAATE

7. hCLAT-menetelmä on in vitro -testi, jolla kvantifioidaan solun pintamerkkiaineen (CD86 ja CD54) ilmentymisen muutokset ihmisen monosyyttileukemian solulinjassa (THP-1-solut) 24 tunnin pituisen testikemikaalille altistuksen jälkeen. Nämä pintamolekyylit ovat tyypillisiä monosyyttisten THP-1-solujen aktivoitumisen merkkiaineita, ja ne voivat jäljitellä dendriittisolujen aktivoitumista, jolla on merkittävä tehtävä T-solujen virittymisessä (priming). Pintamerkkiaineiden ilmentymisen muutoksia mitataan virtaussytometrilla sen jälkeen, kun solut on ensin värjätty fluorokromilla leimatuilla vasta-aineilla. Samaan aikaan mitataan myös sytotoksisuus, jotta voidaan arvioida, tapahtuuko pintamerkkiaineiden ilmentymisen ylössäätelyä (upregulation) sytotoksisuutta pienemmillä pitoisuuksilla. Pintamerkkiaineiden suhteellinen fluoresenssin intensiteetti liuotin-/kantaja-ainekontrolliin verrattuna lasketaan, ja sitä käytetään ennustemallina (ks. 26 kohta) tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemista.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

8. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 1.2 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla. Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettävä tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 11 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 20–22 kohta) saadut aiemmat tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

▼M8

MENETTELY

9. Tämä testi perustuu eläinkokeiden vaihtoehtoisia menetelmiä koskevan h-CLAT-tietokantapalvelun (DB-ALM) protokollaan nro 158 (18). Tätä protokollaa käytettiin EURL ECVAMin koordinoimassa validointitutkimuksessa. Suosituksena on käyttää tätä protokollaa, kun h-CLAT-menetelmä otetaan käyttöön ja kun sitä käytetään laboratoriossa. Jäljempänä kuvataan h-CLAT-menetelmän keskeiset osat ja menettelyt. Menetelmässä on kaksi vaihetta: *annoksenmääritystesti* ja *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaaminen*.

Solujen valmistelu

10. h-CLAT-menetelmässä on käytettävä ihmisen monosyyttileukemiasoluista koostuvaa solulinjaa (THP-1). Solut (TIB-202™) on suositeltavaa hankkia korkeatasoisesta solupankista, jollainen on esimerkiksi American Type Culture Collection.

11. THP-1-soluja viljellään (olosuhteet: 37°C, hiilidioksidipitoisuus 5 %, kosteutettu ilma) RPMI-1640-kasvatusliuoksessa, johon on lisätty 10 % naudan sikiön verestä valmistettua seerumia (FBS), 0,05 mM 2-merkaptoetanolia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Penisilliinin ja streptomysiinin käyttö kasvatusliuoksessa voidaan välttää. Siinä tapauksessa käyttäjien on kuitenkin varmistettava, ettei antibioottien puuttuminen kasvatusliuoksesta vaikuta tuloksiin, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Jotta kontaminaation riski pidetään mahdollisimman pienenä, on noudatettava hyviä soluviljelykäytäntöjä riippumatta siitä, onko soluviljelyliuoksessa antibiootteja vai ei. THP-1-solut kylvetään tavallisesti 2–3 päivän välein tiheyteen 0,1–0,2 × 10^6 solua/ml. Niitä on ylläpidettävä tiheydellä 0,1–1,0 × 10^6 solua/ml. Ennen kuin soluja käytetään testauksessa, niiden laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Solujen reaktiivisuustesti on tehtävä käyttämällä positiivisia kontrolleja, (2,4-dinitroklooribentseeni (DNCB) (CAS-nro 97-00-7, puhtaus ≥ 99 %) ja nikkelisulfaatti ($NiSO_4$) (CAS-nro 10101-97-0, puhtaus ≥ 99 %)) ja negatiivista kontrollia (maitohappo (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %)), kahden viikon kuluessa sulatuksesta. Sekä DNCB:n että $NiSO_4$:n pitäisi tuottaa positiivinen vaste sekä CD86- että CD54-pintamerkkiaineille, ja maitohapon pitäisi tuottaa negatiivinen vaste niille kummallekin. Testissä saa käyttää vain soluja, jotka läpäisevät reaktiivisuustestin. Soluja voidaan kasvattaa enintään kaksi kuukautta sulatuksen jälkeen. Siirrostuksia saa olla enintään 30. Reaktiivisuustesti on tehtävä 20–24 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

12. Testausta varten THP-1-solujen kylvötiheyden on oltava joko 0,1 × 10^6 solua/ml tai 0,2 × 10^6 solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa joko 72 tai 48 tuntia. On tärkeää, että solujen tiheys on viljelypullossa mahdollisimman tasainen heti esiviljelyn jälkeen jokaisessa kokeessa (käyttämällä jompaakumpaa edellä esitetyistä esiviljelyehdoista), koska solujen tiheys viljelypullossa heti esiviljelyn jälkeen voi vaikuttaa allergeenien aiheuttamaan CD86:n/CD54:n ilmentymiseen (19). Testauspäivänä viljelypullosta otetut solut on resuspendoitava tuoreella kasvatusliuoksella tiheyteen 2 × 10^6 solua/ml. Sen jälkeen solut jaetaan 24-kuoppaiselle tasapohjaiselle levylle (500 µl, 1 × 10^6 solua/kuoppa) tai 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle levylle (80 µl 1,6 × 10^5 solua/kuoppa).

Annoksenmääritystesti

13. *Annoksenmääritystestillä* määritetään CV75-arvo eli se testikemikaalin pitoisuus, jolla solujen elinkyvyksi (CV, cell viability) saadaan 75 prosenttia verrattuna liuotin-/kantaja-ainekontrolliin. CV75-arvon avulla määritetään testikemikaalien pitoisuus *CD86:n/CD54:n* ilmentymisen mittauksessa (ks. 20–24 kohta).

▼**M8**

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

14. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. h-CLAT-menetelmässä testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti (ks. myös 4 kohta) suolaliuokseen tai kasvatusliuokseen ensimmäisenä liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona tai dimetyylisulfoksidiin (DMSO, ≥ puhtaus 99 %) toisena liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona, jos testikemikaali ei liukene tai muodosta stabiilia dispersiota kahdessa ensin mainitussa liuottimessa/kantaja-aineessa. Lopulliset pitoisuudet ovat 100 mg/ml (suolaliuoksessa tai kasvatusliuoksessa) tai 500 mg/ml (DMSO:ssa). Muita kuin edellä mainittuja liuottimia/kantaja-aineita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut. Testikemikaalin stabiilisuus lopullisessa liuottimessa/kantaja-aineessa on otettava huomioon.

15. Laimentaminen on tehtävä seuraavien vaiheiden mukaisesti aloittamalla testikemikaalien varastoliuospitoisuuksista 100 mg/ml (suolaliuos tai kasvatusliuos) tai 500 mg/ml (DMSO):

— Liuottimena/kantaja-aineena suolaliuos tai kasvatusliuos: Valmistetaan kahdeksan varastoliuosta (kahdeksan pitoisuutta) kaksinkertaisella sarjalaimennoksella asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta käyttämällä. Nämä varastoliuokset laimennetaan sen jälkeen 50-kertaisesti kasvatusliuokseen (työliuokset). Jos levyn suurin loppupitoisuus 1 000 µg/ml ei ole toksinen, enimmäispitoisuus on määritettävä uudelleen tekemällä uusi sytotoksisuustesti. Levyn loppupitoisuus saa olla enintään 5 000 µg/ml suolaliuokseen tai kasvatusliuokseen liuenneiden tai stabiilisti dispergoituneiden testikemikaalien yhteydessä.

— Liuottimena/kantaja-aineena DMSO: Valmistetaan kahdeksan varastoliuosta (kahdeksan pitoisuutta) kaksinkertaisella sarjalaimennoksella asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta käyttämällä. Nämä varastoliuokset laimennetaan sen jälkeen 250-kertaisesti kasvatusliuokseen (työliuokset). Levyn enimmäispitoisuus saa olla enintään 1 000 µg/ml, vaikka tämä pitoisuus ei olisi toksinen.

Työliuoksia käytetään altistukseen siten, että levyllä olevaan THP-1-solususpensioon lisätään yhtä suuri tilavuus työliuosta (ks. myös 17 kohta), jotta saadaan vielä toinen kaksinkertainen laimennos (levyn loppupitoisuus vaihtelee yleensä välillä 7,81–1 000 µg/ml).

16. h-CLAT-menetelmässä käytettävä liuotin-/kantaja-ainekontrolli on kasvatusliuos (ne testikemikaalit, jotka liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti (ks. 4 kohta) joko kasvatusliuokseen tai suolaliuokseen) tai DMSO (ne testikemikaalit, jotka liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti DMSO:hon), ja levyllä testattava yksi loppupitoisuus on 0,2 prosenttia. Tälle kontrollille tehdään samat laimennokset kuin työliuoksille (ks. 15 kohta).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

17. Kasvatusliuos tai työliuokset (ks. 15 ja 16 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 24- tai 96-kuoppaisella tasapohjaisella levyllä (ks. 12 kohta). Käsitellyt levyt inkuboidaan 24±0,5 tuntia 37°C:ssa (hiilidioksidipitoisuus 5 %). Haihtuvien testikemikaalien höyrystymistä ja testikemikaalien aiheuttamaa kuoppien välistä ristikontaminaatiota on vältettävä esimerkiksi peittämällä levy kalvolla ennen inkubointia testikemikaalien kanssa (20).

▼**M8**

Propidiumjodidi (PI) -värjäys

18. Altistuksen (24±0,5 h) jälkeen solut siirretään näyteputkiin ja kerätään sentrifugoimalla. Supernatantit hävitetään ja loput solut resuspendoidaan 200 µl:lla (96-kuoppainen levy) tai 600 µl:lla (24-kuoppainen levy) fosfaattipuskuroitua suolaliuosta, joka sisältää 0,1-prosenttista naudan seerumin albumiinia (värjäyspuskuria). Solususpensiosta 200 µl siirretään 96-kuoppaiselle pyöreäpohjaiselle levylle (96 kuopan osalta) tai mikroputkiin (24 kuopan osalta) ja pestään kahdesti 200 µl:lla (96 kuopan osalta) tai 600 µl:lla (24 kuopan osalta) värjäyspuskuria. Lopuksi solut resuspendoidaan värjäyspuskuriin (esim. 400 µl) ja PI-liuosta lisätään (esim. 20 µl) (esimerkki: PI-liuoksen loppupitoisuus on 0,625 µg/ml). Muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kuten 7-aminoaktinomysiini D:tä (7-AAD) ja trypaanisinistä tms., voidaan käyttää, jos vaihtoehtoisilla värjäysaineilla voidaan osoittaa saatavan samanlaisia tuloksia kuin PI-liuoksella, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet.

Sytotoksisuuden mittaus virtaussytometrialla ja CV75-arvon määrittäminen

19. Propidiumjodidin kertymä analysoidaan virtaussytometrilla kanavalla FL-3. Yhteensä kerätään 10 000 elävää solua (PI-negatiivinen). Solujen elinkyky voidaan laskea seuraavalla sytometrianalyysiohjelman yhtälöllä. Jos solujen elinkyky on pieni, on kerättävä enintään 30 000 solua, myös kuolleita soluja. Vaihtoehtoisesti tiedot voidaan kerätä minuutin kuluttua analyysin aloittamisesta.

$$Solun\ elinkyky = \frac{Elävien\ solujen\ määrä}{Kerättyjen\ solujen\ kokonaismäärä} \times$$

CV75-arvo (ks. 13 kohta), eli pitoisuus, jolla 75 prosenttia THP-1-soluista jää eloon (25 prosentin sytotoksisuus), lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttäen seuraavaa yhtälöä:

$$Log\ CV75 = \frac{(-c) \times Log(b) - (-a) \times Log(d)}{a - c}$$

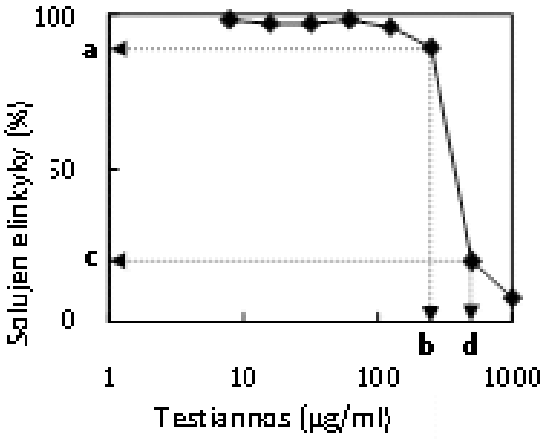
Jossa:

a on solujen elinkyvyn minimiarvo, joka on enemmän kuin 75 prosenttia

c on solujen elinkyvyn maksimiarvo, joka on vähemmän kuin 75 prosenttia

b ja d ovat pitoisuudet, jotka osoittavat solujen elinkykyarvot a ja c.

▼M8



CV75-arvon johtamisessa voidaan käyttää myös muita lähestymistapoja, kunhan voidaan osoittaa, ettei se vaikuta tuloksiin (esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita).

CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaaminen

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

20. Testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti asianmukaiseen liuottimeen/kantaja-aineeseen (suolaliuos, kasvatusliuos tai DMSO; ks. 14 kohta). Testikemikaalit laimennetaan ensin pitoisuuteen, joka vastaa 100-kertaisesti (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 500-kertaisesti (DMSO:n osalta) 1,2 × CV75 -arvoa, joka on määritetty *annoksenmääritystestissä* (ks. 19 kohta). Jos CV75-arvoa ei voida määrittää (ts. jos *annoksenmääritystestissä* ei havaita riittävää sytotoksisuutta), alkupitoisuutena on käytettävä testikemikaalin suurinta liukoista tai stabiilisti dispergoitua pitoisuutta, joka on valmistettu kullakin liuottimella/kantaja-aineella. Levyn loppupitoisuus saa kuitenkin olla enintään 5 000 µg/ml (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 1 000 µg/ml (DMSO:n yhteydessä). Sen jälkeen tehdään 1,2-kertaiset sarjalaimennokset käyttämällä asianmukaista liuotinta/kantaja-ainetta, jotta saadaan varastoliuokset (kahdeksan pitoisuutta välillä 100×1,2 × CV75 – 100×0,335 × CV75 (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai välillä 500×1,2 × CV75 – 500×0,335 × CV75 (DMSO:n yhteydessä)), jotka testataan h-CLAT-menetelmällä (ks. esimerkki annosteluohjeesta DB-ALM-protokollasta nro 158). Seuraavaksi varastoliuokset laimennetaan vielä 50-kertaiseksi (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 250-kertaiseksi (DMSO:n yhteydessä) kasvatusliuokseen (työliuokset). Näitä työliuoksia käytetään altistuksessa, ja levyllä käytetään lopullista laimennuskerrointa, joka on 2. Jos tulokset eivät täytä kohdassa 29 ja 30 kuvattuja hyväksymisperusteita solujen elinkyvyn osalta, *annoksenmääritystesti* voidaan toistaa, jotta CV75-arvo voidaan määrittää tarkemmin. CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittauksessa voidaan käyttää vain 24-kuoppaisia levyjä.

21. Liuotin-/kantaja-ainekontrolli valmistetaan 16 kohdassa kuvatulla tavalla. h-CLAT-menetelmässä käytettävä positiivinen kontrolli on DNCB (ks. 11 kohta), josta valmistetaan varastoliuokset DMSO:ssa. Ne laimennetaan 20 kohdassa varastoliuosten osalta kuvatun mukaisesti. *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaamisessa* DNCB:tä tulee käyttää positiivisena kontrollina yhtenä loppupitoisuutena levyllä (yleensä 4,0 µg/ml). Jotta DNCB:n pitoisuudeksi levylle saadaan 4,0 µg/ml, valmistetaan varastoliuos, joka sisältää 2 mg/ml DNCB:tä DMSO:ssa, ja tämä liuos laimennetaan 250-kertaiseksi kasvatusliuoksella siten, että lopputuloksena on työliuos, jonka pitoisuus on 8 µg/ml.

▼M8

Vaihtoehtoisesti positiivisen kontrollin pitoisuutena voidaan käyttää DNCB:n CV75-arvoa, joka määritetään jokaisessa testilaitoksessa. Myös muita sopivia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailukelpoiset ajon hyväksymisperusteet. Positiivisten kontrollien osalta levyn loppupitoisuus saa kuitenkin olla enintään 5 000 µg/ml (suolaliuoksen tai kasvatusliuoksen yhteydessä) tai 1 000 µg/ml (DMSO:n yhteydessä). Ajon hyväksymisperusteet ovat samat kuin testikemikaalille kuvatut (ks. 29 kohta), lukuun ottamatta viimeistä hyväksymisperustetta, sillä positiivinen kontrolli testataan yhtenä pitoisuutena.

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

22. Jokaisesta testikemikaalista ja kontrolliaineesta tarvitaan yksi koe, jotta saadaan ennuste. Jokainen koe koostuu vähintään kahdesta itsenäisestä ajosta, joissa mitataan *CD86:n/CD54:n ilmentymistä* (ks. 26–28 kohta). Kukin itsenäinen ajo tehdään eri päivänä tai samana päivänä, kunhan a) jokaiseen ajoon valmistetaan riippumattomat tuoreet varastoliuokset ja työliuokset testikemikaalista ja vasta-aineliuokset ja b) jokaisessa ajossa käytetään itsenäisiä kerättyjä soluja (ts. solut kerätään eri viljelypulloista), mutta solut voivat kuitenkin olla peräisin samasta siirrostuksesta. Testikemikaaleista ja kontrolliaineista valmistettuihin työliuoksiin (500 µl) sekoitetaan 500 µl suspendoituja soluja ($1x10^6$ solua) suhteessa 1:1, ja soluja inkuboidaan 24±0,5 h, kuten 20 ja 21 kohdassa on selostettu. Jokaisessa ajossa riittää yksi rinnakkaisnäyte testikemikaalin ja kontrolliaineen kustakin pitoisuudesta, koska ennuste tehdään vähintään kahden itsenäisen ajon perusteella.

Solujen värjäys ja analyysi

23. Altistuksen (24±0,5 h) jälkeen solut siirretään 24-kuoppaiselta levyltä näyteputkiin ja kerätään sentrifugoimalla. Sen jälkeen ne pestään kahdesti 1 ml:llä värjäyspuskuria (tarvittaessa pesukertoja voidaan lisätä). Pesun jälkeen solut estetään 600 µl:lla estoliuosta (värjäyspuskuri, joka sisältää 0,01 prosenttia (w/v) globuliinia (Cohn-fraktio II, III, ihminen; SIGMA, nro G2388-10G tai vastaava)) ja inkuboidaan 4°C:ssa 15 minuutin ajan. Estämisen jälkeen solut jaetaan kolmeen 180 µl:n alikvoottiin 96-kuoppaiselle pyöreäpohjaiselle levylle tai mikroputkeen.

24. Sentrifugoinnin jälkeen solut värjätään 50 µl:lla FITC-leimattua anti-CD86:ta, anti-CD54:ää tai hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla 4°C:ssa 30 minuutin ajan. h-CLAT-menetelmän DB-ALM-protokollassa nro 158 (18) kuvattuja vasta-aineita on käytettävä laimentamalla ne suhteeseen 3:25 v/v (CD86 (BD-PharMingen, nro 5556 57; klooni: Fun-1)) tai suhteeseen 3:50 v/v (CD54 (DAKO, nro F7143; klooni: 6.5B5) ja IgG1 (DAKO, nro X0927)) värjäyspuskurilla.Testin kehittäjät ovat määrittäneet nämä vasta-aineiden laimennuskertoimet sellaisiksi, että ne tuottavat parhaan signaali-kohinasuhteen. Testin kehittäjien kokemuksen perusteella vasta-aineiden fluoresenssin intensiteetti on yleensä yhdenmukainen erien välillä. Käyttäjät voivat kuitenkin määrittää parhaat käyttöpitoisuudet titraamalla vasta-aineet omissa laboratorio-olosuhteissaan tarvittaessa. Muita fluorokromilla leimattuja anti-CD86- ja/tai anti-CD54-vasta-aineita voidaan käyttää, jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia kuin FITC-konjugoidut vasta-aineet, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 1.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. On huomattava, että h-CLAT-menetelmän DB-ALM-protokollassa 158 (18) kuvatun kloonin tai

▼M8

vasta-aineen toimittajan vaihtaminen voi vaikuttaa tuloksiin. Kun solut on pesty vähintään kaksi kertaa 150 µl:lla värjäyspuskuria, ne resuspendoidaan värjäyspuskuriin (esim. 400 µl), ja siihen lisätään PI-liuosta (esim. 20 µl, jotta saadaan loppupitoisuus 0,625 µg/ml) tai muuta sytotoksisuuden merkkiaineliuosta (ks. 18 kohta). CD86:n ja CD54:n ilmentymistasot sekä solujen elinkyky analysoidaan virtaussytometrin avulla.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

25. CD86:n ja CD54:n ilmentyminen analysoidaan virtaussytometrilla kanavalla FL-1. Fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon (MFI) perusteella lasketaan CD86:n ja CD54:n suhteellinen fluoresenssin intensiteetti (RFI) positiivisen kontrollin (ctrl) solujen ja kemikaalilla käsiteltyjen solujen osalta seuraavalla yhtälöllä:

$$RFI = \frac{kemikaalilla\ käsitellyn\ solun\ MFI - kemikaalilla\ käsitellyn\ isotooppikontrollisolujen\ MFI}{liuotin/tai\ kantaja - ainekäs - kontr.solujen\ MFI\ -\ liuotin/tai\ kantaja - ainekäs.\ isotooppikontr.sol.MFI} \times 100$$

Myös solujen elinkyky - isotyyppikontrollin (ctrl) soluista (jotka on värjätty hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla) lasketaan 19 kohdassa kuvatulla yhtälöllä.

Ennustemalli

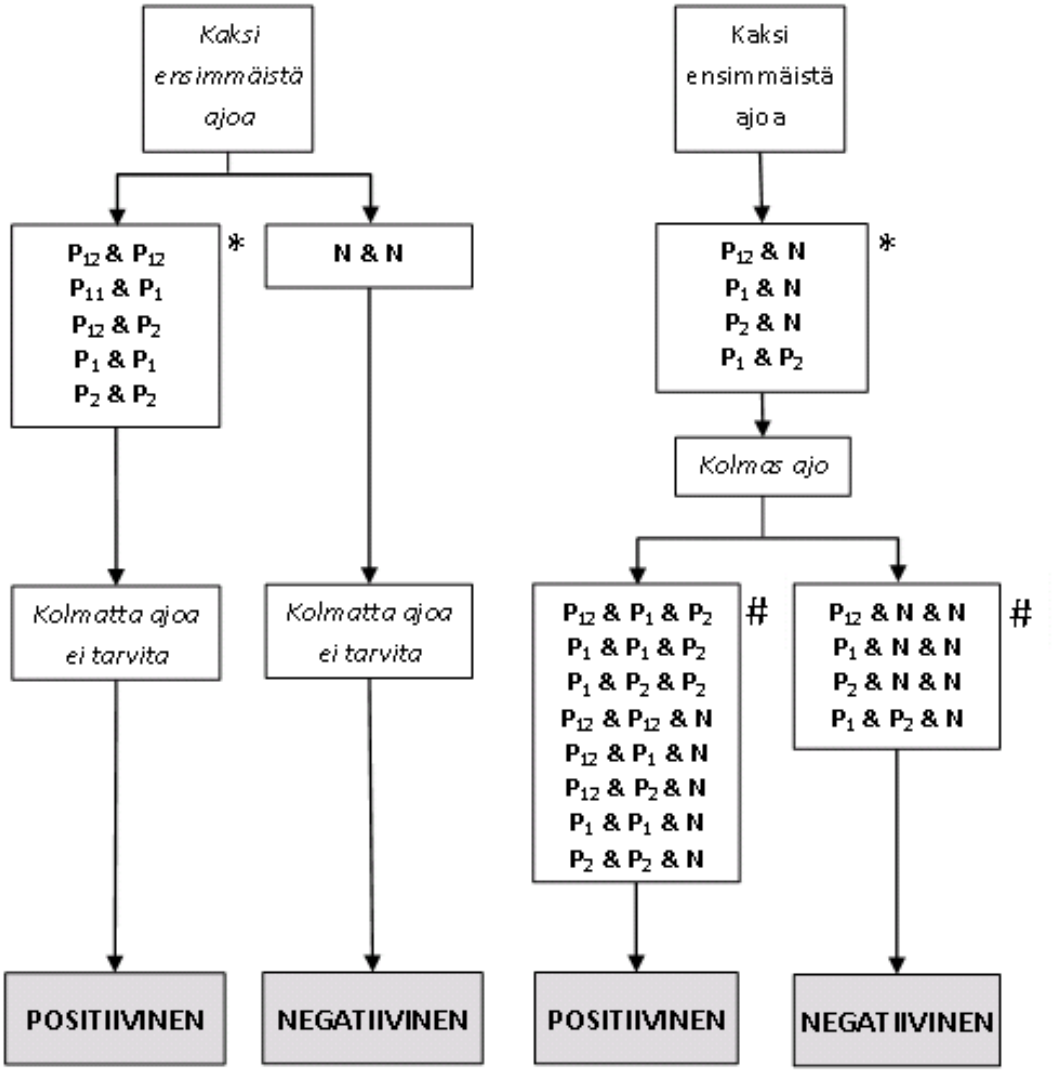
26. *CD86:n/CD54:n* ilmentymisen mittaamisessa jokainen testikemikaali testataan vähintään kahdessa itsenäisessä ajossa, jotta saadaan yksi ennuste (POSITIIVINEN tai NEGATIIVINEN). h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN, jos vähintään yksi seuraavista ehdoista täyttyy joko kummassakin kahdesta ajosta tai vähintään kahdessa kolmesta itsenäisestä ajosta. Muussa tapauksessa h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN (kuvio 1):

— CD86:n RFI on yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia millä tahansa testatulla pitoisuudella (kun solujen elinkyky on ≥ 50 %).

— CD54:n RFI on yhtä suuri tai suurempi kuin 200 prosenttia millä tahansa testatulla pitoisuudella (kun solujen elinkyky on ≥ 50 %).

27. Tämän perusteella on siis niin, että jos ensimmäiset kaksi ajoa antavat kumpainenkin positiivisen tuloksen CD86:lle ja/tai CD54:lle, h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä. Vastaavasti jos ensimmäiset kaksi ajoa antavat negatiivisen tuloksen kummankin merkkiaineen osalta, h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN (30 kohdan määräykset asianmukaisesti huomioon ottaen) eikä kolmatta ajoa tarvita. Jos ensimmäiset kaksi ajoa eivät kuitenkaan ole johdonmukaisia vähintään jommankumman merkkiaineen osalta (CD54 tai CD86), on tehtävä kolmas ajo ja lopullinen ennuste perustuu siihen, mikä on kolmen itsenäisen ajon enemmistötulos (eli kaksi ajoa kolmesta). Tältä osin on todettava, että jos tehdään kaksi itsenäistä ajoa ja toinen antaa positiivisen tuloksen vain CD86:lle (jäljempänä P_1) ja toinen antaa positiivisen tuloksen vain CD54:lle (jäljempänä P_2), on tehtävä kolmas ajo. Jos kolmas ajo antaa negatiivisen tuloksen kummallekin merkkiaineelle (jäljempänä N), h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN. Toisaalta jos kolmas ajo antaa positiivisen tuloksen jommallekummalle merkkiaineelle (P_1 tai P_2) tai kummallekin merkkiaineelle (jäljempänä P_{12}), h-CLAT-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN.

▼**M8**



Kuva 1: h-CLAT-menetelmässä käytetty ennustemalli. h-CLAT-ennustetta pitää tarkastella IATAn ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohtien määräysten valossa.

P_1: ajon tulos: vain CD86 positiivinen; P_2: ajon tulos: vain CD54 positiivinen; P_{12}: ajon tulos: sekä CD86 että CD54 positiivinen; N: ajon tulos: sekä CD86 että CD54 negatiivinen.

* Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät ensimmäisen kahden ajon tuloksista riippumatta järjestyksestä, jossa ne on voitu saada.

Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät kolmen ajon tuloksista ensimmäisestä kahdesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella. Nämäkään eivät kuvasta sitä järjestystä, jossa ne on voitu saada.

28. Niille testikemikaaleille, joiden on ennustettu olevan POSITIIVISIA h-CLAT-menetelmällä, voidaan haluttaessa määrittää kaksi vaikuttavaa pitoisuutta (EC) (EC150-arvo CD86:lle ja EC200-arvo CD54:lle). Tämä on siis se pitoisuus, jolla testikemikaalit indusoivat RFI-arvon 150 tai 200. Näistä EC-arvoista voi olla apua myös herkistyspotentiaalin (9) arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa (4) (5) (6) (7) (8). Ne voidaan laskea seuraavilla yhtälöillä:

▼**M8**

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

jossa

A_{pit} on pienin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun RFI > 150 (CD86) tai 200 (CD54)

B_{pit} on suurin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun RFI < 150 (CD86) tai 200 (CD54)

A_{RFI} on RFI pienimmällä pitoisuudella, kun RFI > 150 (CD86) tai 200 (CD54)

B_{RFI} on RFI suurimmalla pitoisuudella, kun RFI < 150 (CD86) tai 200 (CD54)

Jos halutaan tarkemmat EC150- ja EC200-arvot, *CD86:n/CD54:n ilmentymisen mittaamisessa* voidaan tarvita kolme itsenäistä ajoa. Lopulliset EC150- ja EC200-arvot määritetään kolmesta itsenäisestä ajosta laskettujen EC-arvon mediaaniksi. Jos vain kaksi kolmesta itsenäisestä ajosta täyttää positiivisen tuloksen kriteerit (ks. 26 ja 27 kohta), kahdesta lasketusta EC150- tai EC200-arvoista hyväksytään suurempi arvo.

Hyväksymisperusteet

29. Seuraavien hyväksymisperusteiden on täytyttävä h-CLAT-menetelmää käytettäessä (22) (27).

— Kasvatusliuos- ja liuotin-/kantaja-ainekontrollien solujen elinkyvyn pitää olla suurempi kuin 90 prosenttia.

— Liuotin-/kantaja-ainekontrollissa sekä CD86:n että CD54:n RFI-arvot eivät saa ylittää positiivisen tuloksen kriteerejä (CD86:n RFI ≥ 150 % ja CD54:n RFI ≥ 200 %). Liuotin-/kantaja-ainekontrollin RFI-arvot lasketaan käyttämällä 25 kohdassa kuvattua yhtälöä (”kemikaalin MFI” on korvattava ”liuottimen/kantaja-aineen MFI:llä” ja ”liuottimen/kantaja-aineen MFI” on korvattava ”(kasvatusliuos)kontrollin MFI:llä”).

— Sekä kasvatusliuos- että liuotin-/kantaja-ainekontrolleissa CD86:n ja CD54:n MFI:n suhteessa isotyyppikontrolliin on oltava > 105 %.

— Positiivisessa kontrollissa (DNCB) sekä CD86:n että CD54:n RFI-arvojen on täytettävä positiivisen tuloksen kriteerit (CD86:n RFI ≥ 150 ja CD54:n RFI ≥ 200), ja solujen elinkyvyn on oltava yli 50 %.

— Testikemikaalin osalta solujen elinkyvyn on oltava yli 50 prosenttia vähintään neljässä testatusta pitoisuudesta jokaisessa ajossa.

30. Negatiiviset tulokset hyväksytään vain sellaisista testikemikaaleista, joiden yhteydessä solujen elinkyky on alle 90 prosenttia suurimmalla testatulla pitoisuudella (ts. 1,2 × CV75 20 kohdassa kuvatun sarjalaimennoksen mukaisesti). Jos solujen elinkyky on kaavalla 1,2 × CV75 yhtä kuin tai suurempi kuin 90 prosenttia, negatiivinen tulos on hylättävä. Tässä tapauksessa on suositeltavaa yrittää täsmentää annoksen valintaa toistamalla CV75-määritys. On kuitenkin muistettava, että kun testikemikaalin enimmäispitoisuutena testissä käytetään pitoisuutta 5 000 µg/ml suolaliuoksessa (tai kasvatusliuoksessa tai muissa liuottimissa/kantaja-aineissa), pitoisuutta 1 000 µg/ml DMSO:ssa tai suurinta liukoista pitoisuutta, negatiivinen tulos on hyväksyttävä, vaikka solujen elinkyky on yli 90 prosenttia.

▼M8

Testiraportti

31. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot.

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, Log Kow, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, Log K_{ow}, vesiliukoisuus, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

▼**M8**

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksymisperusteista.

Negatiivinen ja liuotin-/kantaja-ainekontrolli

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos käytettävät liuottimet/kantaja-aineet ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testiolosuhteet

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testistä

— käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)

— käytetty virtaussytometri (esim. malli), myös laiteasetukset sekä tiedot globuliinista, vasta-aineista ja sytotoksisuuden merkkiaineista, joita testissä käytettiin

— menettely, jolla osoitettiin laboratorion pätevyys testin tekemisessä testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita, ja menettely, jolla osoitettiin testin suorituskyvyn toistettavuus pidemmällä aikavälillä, esim. aikaisemmat kontrollitiedot ja/tai aikaisempien reaktiivisuustestien tiedot.

Testin hyväksymisperusteet

— solujen elinkyky sekä liuotin-/kantaja-ainekontrollista saadut MFI- ja RFI-arvot verrattuna hyväksyttävyysalueisiin

— solujen elinkyky sekä positiivisesta kontrollista saadut RFI-arvot verrattuna hyväksyttävyysalueisiin

— solujen elinkyky kaikilla testatun kemikaalin testatuilla pitoisuuksilla.

▼**M8**

Testimenettely

— tehtyjen ajojen lukumäärä

— testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja käytetty altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— tietojen taulukointi: CV75 (tarvittaessa), yksittäiset geometriset MFI-, RFI- ja solujen elinkykyarvot, EC150/EC200-arvot (tarvittaessa) testikemikaalista ja positiivisesta kontrollista jokaisesta ajosta ja tieto testikemikaalin luokituksesta ennustemallin perusteella

— tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

— h-CLAt-menetelmällä saatujen tulosten tarkastelu

— testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767–773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428–437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Saatavana osoitteessa https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318–1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333–1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489–504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371–379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337–351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355–2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150–60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Saatavana osoitteessa https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Saatavana osoitteessa https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599–609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275–284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683–1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6^{th} report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81–88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), s. 23. Saatavana osoitteessa http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70–82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7^{th} report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89–96.

(21) OECD (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

(22) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No 168. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

(23) United Nations UN (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27–35.

▼M8

Lisäys 1.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (22).

Kemikaali: Aine tai seos.

CV75: Arvioitu pitoisuus, jolla solujen elinkyky on 75 prosenttia.

EC150: Pitoisuudet, joilla CD86:n ilmentymisen RFI-arvo on 150.

EC200: Pitoisuudet, joilla CD54:n ilmentymisen RFI-arvo on 200.

Virtaussytometria: Sytometrinen tekniikka, jossa nesteeseen suspendoidut solut virtaavat yksi kerrallaan niihin kohdistetun valon läpi, ja valo sirottuu soluille ja niiden osille ominaisella tavalla. Solut usein leimataan fluoresoivilla merkkiaineilla, jolloin valo ensin absorboituu ja sen jälkeen emittoituu muuttuneilla taajuuksilla.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment), yhdennetty lähestymistapa testaamiseen ja arviointiin: Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Kasvatusliuoskontrolli: Käsittelemätön rinnakkaisnäyte, joka sisältää kaikki testijärjestelmän osat. Tämä näyte prosessoidaan testikemikaalilla käsiteltyjen näytteiden ja muiden kontrollinäytteiden kanssa, jotta voidaan määrittää, vaikuttaako liuotin/kantaja-aine testijärjestelmään.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat $\geq$ 10 painoprosenttia ja $<$ 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

▼**M8**

Positiivinen kontrolli: Rinnakkaisnäyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Suhteellinen fluoresenssin intensiteetti (RFI): Kemikaaleilla käsiteltyjen solujen fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon suhteelliset arvot verrattuna liuottimella/kantaja-aineella käsiteltyjen solujen MFI-arvoon.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja halutun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testimenetelmän tarkkuus (vastaavuus) (21).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (21).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (21).

Värjäyspuskuri: Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, joka sisältää 0,1 prosenttia naudan seerumin albumiinia.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen/kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (21).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

▼M8

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (myös työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (23).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testi: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (21).

▼**M8**

Lisäys 1.2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen h-CLAT-ennuste kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla CV75-, EC150- ja EC200-arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu edustamaan erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaroihin. Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, jotka on tuotettu h-CLAT-menetelmällä. Myös h-CLAT-menetelmästä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (3) (14).

Taulukko 1

Suositellut aineet h-CLAT-menetelmää koskevan teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -ennuste [1]	CV75-viitealue yksikössä µg/ml [2]	h-CLAT-tulokset CD86:n osalta (EC150-viitealue yksikössä µg/ml) [2]	h-CLAT-tulokset CD54:n osalta (EC200-viitealue yksikössä µg/ml) [2]
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Herkistävä (erittäin voimakas)	2–12	Positiivinen (0,5–10)	Positiivinen 0,5-15
4-fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	5–95	Positiivinen (<40)	Negatiivinen (>1,5) [3]
Nikkelisulfaatti	10101-97-0	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	30–500	Positiivinen (<100)	Positiivinen (10–100)
2-merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	30–400	Negatiivinen (>10) [3]	Positiivinen (10–140)
R(+)-limoneeni	5989-27-5	Neste	Herkistävä (heikko)	>20	Negatiivinen (>5) [3]	Positiivinen (<250)
Imidatsolidinyyliurea	39236-46-9	Kiinteä	Herkistävä (heikko)	25–100	Positiivinen (20–90)	Positiivinen (20–75)
Isopropanoli	67-63-0	Neste	Herkistämätön	>5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
Glyseroli	56-81-5	Neste	Herkistämätön	>5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
Maitohappo	50-21-5	Neste	Herkistämätön	1 500–5 000	Negatiivinen (>5 000)	Negatiivinen (>5 000)
4-aminobentsoehappo	150-13-0	Kiinteä	Herkistämätön	>1 000	Negatiivinen (>1 000)	Negatiivinen (>1 000)

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) *In vivo* -riski ja (vaikutuskykyä koskevat) ennusteet perustuvat LLNA-tietoihin (3) (14). *In vivo* -vaikutuskyky johdetaan ECETOCin ehdottamien kriteerien pohjalta (24).

(2) Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (13) (25).

(3) Aikaisemmin suurin osa negatiivista tuloksista on saatu tälle merkkiaineelle, ja sen takia negatiivinen tulos on odotuksenmukaisin. Esitetty alue määriteltiin muutaman aikaisemmin saadun positiivisen tuloksen perusteella. Jos saadaan positiivinen tulos, EC-arvon on oltava ilmoitetulla viitealueella.

▼**M8**

Lisäys 2

IN VITRO -IHOHERKISTYS: U937-SOLULINJAAN PERUSTUVA AKTIVOINTITESTI (U-SENS™)

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. U-SENS™-testissä kvantifioidaan muutokset sellaisen solun pintamerkkiaineen ilmentymisessä, joka liittyy monosyyttien ja dendriittisolujen aktivoitumisprosessiin (ts. CD86), ihmisen histiosyyttisessa lymfoomasolulinjassa U937 herkistäville aineille altistuksen jälkeen (1). Sen jälkeen solulinjassa U937 CD86-pintamerkkiaineen mitattuja ilmentymistasoja käytetään tukemaan ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua.

2. U-SENS™-testi on arvioitu L'Orealin koordinoimassa validointitutkimuksessa (2) ja sen jälkeen tehdyssä riippumattomassa vertaisarvioinnissa, jonka teki Euroopan vaihtoehtoisten tutkimusmenetelmien keskuksen vertailulaboratorion (EURL ECVAM) tieteellinen neuvoa-antava komitea (ESAC) (3). Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella EURL ECVAM suositteli (4), että U-SENS™-testiä käytetään IATAn osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Ohjeasiakirjassaan, joka koskee ihon herkistymiseen liittyvien IATAn osana käytettyjen tietojen integrointia ja yksittäisiä tiedonlähteitä koskevien jäsenneltyjen lähestymistapojen raportointia, OECD käsittelee lukuisia tapausselostuksia, joissa kuvataan erilaisia testausstrategioita ja ennustemalleja. Yksi erilaisista määritetyistä lähestymistavoista on U-SENS-testi (5). Esimerkkejä U-SENS™-testillä saatujen tietojen käytöstä muiden tietojen, myös aikaisempien tietojen ja olemassa olevien validien ihmistä koskevien tietojen (6) kanssa, on raportoitu myös muualla kirjallisuudessa (4) (5) (7).

3. On osoitettu, että U-SENS™-testi on siirrettävissä sellaisten laboratorioiden välillä, joissa on kokemusta soluviljelytekniikoista ja virtaussytometria-analyysista. Testistä odotettavien ennusteiden laboratorioiden sisäinen toistettavuus on 90 prosentin ja laboratorioiden välinen toistettavuus on 84 prosentin luokkaa (8). Validointitutkimuksesta (8) ja muista julkaistuista tutkimuksista (1) saadut tulokset osoittavat, että LLNA-testin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 86 prosenttia (N=166), herkkyys on 91 prosenttia (118/129) ja spesifisyys 65 prosenttia (24/37). Ihmisiä koskeviin tuloksiin verrattuna tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottamisessa herkistämättömistä aineista on 77 prosenttia (N=101), herkkyys on 100 prosenttia (58/58) ja spesifisyys 47 prosenttia (20/43). LLNA-testiin verrattuna U-SENS™-testistä saatavat väärät negatiiviset ennusteet koskevat todennäköisemmin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on pieni tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin kemikaaleja, joiden ihoherkistyspotentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (1) (8) (9). Yhdessä nämä tiedot viittaavat siihen, että U-SENS™-testiä voidaan käyttää apuna ihon herkistymisvaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat U-SENS™-testin käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia menetelmiä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

▼**M8**

4. Tällä hetkellä saatavilla olevien tietojen perusteella U-SENS™-testin osoitettiin olevan sovellettavissa testikemikaaleihin (myös kosmetiikan ainesosiin, kuten säilöntäaineisiin, pinta-aktiivisiin aineisiin, vaikuttaviin aineisiin ja väriaineisiin), jotka kattavat useita orgaanisia funktionaalisia ryhmiä ja fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, ihoherkistyspotentiaaleja (*in vivo* -tutkimuksissa määritetyn mukaisesti) ja monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden tiedetään liittyvän ihon herkistymiseen (kuten Michael-akseptorit, Schiffin emäksen muodostuminen, asyylin siirtoaine, bimolekulaarinen nukleofiilinen substituutio [SN2] tai nukleofiilinen aromaattinen substituutio [SNAr]) (1) (8) (9) (10). U-SENS™-testi soveltuu testikemikaaleille, jotka liukenevat tai muodostavat stabiilin dispersion (ts. kolloidin tai suspension, jossa testikemikaali ei sakkaudu tai separoidu liuottimesta/kantaja-aineesta eri faaseihin) asianmukaisessa liuottimessa/kantaja-aineessa (ks. 13 kohta). U-SENS™-testillä ennustettiin oikein kemikaalit, jotka määritettiin aineistossa prehapteeneiksi (aineiksi, jotka hapetus aktivoi) tai prohapteeneiksi (aineiksi, jotka vaativat entsymaattista aktivointia esimerkiksi P450-entsyymien välityksellä) (1) (10). Kalvojen toimintaa häiritsevät aineet voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia CD86:n epäspesifisen ilmentymisen lisääntymisen vuoksi, sillä kolme seitsemästä väärästä positiivisesta tuloksesta *in vivo* -vertailuokituksessa oli pinta-aktiivisia aineita (1). Sen vuoksi pinta-aktiivisia aineita koskeviin positiivisiin tuloksiin on syytä suhtautua varauksellisesti, kun taas niitä koskevia negatiivisia tuloksia voidaankäyttää tukena testikemikaalin määrittämisessä herkistämättömäksi aineeksi. Fluoresoivia testikemikaaleja voidaan arvioida U-SENS™-testillä (1), mutta voimakkaasti fluoresoivat testikemikaalit, jotka emittoivat samalla aallonpituudella kuin fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) tai propidiumjodidi (PI), häiritsevät virtaussytometristä tutkimusta, eikä niitä siis voida arvioida oikein FITC-konjugoituja vasta-aineita (mahdolliset väärät negatiiviset tulokset) tai propidiumjodidia käyttämällä (solujen elinkyky ei mitattavissa). Tässä tapauksessa voidaan käyttää muita fluorokromilla leimattuja vasta-aineita tai muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kunhan voidaan osoittaa, että ne tuottavat samanlaiset tulokset kuin FITC-leimatut vasta-aineet tai propidiumjodidi (ks. 18 kohta) esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet (lisäys 2.2). Edellä esitetyn perusteella pinta-aktiivisia aineita koskevia positiivisia tuloksia ja voimakkaasti fluoresoivia testikemikaaleja koskevia negatiivisia tuloksia on tulkittava ilmoitettujen rajoitusten ja muiden tietolähteiden perusteella IATAn mukaisesti. Jos voidaan osoittaa, ettei U-SENS™-testi sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, sitä ei pidä käyttää niihin.

5. Kuten edellä on todettu, U-SENS™-testi auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa. Siitä voi kuitenkin myös olla apua herkistyspotentiaalin arvioinnissa, kun sitä käytetään osana yhtenäisiä lähestymistapoja, kuten IATAa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten U-SENS™-testillä saatuja tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa.

6. Määritelmät esitetään lisäyksessä 2.1.

TESTIN PERIAATE

7. U-SENS™-testi on *in vitro* -testi, jolla kvantifioidaan solun pintamerkkiaineen CD86 ilmentymisen muutokset ihmisen histiosyyttisessä lymfoomasolulinjassa (U937-solut) 45±3 tunnin pituisen testikemikaalille altistuksen jälkeen. CD86-pintamerkkiaine on yksi tyypillinen U937-solujen aktivoitumisen merkkiaine. CD86:n tiedetään olevan stimuloiva molekyyli, joka voi jäljitellä monosyyttien aktivoitumista, millä on tärkeä tehtävä T-solujen erilaistumisessa. Solujen CD86-pintamerkkiaineiden ilmentymisen muutoksia mitataan virtaussytometrilla sen jälkeen, kun solut on ensin värjätty fluoreseiini-isotiosyanaatilla (FITC) leimatuilla vasta-aineilla. Samaan aikaan mitataan myös sytotoksisuus (käyttämällä esimerkiksi propidiumjodidia),

▼M8

jotta voidaan arvioida, tapahtuuko CD86-pintamerkkiaineen ilmentymisen ylössäätelyä (upregulation) sytotoksisuutta pienemmillä pitoisuuksilla. CD86-pintamerkkiaineen stimulaatioindeksi (S.I.) liuotin-/kantaja-ainekontrolliin verrattuna lasketaan, ja sitä käytetään ennustemallina (ks. 19 kohta) tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemista.

PÄTEVYYDEN OSOITUS

8. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 2.2 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla *in vitro* -menetelmiä koskevia hyviä käytäntöjä noudattaen (11). Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettävä tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 11 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 15 ja 16 kohta) saadut aiemmat tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

MENETTELY

9. Tämä testi perustuu eläinkokeiden vaihtoehtoisia menetelmiä koskevan U-SENS™-tietokantapalvelun (DB-ALM) protokollaan nro 183 (12). Vakiomenettelyjä (Standard Operating Procedures, SOP) pitää käyttää, kun laboratorio ottaa U-SENS™-testin käyttöön ja käyttää sitä. U-SENS™-testin tekemisessä voidaan käyttää automatisoitua järjestelmää, jos voidaan osoittaa, että se antaa samanlaiset tulokset, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 mainitut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Seuraavassa kuvataan U-SENS™-testin pääosat ja menettelyt.

Solujen valmistelu

10. U-SENS™-testissä on käytettävä ihmisen histiosyyttisistä lymfoomasoluista koostuvaa solulinjaa U937 (13). Solut (klooni CRL1593.2) on suositeltavaa hankkia korkeatasoisesta solupankista, jollainen on esimerkiksi American Type Culture Collection.

11. U937-soluja viljellään (olosuhteet: 37 °C, hiilidioksidipitoisuus 5 %, kosteutettu ilma) RPMI-1 640-kasvatusliuoksessa, johon on lisätty 10 prosenttia vasikkasikiön seerumia (FCS:ää), 2 mM L-glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä (valmis kasvatusliuos). U937-solut siirrostetaan rutiininomaisesti 2–3 päivän välein tiheyteen 1,5 tai 3×10^5 solua/ml. Solutiheys saa olla enintään 2×10^6 solua/ml, ja solujen elinkyvyn, joka mitataan trypaanisinisellä väriin perustuvalla poissulkemisella, tulee olla ≥ 90 prosenttia (tätä ei kuitenkaan sovelleta ensimmäiseen sulatuksen jälkeiseen siirrostukseen). Ennen testauksessa käyttämistä jokaisen solu-, FCS- tai vasta-aine-erän laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Solujen reaktiivisuustesti on tehtävä käyttämällä positiivista kontrollia eli pikryylisulfonihappoa (2,4,6-trinitrobentseeni-sulfonihappo: TNBS) (CAS-nro 2 508-19-2, puhtaus ≥ 99 %) ja negatiivista kontrollia eli maitohappoa (LA) (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %), vähintään viikon kuluttua sulatuksesta. Reaktiivisuustestissä on testattava kuusi loppupitoisuutta kummastakin kahdesta kontrollista (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75 ja 100µg/ml; maitohappo: 1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml). Valmiiseen kasvatusliuokseen liuenneen TNBS:n pitäisi tuottaa positiivinen ja pitoisuuteen liittyvä vaste CD86:sta (ts. kun positiivista pitoisuutta, CD86 S.I. ≥ 150, seuraa pitoisuus, jossa CD86 S.I suurenee), ja valmiiseen kasvatusliuokseen liuenneen maitohapon pitäisi tuottaa negatiivinen vaste CD86:sta (ks. 21 kohta). Testissä saa käyttää vain sellaista soluerää, joka läpäisi reaktiivisuustestin kaksi kertaa. Soluja voidaan kasvattaa enintään seitsemän viikkoa sulatuksen jälkeen. Siirrostuksia saa olla enintään 21. Reaktiivisuustesti on tehtävä 18–22 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

▼M8

12. Testausta varten U937-solujen kylvötiheyden on oltava joko 3×10^5 solua/ml tai 6×10^5 solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa joko kaksi päivää tai yksi päivä. Muita kuin edellä kuvattuja esiviljelyolosuhteita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut ja jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Testauspäivänä viljelypullosta otetut solut on resuspendoitava tuoreella kasvatusliuoksella tiheyteen 5×10^5 solua/ml. Sen jälkeen solut jaetaan 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle levylle (100 µl) (lopullinen solutiheys $0{,}5 \times 10^5$ solua/kuoppa).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

13. Liukoisuus arvioidaan ennen testausta. Sitä varten testikemikaalit liuotetaan tai dispergoidaan stabiilisti pitoisuudella 50 mg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen ensimmäisenä liuotinvaihtoehtona tai dimetyylisulfoksidiin (DMSO, ≥, puhtaus 99 %) toisena liuotin-/kantaja-ainevaihtoehtona, jos testikemikaali ei liukene valmiista kasvatusliuoksesta koostuvaan liuottimeen/kantaja-aineeseen. Testauksessa testikemikaali liuotetaan loppupitoisuuteen 0,4 mg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen, jos kemikaali liukenee tähän liuottimeen/kantaja-aineeseen. Jos kemikaali liukenee ainoastaan DMSO:hon, kemikaali liuotetaan pitoisuudella 50 mg/ml. Muita kuin edellä mainittuja liuottimia/kantaja-aineita voidaan käyttää, jos sille on riittävät tieteelliset perustelut. Testikemikaalin stabiilisuus lopullisessa liuottimessa/kantaja-aineessa on otettava huomioon.

14. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. Koska annoksenmääritystestiä ei tehdä, ensimmäisessä ajossa tulee testata kuusi loppupitoisuutta (1, 10, 20, 50, 100 ja 200 µg/ml) asianmukaisessa liuottimessa/kantaja-aineessa, joka on joko valmis kasvatusliuos tai 0,4-prosenttinen DMSO-liuos. Seuraaviin ajoihin testikemikaaliliuoksista valmistetaan vähintään neljä työliuosta (ts. vähintään neljä pitoisuutta) käyttämällä kyseistä liuotinta/kantaja-ainetta ja aloittamalla 0,4 mg/ml -pitoisuudesta valmiissa kasvatusliuoksessa tai 50 mg/ml -pitoisuudesta DMSO:ssa. Työliuoksia käytetään käsittelyssä siten, että levyllä olevan työliuoksen tilavuuteen lisätään yhtä suuri tilavuus U937-solususpensiota (ks. 11 kohta edellä), jotta saadaan toinen kaksinkertainen laimennos (12). Mahdollisten seuraavien ajojen pitoisuudet (joita on oltava vähintään neljä) valitaan kaikkien aiempien ajojen yksittäisten tulosten perusteella (8). Käyttökelpoiset loppupitoisuudet ovat 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 ja 200 µg/ml. Suurin loppupitoisuus on 200 µg/ml. Jos CD86:sta saadaan positiivinenarvo pitoisuudella 1 µg/ml, sen jälkeen testataan pitoisuus 0,1 µg/ml, jotta löydetään se pitoisuus testikemikaalista, jolla CD86:n arvo ei ylitä positiivisen tuloksen rajaa. Jokaisesta ajosta lasketaan EC150-arvo (pitoisuus, jolla kemikaali saavuttaa CD86:n osalta positiivisen rajan, joka on 150 prosenttia, ks. 19 kohta), jos CD86:sta havaitaan positiivinen pitoisuus-vaste. Jos testikemikaalin aiheuttama CD86:n positiivinen vaste ei liity pitoisuuteen, EC150-arvon laskeminen ei välttämättä ole oleellista, kuten U-SENS™ DB-ALM -protokollassa nro 183 on kuvattu (12). Jokaisesta ajosta lasketaan CV70-arvo (pitoisuus, jolla kemikaali saavuttaa sytotoksisuusrajan eli 70 prosenttia, ks. 19 kohta), mikäli mahdollista (12). Jotta voidaan tutkia CD86-arvon suurenemisen pitoisuus-vastevaikutus, kaikki pitoisuudet käyttökelpoisista pitoisuuksista on valittava tasaisesti EC150-arvon (tai CD86:n osalta suurimman negatiivisen ei-sytotoksisen pitoisuuden) ja CV70-arvon (tai suurimman sallitun pitoisuuden eli 200 µg/ml:n) väliltä. Yhdessä ajossa on testattava vähintään neljä pitoisuutta, joista ainakin kahden on oltava samoja kuin aiemmassa ajossa (aiemmissa ajoissa), jotta niitä voidaan vertailla.

▼M8

15. U-SENS™-testissä käytettävä liuotin-/kantaja-ainekontrolli on valmis kasvatusliuos (valmiiseen kasvatusliuokseen liukenevat tai stabiilisti dispergoituvat testikemikaalit) (ks. 4 kohta) tai 0,4-prosenttinen DMSO valmiissa kasvatusliuoksessa (testikemikaalit, jotka liukenevat tai dispergoituvat stabiilisti DMSO:hon).

16. U-SENS™-testissä käytettävä positiivinen kontrolli on valmiiseen kasvatusliuokseen valmistettu TNBS (ks. 11 kohta). TNBS:ää on käytettävä positiivisena kontrollina CD86:n ilmentymisen mittaamisessa lopullisena pitoisuutena levyllä (50 µg/ml), ja sillä solujen elinkyvyn tulisi olla > 70 prosenttia. Jotta TNBS:n pitoisuudeksi levylle saadaan 50 µg/ml, valmistetaan 1 M:n (ts. 293 mg/ml) varastoliuos TNBS:ää valmiissa kasvatusliuoksessa, ja tämä liuos laimennetaan 2 930-kertaiseksi valmiilla kasvatusliuoksella siten, että lopputuloksena on työliuos, jonka pitoisuus on 100 µg/ml. Negatiivisena kontrollina on käytettävä maitohappoa (LA, CAS-nro 50-21-5) pitoisuudella 200 µg/ml valmiiseen kasvatusliuokseen liuotettuna (0,4 mg/ml:n varastoliuoksesta). Jokaiselle levylle valmistetaan jokaisessa ajossa kolme rinnakkaisnäytettä kasvatusliuoksesta, joka toimii käsittelemättömänä kontrollina, liuotin-/kantaja-ainekontrollista sekä negatiivisesta ja positiivisesta kontrollista (12). Muita sopivia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailuajon hyväksymisperusteet. Ajon hyväksymisperusteet ovat samat kuin testikemikaalin perusteet (ks. 12 kohta).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden applikointi

17. Liuotin-/kantaja-ainekontrolli tai työliuokset (ks. 14–16 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 96-kuoppaisella tasapohjaisella levyllä (ks. 12 kohta). Käsitellyt levyt inkuboidaan 45±3 tuntia 37 °C:ssa (hiilidioksidipitoisuus 5 %). Ennen inkubointia levyt peitetään puoliläpäisevällä kalvolla, jotta vältetään haihtuvien testikemikaalien höyrystyminen ja testikemikaaleilla käsiteltyjen solujen ristikontaminaatio (12).

Solujen värjäys

18. Altistuksen (45±3 h) jälkeen solut siirretään V:n muotoiselle mikrotiitterilevylle ja kerätään sentrifugoimalla. Liukoisuuden häiriöt määritellään mikroskoopilla havaittavina kiteinä tai pisaroina 45 ± 3 tuntia käsittelyn jälkeen (ennen solujen värjäystä). Supernatantit hävitetään ja jäljellä olevat solut pestään kerran 100 µl:lla jääkylmää fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS:ää), joka sisältää 5 prosenttia vasikkasikiön seerumia (värjäyspuskuria). Sentrifugoinnin jälkeen solut resuspendoidaan 100 µl:lla värjäyspuskuria ja värjätään 5 µl:lla (ts. 0,25 µg) FITC-leimattua anti-CD86:ta tai hiiren IgG1-isotyypin vasta-aineilla 4 °C:ssa 30 minuutin ajan valolta suojattuna. U-SENS™ DB-ALM -protokollassa nro 183 (12) kuvattuja vasta-aineita on käytettävä (CD86: BD-PharMingen nro 5556 57, klooni: Fun-1, tai Caltag/Invitrogen nro MHCD8601, klooni: BU63; ja IgG1: BD-PharMingen nro 5557 48 tai Caltag/Invitrogen nro GM4992). Testin kehittäjien kokemuksen perusteella vasta-aineiden fluoresenssin intensiteetti on yleensä yhdenmukainen erien välillä. Testissä voidaan käyttää muita klooneja tai sellaisten vasta-aineiden tuottajia, jotka ovat läpäisseet reaktiivisuustestin (ks. 11 kohta). Käyttäjät voivat kuitenkin määrittää parhaan käyttöpitoisuuden titraamalla vasta-aineet omissa laboratorio-olosuhteissaan. Muita havaintojärjestelmiä, kuten fluorokromilla leimattuja anti-CD86-vasta-aineita, voidaan käyttää, jos niiden voidaan osoittaa tuottavan samanlaisia tuloksia kuin FITC-konjugoidut vasta-aineet, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet. Sen jälkeen,kun solut on pesty kahdesti 100 µl:lla värjäyspuskuria ja kerran 100 µl:lla jääkylmää PBS:ää, ne resuspendoidaan jääkylmällä PBS:llä (125 µl näytteille, jotka

▼M8

analysoidaan manuaalisesti putki kerrallaan, tai 50 µl, jos käytetään automaattista näytelevyä), ja siihen lisätään PI-liuosta (loppupitoisuus 3 µg/ml). Muita sytotoksisuuden merkkiaineita, kuten 7-aminoaktinomysiini D:tä (7-AAD) ja trypaanisinistä tms., voidaan käyttää, jos vaihtoehtoisilla värjäysaineilla voidaan osoittaa saatavan samanlaisia tuloksia kuin PI-liuoksella, esimerkiksi testaamalla lisäyksessä 2.2 luetellut pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet.

Virtaussytometria-analyysi

19. CD86:n ilmentymistaso ja solujen elinkyky analysoidaan virtaussytometrin avulla. Solut näkyvät kokoa (FSC) ja granulaarisuutta (SSC) ilmaisevina pistekaavioina (logaritminen asteikko), joiden avulla voidaan selvästi tunnistaa populaatio ensimmäisellä portilla (R1) ja eliminoida solujäte. Tavoitteena on saada yhteensä 10 000 solua porttiin R1 jokaisesta kuopasta. Saman R1-portin solut näytetään FL3- tai FL4-/SSC-pistekaaviona. Elinkykyiset solut rajataan toisella portilla (R2), jolla valitaan propidiumjodidin osalta negatiivisten solujen populaatio (FL3- tai FL4-kanava). Solujen elinkyky voidaan laskea seuraavalla sytometrianalyysiohjelman yhtälöllä. Jos solujen elinkyky on heikko, voidaan kerätä enintään 20 000 solua, myös kuolleita soluja. Vaihtoehtoisesti tiedot voidaan kerätä minuutin kuluttua analyysin aloittamisesta.

$$Solujen\ elinkyky = \frac{Elävien\ solujen\ määrä}{Kerättyjen\ solujen\ kokonaismäärä} \times 100$$

FL-1-positiivisten solujen prosentuaalinen osuus mitataan sen jälkeen näistä elinkykyisistä soluista R2-portilla (R1-portin sisällä). CD86:n ilmentyminen solujen pinnalla analysoidaan FL1-/SSC-pistekaaviolla, joka koskee portilla elinkykyisiä soluja (R2).

Kasvatusliuos-/IgG1-kuoppien osalta analyysin markkeri asetetaan lähelle pääpopulaatiota, jolloin kasvatusliuoskontrollien IgG1-arvon kohdealue on 0,6–0,9 prosenttia.

Väri-interferenssi määritetään FITC-leimatun IgG1-pistekaavion muutokseksi (IgG1 FL1:n geometrinen keskiarvo S.I. ≥ 150 %).

Kontrollisolujen (käsittelemättömät tai 0,4-prosenttinen DMSO) ja kemikaalilla käsiteltyjen solujen CD86:n stimulaatioindeksi (S.I.) lasketaan seuraavalla yhtälöllä:.

$$S.I. = \frac{CD86^{+}käsitellyt\ solut - \%\ of\ IgG1^{+}käsitellyt\ solut}{\%\ of\ CD86^{+}kontrollisolut - \%\ of\ IgG1^{+}kontrollisolut} \times 100$$

Käsittelemättömien $IgG1^{+}$-kontrollisolujen prosenttiosuus: Sillä tarkoitetaan analyysimarkkerilla määritettyjen FL1-positiivisten IgG1-solujen prosenttiosuutta (hyväksyttävä alue on välillä ≥ 0,6 ja < 1,5 prosenttia, ks. 22 kohta) elinkykyisistä käsittelemättömistä soluista.

$IgG1^{+}$-/$CD86^{+}$-kontrollisolujen / käsiteltyjen solujen prosenttiosuus: Sillä tarkoitetaan FL1-positiivisten IgG1-/CD86-solujen prosenttiosuutta, joka mitataan liikuttamatta analyysimarkkeria elinkykyisten kontrollisolujen / käsiteltyjen solujen seassa.

▼**M8**

TIEDOT JA RAPORTOINTIi

Tietojen arviointi

20. U-SENS™-testissä lasketaan seuraavat parametrit: CV70-arvo (pitoisuus, joka osoittaa, että U937-soluista 70 prosenttia on elossa (sytotoksisuus 30 %)) ja EC150arvo (pitoisuus, jolla testikemikaalit ovat indusoineet CD86:n stimulaatioindeksiksi (S.I.) 150 prosenttia.

CV70 lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttämällä seuraavaa yhtälöä:

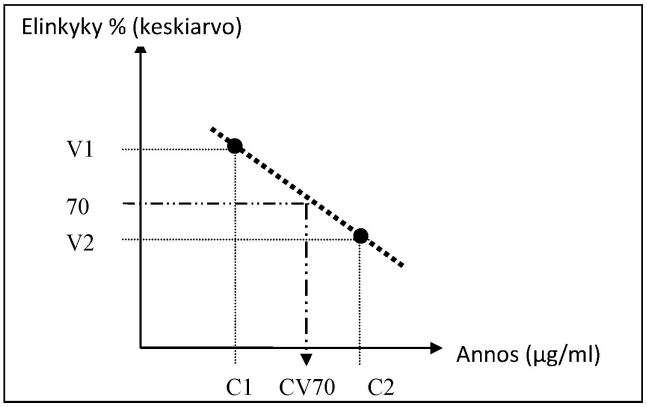
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

Jossa:

V1 on solujen elinkyvyn minimiarvo, joka on enemmän kuin 70 prosenttia

V2 on solujen elinkyvyn maksimiarvo, joka on vähemmän kuin 70 prosenttia

C1 ja C2 ovat pitoisuudet, jotka osoittavat solujen elinkykyarvot V1 ja V2.



CV70-arvon johtamisessa voidaan käyttää myös muita lähestymistapoja, kunhan voidaan osoittaa, ettei se vaikuta tuloksiin (esimerkiksi testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita).

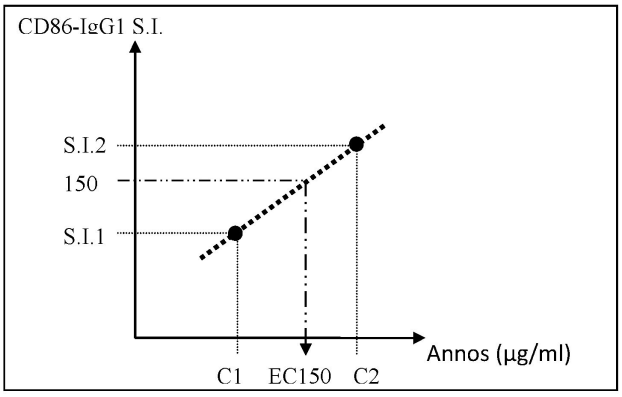
EC150 lasketaan log-lineaarisella interpolaatiolla käyttämällä seuraavaa yhtälöä:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

Jossa:

C1 on suurin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun CD86:n S.I. < 150 % (S.I. 1)

C2 on pienin pitoisuus yksikössä µg/ml, kun CD86:n S.I.≥ 150 % (S.I. 2).



▼**M8**

EC150- ja CV70-arvot lasketaan

— jokaisesta testiajosta: yksittäisiä EC150- ja CV70-arvoja käytetään työkaluina tutkittaessa CD86:n ilmentymisen lisääntymisen pitoisuus-vastevaikutusta (ks. 14 kohta)

— CV70-kokonaisarvo määritetään keskimääräisen elinkyvyn perusteella (12)

— EC150-kokonaisarvo määritetään CD86-arvojen keskimääräisen stimulaatioindeksin perusteella siitä testikemikaalista, joka U-SENS™-testissä määritetään POSITIIVISEKSI (ks. 21 kohta) (12).

Ennustemalli

21. CD86:n ilmentymisen mittaamisessa jokainen testikemikaali testataan vähintään neljänä pitoisuutena ja vähintään kahdessa itsenäisessä ajossa (jotka tehdään eri päivinä), jotta saadaan yksi ennuste (NEGATIIVINEN tai POSITIIVINEN).

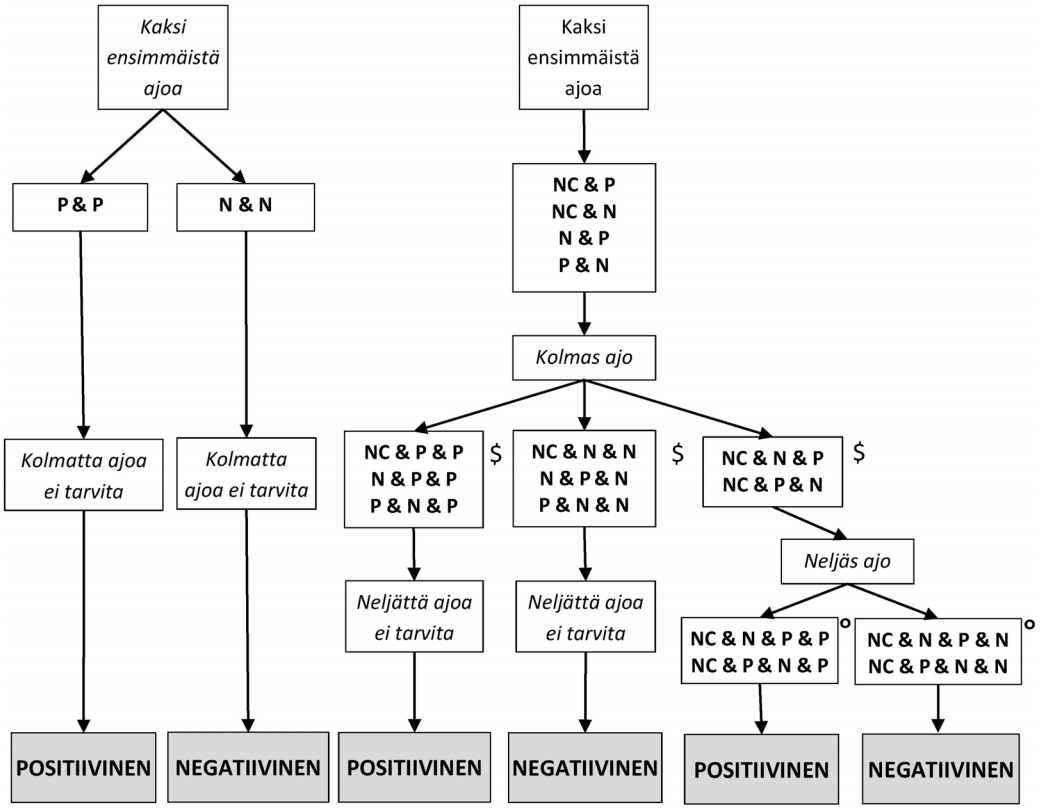
— U-SENS™-testiajon yksittäistä päätelmää pidetään negatiivisena (jäljempänä N), jos CD86:n stimulaatioindeksi on alle 150 prosenttia kaikilla ei-sytotoksisilla pitoisuuksilla (solujen elinkyky ≥ 70 %) ja jos interferenssiä ei havaita (sytotoksisuus, liukoisuus: ks. 18 kohta, tai väri: ks. 19 kohta, riippumatta niistä ei-sytotoksisista pitoisuuksista, joilla interferenssiä havaitaan). Kaikissa muissa tapauksissa: U-SENS™-testiajon yksittäistä päätelmää pidetään positiivisena (jäljempänä P), jos CD86:n stimulaatioindeksi on yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia ja/tai interferenssiä on havaittu.

— U-SENS™-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN, jos vähintään kaksi itsenäistä ajoa ovat negatiivisia (N) (kuva 1). Jos ensimmäiset kaksi ajoa ovat kumpikin negatiivisia (N), U-SENS™-ennusteen katsotaan olevan NEGATIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä.

— U-SENS™-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN, jos vähintään kaksi itsenäistä ajoa ovat positiivisia (P) (kuva 1). Jos ensimmäiset kaksi ajoa ovat kumpikin positiivisia (P), U-SENS™-ennusteen katsotaan olevan POSITIIVINEN eikä kolmatta ajoa tarvitse tehdä.

— Koska annoksenmääritystestiä ei tehdä, poikkeus on se, jos CD86:n stimulaatioindeksi on ensimmäisessä ajossa yhtä suuri tai suurempi kuin 150 prosenttia vain suurimmalla ei-sytotoksisella pitoisuudella. Tällöin testiajon katsotaan olevan EPÄSELVÄ (ES), ja lisätestiajoissa on testattava lisää pitoisuuksia (suurimman ei-sytotoksisen pitoisuuden ja pienimmän sytotoksisen pitoisuuden väliltä, ks. 20 kohta). Jos testiajon tulos on epäselvä, on tehtävä vähintään kaksi lisätestiajoa. Jos toisen ja kolmannen ajon tulokset ovat epäyhtenäiset (N ja/tai P riippumattomasti), on tehtävä vielä neljäs ajo (kuva 1). Näiden seuranta-ajojen katsotaan olevan positiivisia, jos vain yhdellä ei-sytotoksisella pitoisuudella CD86-arvoksi saadaan yhtä kuin tai enemmän kuin 150 prosenttia, koska pitoisuuden määrittämistä on mukautettu tietylle testikemikaalille. Lopullinen ennuste perustuu siihen, mikä on kolmen tai neljän itsenäisen testiajon enemmistötulos (ts. kaksi kolmesta tai kaksi neljästä) (kuva 1).

▼**M8**



Kuva 1: U-SENS™-testissä käytetty ennustemalli. U-SENS™-ennustetta pitää tarkastella IATAn sekä 4 kohdan ja yleisjohdannon kohtien 7, 8 ja 9 määräysten valossa.

N: Testiajo, jossa ei ole havaittu CD86:n positiivisuutta tai interferenssiä.

P: Testiajo, jossa on havaittu CD86:n positiivisuutta ja/tai interferenssiä (interferenssejä).

ES: Epäselvä. Ensimmäisen ajon tulos on epäselvä, kun CD86 on positiivinen vain suurimmalla ei-sytotoksisella pitoisuudella.

#: Vain ensimmäiseen ajoon liittyvä yksittäinen epäselvä päätelmä johtaa automaattisesti siihen, että on tehtävä kolmas ajo, jotta saadaan aikaan enemmistö positiivisista (P) tai negatiivisista (N) päätelmistä vähintään kahdessa kolmesta itsenäisestä päätöksestä.

$: Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät kolmen ajon tuloksista ensimmäisestä kahdesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella.

°: Laatikoissa näytetään asianmukaiset yhdistelmät neljän ajon tuloksista ensimmäisestä kolmesta ajosta saatujen ja edellisessä laatikossa näytettyjen tulosten perusteella.

Hyväksymisperusteet

22. Seuraavien hyväksymisperusteiden on täytyttävä U-SENS™-testiä käytettäessä (12).

— Altistusajan (45±3 h) päättyessä käsittelemättömien U937-solujen keskimääräinen elinkyky kolmessa rinnakkaisnäytteessä on oltava > 90 prosenttia, eikä CD86:n ilmentymisessä saa näkyä muutosta. Käsittelemättömien U937-solujen CD86:n perusilmentymisen on oltava välillä ≥ 2 ja ≤ 25 prosenttia.

▼M8

— Jos liuottimena käytetään DMSO:ta, DMSO-kantaja-ainekontrollin validiteetti arvioidaan laskemalla DMSO:lla aikaansaatu stimulaatioindeksi verrattuna käsittelemättömiin soluihin, ja kolmen rinnakkaisnäytteen solujen keskimääräisen elinkyvyn on oltava > 90 prosenttia. DMSO-kantaja-ainekontrolli on validi, jos sen kolmen rinnakkaisnäytteen CD86:n stimulaatioindeksin keskiarvo on alle 250 prosenttia käsittelemättömien U937-solujen kolmen rinnakkaisnäytteen CD86:n stimulaatioindeksin keskiarvosta.

— Testiajoja pidetään valideina, jos vähintään kaksi kolmesta käsittelemättömien U937-solujen IgG1-arvosta on välillä ≥ 0,6 ja < 1,5 prosenttia.

— Samaan aikaan testattua negatiivista kontrollia (maitohappo) pidetään validina, jos vähintään kaksi kolmesta rinnakkaisnäytteestä on negatiivisia (CD86:n stimulaatioindeksi < 150 prosenttia) ja ei-sytotoksisia (solujen elinkyky ≥ 70 prosenttia).

— Positiivista kontrollia (TNBS) pidetään validina, jos vähintään kaksi kolmesta rinnakkaisnäytteestä on positiivisia (CD86:n stimulaatioindeksi ≥ 150 prosenttia) ja ei-sytotoksisia (solujen elinkyky ≥ 70 prosenttia).

Testiraportti

23. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot.

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, liukoisuus kasvatusliuokseen, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fyysinen ulkonäkö, liukoisuus kasvatusliuokseen, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

▼**M8**

Kontrollit

Positiivinen kontrolli

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, liukoisuus dimetyylisulfoksidiin, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista ajon hyväksymisperusteista.

Negatiivinen ja liuotin-/kantaja-ainekontrolli

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos käytettävät liuottimet/kantaja-aineet ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testausolosuhteet

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testistä

— käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)

— käytetty virtaussytometri (esim. malli), myös laiteasetukset sekä tiedot käytetyistä vasta-aineista ja sytotoksisuuden merkkiaineesta

— menettely, jolla osoitettiin laboratorion pätevyys testin tekemisessä testaamalla pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja aineita, ja menettely, jolla osoitettiin testin suorituskyvyn toistettavuus pidemmällä aikavälillä, esim. aikaisemmat kontrollitiedot ja/tai aikaisempien reaktiivisuustestien tiedot.

Testin hyväksymisperusteet

— solujen elinkyky sekä liuotin-/kantaja-ainekontrollista saadut CD86:n stimulaatioindeksiarvot verrattuna hyväksyttävyysalueisiin

▼**M8**

— solujen elinkyky sekä positiivisesta kontrollista saadut stimulaatioindeksiarvot verrattuna hyväksyttävyysalueisiin

— solujen elinkyky kaikilla testatun kemikaalin testatuilla pitoisuuksilla.

Testimenettely

— tehtyjen ajojen lukumäärä

— testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja käytetty altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)

— altistusaika

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— tietojen taulukointi: CV70 (tarvittaessa), stimulaatioindeksiarvot, solujen elinkykyarvot, EC150-arvot (tarvittaessa) testikemikaalista ja positiivisesta kontrollista jokaisesta ajosta, ja tieto testikemikaalin luokituksesta ennustemallin perusteella

— tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

— U-SENS™-testillä saatujen tulosten tarkastelu

— testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901–916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Saatavana osoitteessa http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2 787/8157 37. Saatavana osoitteessa [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2 760/5889 55. Saatavana osoitteessa https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OECD (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337–351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373–382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259–270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1 683–1 696.

(11) OECD. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), s. 33. Saatavana osoitteessa [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565–577.

(14) OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Yhdistyneet kansakunnat (YK) (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: United Nations Publications. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf

(16) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Saatavana osoitteessa https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼M8

Lisäys 2.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (14).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (15).

CD86:n pitoisuus-vaste: Pitoisuudesta riippuvaisuudella (tai pitoisuus-vasteella) tarkoitetaan sitä, kun positiivista pitoisuutta (CD86 S.I. ≥ 150) seuraa pitoisuus, joka suurentaa CD 86:n stimulaatioindeksiä.

Kemikaali: Aine tai seos.

CV70: Arvioitu pitoisuus, jolla solujen elinkyky on 70 prosenttia.

Muutos: Muutoksesta on kyse silloin, kun i) käsittelemättömän kontrollirinnakkaisnäytteen 3 korjattu %$CD86^+$-arvo on alle 50 prosenttia käsittelemättömien kontrollirinnakkaisnäytteiden 1 ja 2 keskimääräisestä korjatusta %$CD86^+$-arvosta, ja ii) negatiivisen kontrollirinnakkaisnäytteen 3 korjattu %$CD86^+$-arvo on alle 50 prosenttia negatiivisten kontrollirinnakkaisnäytteiden 1 ja 2 keskimääräisestä korjatusta %$CD86^+$-arvosta.

EC150: Arvioidut pitoisuudet, joilla CD86:n ilmentymisen stimulaatioindeksi on 150 prosenttia.

Virtaussytometria: Sytometrinen tekniikka, jossa nesteeseen suspendoidut solut virtaavat yksi kerrallaan niihin kohdistetun valon läpi, ja valo sirottuu soluille ja niiden osille ominaisella tavalla. Solut usein leimataan fluoresoivilla merkkiaineilla, jolloin valo ensin absorboituu ja sen jälkeen emittoituu muuttuneilla taajuuksilla.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

▼M8

Positiivinen kontrolli: Rinnakkaisnäyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation, kuten hapetuksen, jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja halutun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testin tarkkuus (vastaavuus) (14).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (14).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa.

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (14).

S.I.: Stimulaatioindeksi. Kemikaaleilla käsiteltyjen solujen fluoresenssin intensiteetin geometrisen keskiarvon suhteelliset arvot verrattuna liuottimella käsiteltyjen solujen arvoihin.

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten testikemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (14).

Värjäyspuskuri: Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, joka sisältää 5 prosenttia vasikkasikiön seerumia.

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testillä.

▼M8

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (esimerkiksi työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (16).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testi: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen (14).

▼**M8**

Lisäys 2.2

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen U-SENS™-ennuste kymmenelle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla CV70- ja EC150-arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle kymmenestä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta. Nämä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet on valittu edustamaan erilaisia vasteita ihon herkistymisvaaroihin. Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, jotka on tuotettu U-SENS™-testillä. Myös U-SENS™-testistä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (1) (8).

Taulukko 1

Suositellut aineet U-SENS™-testiä koskevan teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Fysikaalinen olomuoto	*In vivo* -ennuste (1)	U-SENS Liuotin/kantaja-aine	U-SENS CV70: viitealue yksikössä µg/ml (2)	U-SENS EC150-viitealue yksikössä µg/ml (2)
4-fenyleenidiamiini	106-50-3	Kiinteä	Herkistävä (voimakas)	Kasvatusliuos (3)	<30	Positiivinen (≤10)
Pikryylisulfonihappo	2508-19-2	Neste	Herkistävä (voimakas)	Kasvatusliuos	>50	Positiivinen (≤50)
Dietyylimaleaatti	141-05-9	Neste	Herkistävä (kohtalainen)	DMSO	10-100	Positiivinen (≤20)
Resorsinoli	108-46-3	Kiinteä	Herkistävä (kohtalainen)	Kasvatusliuos	>100	Positiivinen (≤50)
Kanelialkoholi	104-54-1	Kiinteä	Herkistävä (heikko)	DMSO	>100	Positiivinen (10–100)
4-allyylianisoli	140-67-0	Neste	Herkistävä (heikko)	DMSO	>100	Positiivinen (<200)
Sakariini	81-07-2	Kiinteä	Herkistämätön	DMSO	>200	Negatiivinen (>200)
Glyseroli	56-81-5	Neste	Herkistämätön	Kasvatusliuos	>200	Negatiivinen (>200)
Maitohappo	50-21-5	Neste	Herkistämätön	Kasvatusliuos	>200	Negatiivinen (>200)
Salisyylihappo	69-72-7	Kiinteä	Herkistämätön	DMSO	>200	Negatiivinen (>200)

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.

(1) *In vivo* -riski ja (vaikutuskykyä koskevat) ennusteet perustuvat LLNA-tietoihin (1) (8). In vivo -vaikutuskyky johdetaan ECETOCin ehdottamien kriteerien pohjalta (17).

(2) Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (1) (8).

(3) Kasvatusliuos: RPMI-1640-kasvatusliuos, johon on lisätty 10 % vasikkasikiön seerumia, 2 mM L-glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä (8).

▼**M8**

Lisäys 3

IN VITRO -IHOHERKISTYS: IL-8 LUC -TESTI

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

1. Toisin kuin testeissä, joissa analysoidaan solun pintamerkkiaineiden ilmentymistä, IL8 Luc -testissä kvantifioidaan muutoksia IL-8:n ilmentymisessä. IL-8 on dendriittisolujen aktivoitumiseen liittyvä sytokiini. THP-1-soluista johdetussa IL-8-reportterisolulinjassa (THP-G8, peräisin ihmisen akuutin monosyyttileukemian solulinjasta THP-1) IL-8:n ilmentymistä mitataan herkistäville aineille altistuksen jälkeen (1). Sen jälkeen ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa käytetään apuna lusiferaasin ilmentymistä.

2. IL-8 Luc -testi on arvioitu validointitutkimuksessa (2), jonka tekivät JaCVAM (japanilainen vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus), **Japanin talous-, kauppa- ja teollisuusministeriö** (METI) sekä **JSAAE** (Japanin eläinkokeille vaihtoehtoisia menetelmiä kehittävä yhteisö). Sen jälkeen testille tehtiin riippumaton vertaisarviointi (3) JaCVAMin ja Japanin terveys-, työ- ja hyvinvointiministeriön (MHLW) sekä **vaihtoehtoisia testimenetelmiä koskevan kansainvälisen yhteistyöelimen** (ICATM) tuella. Kaikkien saatavilla olevien tutkimustietojen ja sääntelyviranomaisilta ja sidosryhmiltä saatujen tietojen perusteella IL-8 Luc -testiä pidetään käyttökelpoisena IATAn osana tukemaan herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelua vaarojen osalta luokittelua ja merkintöjä varten. Kirjallisuudessa annetaan esimerkkejä siitä, miten IL-8 Luc -testillä saatuja tietoja on käytetty muihin tietoihin yhdistettyinä (4) (5) (6).

3. On osoitettu, että IL-8 Luc -testi on siirrettävissä sellaisten laboratorioiden välillä, joissa on kokemusta soluviljelystä ja lusiferaasin mittaamisesta. Laboratorion sisäinen toistettavuus oli 87,7 prosenttia ja laboratorioiden välinen toistettavuus 87,5 prosenttia (2). Validointitutkimuksesta (2) ja muista julkaistuista tutkimuksista (1) (6) saadut tiedot osoittavat, että LLNA-tietoihin verrattuna IL-8 Luc -testi luokitteli 118 kemikaalia 143:sta positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 25 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus ihoa herkistävien aineiden (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka 1) erottelemisessa ihoa herkistämättömistä aineista (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen luokka Ei luokitusta) on 86 prosenttia (101/118), herkkyys 96 prosenttia (92/96) ja spesifisyys 41 prosenttia (9/22). Kun jätetään jäljempänä kuvatun sovellettavuusalueen ulkopuoliset aineet huomiotta (5 kohta), IL-8 Luc -testi luokitteli 113 kemikaalia 136:sta positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 23 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 89 prosenttia (101/113), herkkyys 96 prosenttia (92/96) ja spesifisyys 53 prosenttia (9/17). Kun käytetään julkaisussa Urbisch ja muut (7) lainattuja tietoja ihmisistä, IL-8 Luc -testi luokitteli 76 kemikaalia 90:stä positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 14 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 80 prosenttia (61/76), herkkyys 93 prosenttia (54/58) ja spesifisyys 39 prosenttia (7/18). Kun jätetään sovellettavuusalueen ulkopuoliset aineet huomiotta, IL-8 Luc -testi luokitteli 71 kemikaalia 84:stä positiiviseksi tai negatiiviseksi ja 13 kemikaalia epäselviksi. Näiden tietojen mukaan IL-8 Luc -testin tarkkuus on 86 prosenttia (61/71), herkkyys 93 prosenttia (54/58) ja spesifisyys 54 prosenttia (7/13). IL-8 Luc -testillä saadaan vääriä negatiivisia ennusteita todennäköisimmin kemikaaleilla, joiden ihoherkistyspotentiaali on vähäinen tai kohtalainen (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1B), kuin niillä, joiden potentiaali on suuri (YK:n GHS-järjestelmän / CLP-asetuksen alaluokka 1A) (6). Kokonaisuutena nämä tiedot puoltavat

▼**M8**

IL-8 Luc -testin käyttöä ihon herkistymistä aiheuttavien vaarojen tunnistamisessa. Tässä esitetyt tarkkuusarvot, jotka koskevat IL-8 Luc -testin käyttöä ainoana testinä, ovat kuitenkin vain suuntaa-antavia, sillä testiä pitäisi käyttää yhdessä muiden tietolähteiden kanssa IATAn valossa ja yleisjohdannon 7 ja 8 kohdassa olevien määräysten mukaisesti. Lisäksi arvioitaessa ihon herkistymiseen liittyviä eläinkokeettomia testejä tulisi pitää mielessä, että LLNA-testi samoin kuin muut eläinkokeet eivät välttämättä täysin kerro tilanteesta ihmisten osalta.

4. Tällä hetkellä saatavana olevien tietojen perusteella on osoitettu, että IL-8 Luc -testiä voidaan käyttää testattaessa kemikaaleja, jotka kuuluvat moniin orgaanisiin funktionaalisiin ryhmiin, joilla on monenlaisia reaktiomekanismeja, joiden ihoherkistyspotentiaaleissa on suuria eroja (*in vivo* -tutkimusten mukaan) ja joilla on monenlaisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia (2) (6).

5. Vaikka IL-8 Luc -testissä käytettävä liuotin on X-VIVO™ 15, sillä määritettiin oikein kemikaalit, joiden Log K_{ow} -arvo on >3,5, ja ne, joiden vesiliukoisuus on noin 100 μg/ ml EPI Suite™-menetelmällä laskettuna, ja sen tehokkuus havaita vesiliukoisuudeltaan heikot herkistävät aineet onkin parempi kuin silloin, jos IL-8 Luc -testissä käytetään liuottimena dimetyylisulfoksidia (DMSO:ta) (2). Sellaisia testikemikaaleja koskevat negatiiviset tulokset, jotka eivät liukene pitoisuudella 20 mg/ml, voivat kuitenkin olla vääriä negatiivisia tuloksia, koska ne eivät pysty liukenemaan X-VIVO™ 15:een. Sen vuoksi tällaisia kemikaaleja koskevia negatiivisia tuloksia ei tule ottaa huomioon. Validointitutkimuksessa todettiin, että väärien negatiivisten tulosten osuus oli anhydridien osalta suuri. Lisäksi solulinjan rajallisen metabolointikyvyn (8) ja koeolosuhteiden vuoksi myös prohapteenit (aineet, jotka vaativat metabolista aktivointia) ja prehapteenit (aineet, jotka hapetus aktivoi) voivat antaa testissä negatiivisia tuloksia. Vaikka oletettuja pre-/prohapteeneja koskevia negatiivisia tuloksia on siis tulkittava varauksellisesti, IL-8 Luc -testi määritti oikein 11/11 prehapteenia, 6/6 prohapteenia ja 6/8 pre-/prohapteenia IL-8 Luc -testin aineistossa (2). Pre- ja prohapteenien havaitsemiseen tarkoitetun kolmen eläinkokeettoman testin (DPRA, KeratinoSens™ ja h-CLAT) hiljattain tehdyn kattavan arvioinnin (9) ja sen perusteella, että IL-8 Luc -testissä käytettävissä THP-G8-soluissa on kyse solulinjasta, joka on peräisin h-CLAT-testissä käytetyistä THP-1-soluista, IL-8 Luc -testi voi osaltaan parantaa eläinkokeettomien testien herkkyyttä havaita pre- ja prohapteeneja muihin testeihin yhdistettynä. Tähän mennessä testatuista pinta-aktiivisista aineista saatiin vääriä positiivisia tuloksia riippumatta niiden tyypistä (ts. kationinen, anioninen tai ioniton). Kemikaalit, jotka häiritsevät lusiferaasia, voivat häiritä myös sen aktiivisuutta/mittausta ja aiheuttaa näennäistä inhibiota tai luminesenssin lisääntymistä (10). Esimerkiksi fytoestrogeenipitoisuuksien, jotka ovat suurempia kuin 1 μM, on raportoitu vaikuttavan häiritsevästi luminesenssisignaaleihin muissa lusiferaasipohjaisissa reportterigeenitesteissä, mikä johtuu lusiferaasireportterigeenin yliaktivoitumisesta. Tämän seurauksena lusiferaasin ilmentymistä, joka on saatu suurilla pitoisuuksilla fytoestrogeeneja tai vastaavia yhdisteitä, joiden epäillään aiheuttavan fytoestrogeenin tavoin lusiferaasireporttergeenin yliaktivoitumista, on tutkittava huolellisesti (11). Edellä sanotun perusteella pinta-aktiiviset aineet, anhydridit ja lusiferaasia häiritsevät kemikaalit eivät kuulu tämän testin sovellettavuusalueeseen. Jos voidaan osoittaa, ettei IL-8 Luc -testi sovi käytettäväksi tiettyjen muiden testikemikaaliluokkien kanssa, sitä ei pidä käyttää niihin.

6. Kuten edellä on todettu, IL-8 Luc -testi auttaa ihoa herkistävien ja herkistämättömien aineiden erottelemisessa. Työtä on kuitenkin jatkettava, mieluiten ihmisistä saatujen tietojen pohjalta, jotta voidaan määrittää, miten IL-8 Luc -testin tuloksia voidaan käyttää herkistyspotentiaalin arvioinnissa muihin tietolähteisiin yhdistettynä.

▼M8

7. Määritelmät esitetään lisäyksessä 3.1.

TESTIN PERIAATE

8. IL-8 Luc -testissä käytetään ihmisen monosyyttileukemiasoluihin perustuvaa solulinjaa THP-1, joka on saatu American Type Culture Collectionista (Manassas, VA, Yhdysvallat). Tohokun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan dermatologian laitos valmisti tätä solulinjaa käyttämällä THP-1-soluihin perustuvan IL-8-reportterisolulinjan nimeltä THP-G8, joka sisältää vakaan lusiferaasioranssin (Stable Luciferase Orange, SLO) ja vakaan lusiferaasipunaisen (Stable Luciferase Red, SLR) lusiferaasigeenejä, joita IL-8 säätelee, sekä glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin (GAPDH) promoottoreita (1). Tämän avulla voidaan mitata lusiferaasigeenin induktiota: hyvin tunnettujen lusiferaasisubstraattien tuottamaan valoon perustuvan luminesenssin havaitseminen on indikaattori IL-8:n aktivoitumisesta ja GAPDH:sta soluissa herkistäville kemikaaleille altistamisen jälkeen.

9. Kaksivärisessä testissä käytetään oranssia valoa emittoivaa lusiferaasia (SLO; λmaks. = 580 nm) (12) IL-8:n promoottorigeenin ilmentymiseen ja punaista valoa emittoivaa lusiferaasia (SLR; λmaks. = 630 nm) (13) sisäisen säätelyn promoottorigeenin, GAPDH:n, ilmentymiseen. Nämä kaksi lusiferaasia emittoivat eriväristä valoa reagoidessaan tulikärpäsen d-lusiferiiniin, ja niiden luminesenssi mitataan samanaikaisesti yhden vaiheen reaktiossa erottelemalla testiseoksen emissio käyttämällä optista suodatinta (14) (lisäys 3.2).

10. THP-G8-soluja käsitellään testikemikaalilla 16 tuntia, minkä jälkeen mitataan IL-8-promoottorin aktiivisuutta kuvaavan SLO-lusiferaasin aktiivisuus (SLO-LA) ja GAPDH-promoottorin aktiivisuutta kuvaavan SLR-lusiferaasin aktiivisuus (SLR-LA). Jotta lyhenteet olisi helpompi ymmärtää, SLO-LA-lyhenteestä käytetään jäljempänä muotoa IL8LA ja SLR-LA-lyhenteestä muotoa GAPLA. Taulukossa 1 selitetään IL-8 Luc -testissä käytettävät ilmaukset, jotka liittyvät lusiferaasiaktiivisuuteen. Mitattujen arvojen perusteella lasketaan normalisoitu IL8LA (nIL8LA), joka on IL8LA:n ja GAPLAn välinen suhde; nIL8LA:n induktio (Ind-IL8LA), joka on testikemikaalilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA:n nelinkertaisesti mitattujen arvojen ja käsittelemättömien THP-G8-solujen nIL8LA:n arvojen aritmeettisten keskiarvojen suhde; sekä GAPLAn inhibitio (Inh-GAPLA), joka on testikemikaalilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLAn nelinkertaisesti mitattujen arvojen ja käsittelemättömien THP-G8-solujen GAPLAn arvojen aritmeettisten keskiarvojen suhde ja jota käytetään sytotoksisuuden indikaattorina.

Taulukko 1

IL-8 Luc -testissä käytettävien lusiferaasiaktiivisuuteen liittyvien ilmausten selitykset

Lyhenteet	Määritelmä
GAPLA	SLR-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa GAPDH-promoottorin aktiivisuutta
IL8LA	SLO-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa IL-8-promoottorin aktiivisuutta
nIL8LA	IL8LA/GAPLA
Ind-IL8LA	Kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA / käsittelemättömien solujen nIL8LA

▼M8

Lyhenteet	Määritelmä
Inh-GAPLA	Kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLA / käsittelemättömien solujen GAPLA
CV05	Kemikaalin pienin pitoisuus, jolla Inh-GAPLA-arvo on < 0,05.

11. Saatavilla on suoritusvaatimukset (15), jotka helpottavat IL-8 Luc -testin kaltaisten muunneltujen *in vitro* -IL-8-lusiferaasitestien validointia. Myös OECD:n testiohjetta 442E voidaan muuttaa oikea-aikaisesti, kun nämä vaatimukset lisätään ohjeisiin. OECD:n sopimuksen mukainen tietojen vastavuoroinen hyväksyntä (Mutual Acceptance of Data, MAD) taataan ainoastaan suoritusvaatimusten mukaisesti validoitujen testien osalta, jos OECD on tarkistanut ja sisällyttänyt nämä testit testiohjeeseen 442E (16).

PÄTEVYYDEN OSOITUS

12. Ennen kuin laboratoriot ryhtyvät käyttämään tässä testimenetelmän B.71 lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, niiden on osoitettava tekninen pätevyytensä lisäyksessä 3.3 lueteltujen kymmenen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetun aineen avulla *in vitro* -menetelmiä koskevia hyviä käytäntöjä noudattaen (17). Lisäksi testin käyttäjien on ylläpidettävä tietokantaa, joka sisältää reaktiivisuustesteistä (ks. 15 kohta) sekä positiivisista ja liuotin-/kantaja-ainekontrolleista (ks. 21–24 kohta) saadut aiemmat tiedot, ja vahvistettava näiden tietojen avulla, että testin toistettavuus kussakin laboratoriossa säilyy pidemmällä aikavälillä.

MENETTELY

13. IL-8 Luc -testin vakiomenettely (Standard Operating Procedures, SOP) on saatavana, ja sitä pitäisi käyttää, kun laboratorio tekee testin (18). Laboratoriot, jotka haluavat tehdä testin, voivat tilata rekombinantinTHP-G8-solulinjan GPC Lab. Co. Ltd:ltä (Tottori, Japani) tekemällä materiaalinsiirtosopimuksen OECD:n malliin sisältyvien ehtojen mukaisesti. Seuraavissa kohdissa kuvataan testin pääosat ja menettelyt.

Solujen valmistelu

14. IL-8 Luc -testissä on käytettävä THP-G8-solulinjaa, joka tilataan GPC Lab. Co. Ltd:ltä Tottorista Japanista (ks. 8 ja 13 kohta). Vastaanoton jälkeen soluja propagoidaan (2–4 siirrostusta) ja säilytetään pakastettuina homogeenisena kantana. Tämän kannan soluja voidaan propagoida enintään 12 siirrostusta tai enintään kuuden viikon ajan. Propagoinnissa käytetään RPMI-1 640-kasvatusliuosta, joka sisältää 10 % naudan sikiön verestä valmistettua seerumia (FBS:ää), antibiootti-/antimykoottiliuosta (100 U/ml penisilliini G:tä, 100 µg/ml streptomysiiniä ja 0,25 µg/ml amfoterisiini B:tä 0,85-prosenttisessa suolaliuoksessa) (esim. GIBCO, luettelonro 15 240-062), 0,15 µg/ml puromysiiniä (esim. CAS-nro 58-58-2) ja 300 µg/ml G418:aa (esim. CAS-nro 1083 21-42-2).

15. Ennen kuin soluja käytetään testauksessa, niiden laatu on varmistettava tekemällä reaktiivisuustesti. Tämä testi on tehtävä sulatuksesta 1–2 viikon kuluttua tai 2–4 siirrostuksen jälkeen, ja siinä on käytettävä positiivista kontrollia, 4-nitrobentsyylibromidia (4-NBB) (CAS-nro 100-11-8, puhtaus ≥ 99 %) ja negatiivista kontrollia, maitohappoa (CAS-nro 50-21-5, puhtaus ≥ 85 %). 4-NBB:n tulisi tuottaa positiivinen vaste Ind-IL8LA:lle (≥1,4), kun taas maitohapon tulisi tuottaa negatiivinen vaste Ind-IL8LA:lle (<1,4). Testissä saa käyttää vain soluja, jotka läpäisevät reaktiivisuustestin. Testi on tehtävä 22–24 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

▼M8

16. Testausta varten THP-G8-solujen kylvötiheyden on oltava 2–5 × 10^5 solua/ml, ja niitä on esiviljeltävä viljelypulloissa 48–96 tuntia. Testauspäivänä viljelypullosta kerätyt solut pestään RPMI-1640:llä, joka sisältää 10 % FBS:ää muttei antibiootteja. Sen jälkeen solut resuspendoidaan RPMI-1640-liuokseen, joka sisältää 10 % FBS:ää muttei antibiootteja, tiheyteen 1 × 10^6 solua/ml. Tämän jälkeen solut jaetaan 96-kuoppaiselle tasapohjaiselle mustalle levylle (esim. Costar, luettelonro 3603) (50 µl) (5 × 10^4 solua/kuoppa).

Testikemikaalien ja kontrolliaineiden valmistelu

17. Testikemikaalit ja kontrolliaineet valmistetaan testipäivänä. IL-8 Luc -testissä testikemikaalit liuotetaan X-VIVO™ 15 -liuottimeen, joka on kaupallisesti saatavilla oleva seerumiton kasvatusliuos (Lonza, 04-418Q), loppupitoisuuteen, joka on 20 mg/ml. X-VIVO™ 15:tä lisätään 20 mg:aan testikemikaalia (kemikaalin liukoisuudesta riippumatta) mikrosentrifugiputkessa 1 ml:n tilavuuteen. Sen jälkeen putkea ravistetaan voimakkaasti ja sekoitetaan sekoittimessa enimmäisnopeudella 8 kierrosta minuutissa 30 minuutin ajan 20°C:n lämpötilassa. Jos kiinteät kemikaalit eivät ole vieläkään liuenneet, putkea käsitellään ultraäänellä, kunnes kemikaali on liuennut kokonaan tai dispergoitunut stabiilisti. X-VIVO™ 15:een liukenevien testikemikaalien osalta liuos laimennetaan X-VIVO™ 15:lla viisinkertaisesti ja käytetään testikemikaalin X-VIVO™ 15 -varastoliuoksena (4 mg/ml). Niiden testikemikaalien osalta, jotka eivät liukene X-VIVO™ 15:een, seosta sekoitetaan uudestaan vähintään 30 minuutin ajan ja sen jälkeen sentrifugoidaan kierrosluvulla 15000 rpm (≈20000 *g*) 5 minuutin ajan. Näin saatavaa supernatanttia käytetään testikemikaalin X-VIVO™ 15 -varastoliuoksena. Muiden liuottimien, kuten DMSO:n, veden tai kasvatusliuoksen, käytölle on esitettävä tieteelliset perusteet. Yksityiskohtainen menettely kemikaalien liuottamiseksi esitetään lisäyksessä 3.5. X-VIVO™ 15 -liuokset (ks. 18–23 kohta) sekoitetaan suhteessa 1:1 (v/v) solususpensioihin, jotka on valmistettu 96-kuoppaisella tasapohjaisella mustalla levyllä (ks. 16 kohta).

18. Ensimmäisen testiajon tarkoituksena on määrittää sytotoksinen pitoisuus ja tutkia kemikaalien ihoherkistyspotentiaalia. Testikemikaalien X-VIVO™ 15 -varastoliuoksista tehdään X-VIVO™ 15:n avulla sarjalaimennokset laimennuskertoimella 2 (ks. lisäys 3.5) käyttämällä 96-kuoppaista testiblokkia (esim. Costar, luettelonro EW-01729-03). Seuraavaksi 50 µl laimennettua liuosta / kuoppa lisätään 50 µl:aan solususpensiota 96-kuoppaisella tasapohjaisella mustalla levyllä. X-VIVO™ 15:een liukenevien testikemikaalien loppupitoisuudet ovat siis 0,002–2 mg/ml (lisäys 3.5). Niille testikemikaaleille, jotka eivät liukene X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml, määritetään vain laimennuskertoimet välille $2–2^{10}$, vaikka testikemikaalien todelliset loppupitoisuudet ovat epäselvät ja määräytyvät sen mukaan, mikä on testikemikaalien saturoitunut pitoisuus X-VIVO™ 15 -varastoliuoksessa.

19. Seuraavissa testiajoissa (ts. toiset, kolmannet ja neljännet rinnakkaisnäytteet) X-VIVO™ 15 -varastoliuoksesta tehdään neljä kertaa suurempi pitoisuus kuin se pitoisuus, jolla solujen elinkyky oli 05 (CV05; pienin pitoisuus, jolla Inh-GAPLA-arvo on < 0,05) ensimmäisessä kokeessa. Jos Inh-GAPLA-arvo ei laske alle 0,05:n ensimmäisen testiajon suurimmalla pitoisuudella, X-VIVO™ 15 -varastoliuoksesta tehdään ensimmäisen ajon suurimman pitoisuuden mukaan. CV05-pitoisuus lasketaan jakamalla ensimmäisen ajon varastoliuoksen pitoisuus CV05:n laimennuskertoimella (X) (laimennuskerroin CV05 (X); laimennuskerroin, jolla varastoliuos saatiin laimennettua CV05-arvoon) (ks. lisäys 3.5). Niiden testiaineiden osalta, jotka eivät liukene X-VIVO-liuokseen pitoisuudella 20 mg/ml, CV05 määritetään varastoliuoksen pitoisuudella × 1/X. Testiajoihin 2–4 valmistetaan toinen varastoliuos kaavalla 4 × CV05 (lisäys 3.5).

▼**M8**

20. X-VIVO™ 15:n toisista varastoliuoksista tehdään sarjalaimennokset laimennuskertoimella 1,5 käyttäen 96-kuoppaista testiblokkia. Seuraavaksi 50 µl laimennettua liuosta / kuoppa lisätään 50 µl:aan solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuopissa. Kunkin testikemikaalin kukin pitoisuus on testattava neljässä kuopassa. Näytteet sekoitetaan levysekoittajalla ja niitä inkuboidaan 16 tunnin ajan 37°C:ssa (CO_2-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan jäljempänä kuvatulla tavalla.

21. Liuotinkontrolli on seos, joka sisältää 50 µl X-VIVO™ 15:tä / kuoppa ja 50 µl solususpensiota / kuoppa RPMI-1640-liuoksessa, joka sisältää 10 prosenttia FBS:ää.

22. Suositeltu positiivinen kontrolli on 4-NBB. 4-NBB:tä laitetaan 20 mg 1,5 ml:n mikrofugiputkeen, johon lisätään X-VIVO™ 15:tä enintään 1 ml. Putkea ravistetaan voimakkaasti ja sekoitetaan sekoittajassa enintään 8 kierrosta minuutissa -kierrosluvulla vähintään 30 minuutin ajan. Sentrifugoinnin (20000 g, 5 min) jälkeen supernatantti laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 4 ja 500 µl laimennettua supernatanttia siirretään 96-kuoppaisen testiblokin kuoppiin. Laimennettua supernatanttia laimennetaan lisää X-VIVO™ 15:llä kertoimilla 2 ja 4, ja 50 µl liuosta lisätään 50 µl:aan THP-G8-solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuoppiin (lisäys 3.6). Positiivisen kontrollin kukin pitoisuus on testattava neljässä kuopassa. Levyä sekoitetaan levysekoittajalla ja sitä inkuboidaan 16 tunnin ajan hiilidioksidi-inkubaattorissa (37°C, CO_2-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan 29 kohdassa kuvatulla tavalla.

23. Suositeltu negatiivinen kontrolli on maitohappo. Maitohappoa laitetaan 20 mg 1,5 ml:n mikrofugiputkeen, johon lisätään enintään 1 ml X-VIVO™ 15:tä (20 mg/ ml). Maitohappoliuos (20 mg/ml) laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 5 (4 mg/ml); 500 µl tästä maitohappoliuoksesta, jonka pitoisuus on 4 mg/ml, siirretään 96-kuoppaisen testiblokin kuoppiin. Tämä liuos laimennetaan X-VIVO™ 15:llä kertoimella 2 ja sen jälkeen vielä kerran kertoimella 2, jotta saadaan liuokset, joiden pitoisuudet ovat 2 mg/ml ja 1 mg/ml. Näistä kolmesta liuoksesta ja kantaja-ainekontrollista (X-VIVO™ 15) 50 µl kutakin lisätään 50 µl:aan THP-G8-solususpensiota 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn kuoppiin. Negatiivisen kontrollin kukin pitoisuus testataan neljässä kuopassa. Levyä sekoitetaan levysekoittajalla ja sitä inkuboidaan 16 tunnin ajan hiilidioksidi-inkubaattorissa (37°C, CO_2-pitoisuus 5 prosenttia), minkä jälkeen lusiferaasiaktiivisuus mitataan 29 kohdassa kuvatulla tavalla.

24. Muita sopivia positiivisia tai negatiivisia kontrolleja voidaan käyttää, jos saatavana on aikaisempia tietoja, joista voidaan johtaa vertailuajon hyväksymisperusteet.

25. Haihtuvien testikemikaalien höyrystymistä ja testikemikaalien aiheuttamaa kuoppien välistä ristikontaminaatiota on vältettävä esimerkiksi peittämällä levyt kalvolla ennen inkubointia testikemikaalien kanssa.

26. Testikemikaaleista ja liuotinkontrollista on tehtävä 2–4 ajoa, jotta voidaan tehdä positiivinen tai negatiivinen ennuste (ks. taulukko 2). Kukin ajo tehdään eri päivinä käyttämällä testikemikaaleista tuoretta X-VIVO™ 15 -varastoliuosta ja erikseen kerättyjä soluja. Solut voivat kuitenkin olla peräisin samasta siirrostuksesta.

▼M8

Lusiferaasiaktiivisuuden mittaukset

27. Luminesenssi mitataan käyttämällä 96-kuoppaisen mikrolevyn luminometriä, jossa on optiset suodattimet. Tällaisia laitteita ovat esimerkiksi Phelios (ATTO, Tokio, Japani), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Saksa) ja ARVO-sarja (PerkinElmer, Waltham, MA, Yhdysvallat). Luminometri on kalibroitava jokaiseen testiin toistettavuuden varmistamiseksi (19). Kalibrointia varten saatavana on rekombinantteja oranssia ja punaista valoa emittoivia lusiferaaseja.

28. Esilämmitettyä Tripluc®-lusiferaasitestin reagenssia (Tripluc) laitetaan 100 µl kemikaalilla käsiteltyä tai käsittelemätöntä solususpensiota sisältävän levyn jokaiseen kuoppaan. Levyä sekoitetaan 10 minuuttia noin 20°C:n lämpötilassa, ja sen jälkeen levy asetetaan luminometriin lusiferaasiaktiivisuuden mittaamiseksi. Bioluminesenssia mitataan 3 sekuntia sekä optista suodatinta käyttämättä (F0) että sitä käyttäen (F1). Toisenlaisten asetusten (jotka määräytyvät esimerkiksi käytettävän luminometrin mallin mukaan) käyttäminen on perusteltava.

29. Jokaisen pitoisuuden parametrit lasketaan mitatuista arvoista, joita ovat IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta, GAPLAn keskiarvo ± keskihajonta, nIL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta, Ind-IL8LA:n keskiarvo ± keskihajonta, Inh-GAPLA:n keskiarvo ± keskihajonta sekä Ind-IL8LA:n 95 prosentin luottamusväli. Tässä kohdassa käytettyjen parametrien määritelmät on esitetty lisäyksessä 3.1 ja 3.4.

30. Ennen mittausta monivärisissä reportteritesteissä tehdään yleensä värierottelu käyttämällä ilmaisimia (luminometri ja levylukija), joissa on optiset suodattimet, kuten tarkkuussuodattimet (yli- tai alipäästö) tai kaistanpäästösuodattimet. Suodattimien transmissiokertoimet jokaisen bioluminesenssisignaalin värin osalta on kalibroitava ennen testausta lisäyksen 3.2 mukaisesti.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tietojen arviointi

31. Positiivisen/negatiivisen päätöksen perusteissa edellytetään, että jokaisessa testiajossa

— IL-8 Luc -testin ennuste on positiivinen, jos testikemikaalin Ind-IL8LA-arvo on ≥ 1,4 ja Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusvälin alaraja on ≥ 1,0

— IL-8 Luc -testin ennuste on negatiivinen, jos testikemikaalin Ind-IL8LA-arvo on < 1,4 ja/tai Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusvälin alaraja on < 1,0.

Ennustemalli

32. Testikemikaalit, joista saadaan kaksi positiivista tulosta ensimmäisessä, toisessa, kolmannessa tai neljännessä ajossa, määritetään positiivisiksi, kun taas ne testikemikaalit, joista saadaan kolme negatiivista tulosta ensimmäisessä, toisessa, kolmannessa tai neljännessä ajossa, määritetään oletettavasti negatiivisiksi (taulukko 2). Oletettavasti negatiivisista kemikaaleista ne, jotka liukenevat X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml, katsotaan negatiivisiksi, kun taas ne, jotka eivät liukene tähän liuokseen tällä pitoisuudella, on jätettävä pois analyysista (kuva 1).

▼M8

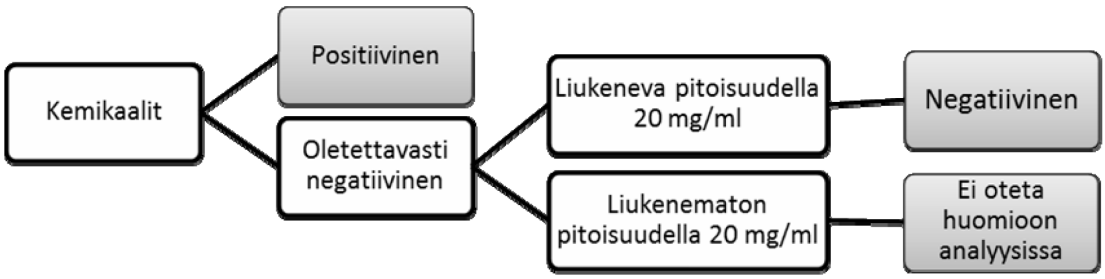
Taulukko 2

Positiivisten ja oletettavasti negatiivisten kemikaalien määrittämisperusteet

1. testiajo	2. testiajo	3. testiajo	4. testiajo	Lopullinen ennuste
Positiivinen	Positiivinen	–	–	Positiivinen
	Negatiivinen	Positiivinen	–	Positiivinen
		Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen	–	Positiivinen
		Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
	Negatiivinen	Positiivinen	Positiivinen	Positiivinen
			Negatiivinen	Oletettavasti negatiivinen
		Negatiivinen	–	Oletettavasti negatiivinen

Kuva 1

Lopullisen arvion ennustemalli



Hyväksymisperusteet

33. Seuraavien hyväksyntäperusteiden pitää täyttyä IL-8 Luc -testiä käytettäessä:

— Ind-IL8LA-arvon on oltava yli 5,0 vähintään yhdellä positiivisen kontrollin (4-NBB) pitoisuudella jokaisessa testiajossa.

— Ind-IL8LA-arvon on oltava alle 1,4 millä tahansa negatiivisen kontrollin (maitohappo) pitoisuudella jokaisessa testiajossa.

— Sellaiset tiedot levyiltä, joissa soluja ja Triplucia mutta ei kemikaaleja sisältävien kontrollikuoppien GAPLA-arvo on alle viisi kertaa vain testiliuosta (50 µl RPMI-1640-liuosta (joka sisältää 10 prosenttia FBS:ää) / kuoppa ja 50 µl X-VIVO™ 15:tä / kuoppa) sisältävien kuoppien arvosta, on hylättävä.

— Tiedot levyiltä, joissa testi- tai kontrollikemikaalien kaikkien pitoisuuksien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05, on hylättävä. Tässä tapauksessa ensimmäinen testi on toistettava, jolloin toistetun testin suurin loppupitoisuus on edellisen testin pienin loppupitoisuus.

▼M8

Testiraportti

34. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaalit

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot tarvittaessa ja sen mukaan kuin on käytännössä mahdollista jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— liukoisuus X-VIVO™ 15:een. Siihen liukenemattomien kemikaalien osalta tieto siitä, oliko sentrifugoinnin jälkeen havaittavissa saostumista tai flotaatiota.

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta, jos X-VIVO™ 15:tä ei ole käytetty.

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi kemiallinen koostumus (ks. edellä), puhtaus, esiintymistiheys ja ainesosien olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. edellä), sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— molekyylipaino tai näennäinen molekyylipaino, jos kyse on seoksista/polymeereista, joiden koostumus tunnetaan, tai muita tutkimuksen tekemisen kannalta olennaisia tietoja

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— liukoisuus X-VIVO™ 15:een. Siihen liukenemattomien kemikaalien osalta tieto siitä, oliko sentrifugoinnin jälkeen havaittavissa saostumista tai flotaatiota.

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja vakaus, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen/kantaja-aineen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta, jos X-VIVO™ 15:tä ei ole käytetty.

Kontrollit

Positiivinen kontrolli:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t), SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava ja/tai muut tunnistetiedot

— fyysinen ulkonäkö, vesiliukoisuus, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tarvittaessa ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

▼**M8**

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— tarvittaessa käsittely ennen testiä (esimerkiksi lämmittäminen tai jauhaminen)

— testattu pitoisuus (testatut pitoisuudet)

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— tarvittaessa viittaus aiempiin positiivisten kontrollien tuloksiin, jotka kertovat sopivista hyväksymisperusteista.

Negatiivinen kontrolli:

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi (-nimet), CAS-numero(t) ja/tai muut tunnisteet

— puhtaus, epäpuhtauksien kemiallinen luonne, sikäli kuin ne on tarkoituksenmukaista ja käytännössä mahdollista ilmoittaa, jne.

— fyysinen ulkonäkö, molekyylipaino ja muut olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos negatiiviset kontrollit ovat muita kuin testiohjeessa mainittuja, ja sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— säilytysolosuhteet ja stabiilius, sikäli kuin tiedot ovat saatavissa

— liuottimen valintaperusteet kunkin testikemikaalin osalta.

Testiolosuhteet

— tutkimuksen teettäjän nimi ja osoite, testauslaitos ja tutkimusjohtaja

— kuvaus käytetystä testistä

— käytetty solulinja, sen säilytysolosuhteet ja lähde (esimerkiksi laitos, josta se on peräisin)

— FBS:n eränumero ja alkuperä, toimittajan nimi, 96-kuoppaisen tasapohjaisen mustan levyn eränumero ja Tripluc-reagenssin eränumero

— siirrostusten lukumäärä ja testauksessa käytetty solutiheys

— testaamista edeltävään kylvöön käytetty solujen laskentamenetelmä ja toimenpiteet, joilla on varmistettu solujen määrän tasainen jakautuminen

— käytetty luminometri (esimerkiksi malli), myös instrumenttiasetukset, käytetty lusiferaasisubstraatti sekä lisäyksessä 3.2 kuvattuun kontrollitestiin perustuvien asianmukaisten luminesenssimittausten esittely

— menettely, jolla on osoitettu laboratorion pätevyys tehdä testi (esimerkiksi pätevyyden osoittamiseen tarkoitettujen aineiden testaaminen) tai testin toistettavuus ajan mittaan.

Testimenettely

— rinnakkaisnäytteiden ja tehtyjen testiajojen lukumäärä

— testikemikaalien pitoisuudet, applikointimenettely ja altistusaika (jos se poikkeaa suosituksesta)

▼**M8**

— kuvaus käytetyistä arviointi- ja päätöskriteereistä

— kuvaus tutkimukselle asetetuista hyväksymisperusteista

— kuvaus testimenettelyjen mahdollisista muutoksista.

Tulokset

— IL8LA- ja GAPLA-arvojen mittaukset

— nIL8LA-, Ind-IL8LA- ja Inh-GAPLA-arvojen laskelmat

— Ind-IL8LA-arvon 95 prosentin luottamusväli

— kaavio, jossa kuvataan lusiferaasiaktiivisuuden induktion ja elinkyvyn annos-vastekäyrät

— tarvittaessa muiden olennaisten havaintojen kuvaus.

Tulosten tarkastelu

— IL-8 Luc -testillä saatujen tulosten tarkastelu

— testitulosten tarkastelu IATAn valossa, jos saatavana on muita olennaisia tietoja.

Päätelmät

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359–69.

(2) OECD (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OECD (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OECD (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371–9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816–30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337–51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275–84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147–155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646–57.

(11) OECD (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286–91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271–9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891–4.

(15) OECD (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France

(16) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OECD, Paris, France.

(17) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Saatavana osoitteessa http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, saatavana osoitteessa http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046–9.

▼**M8**

(20) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OECD, Paris, France.

(21) United Nations (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Saatavana osoitteessa http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

▼**M8**

Lisäys 3.1

MÄÄRITELMÄT

Tarkkuus: Testitulosten ja hyväksyttyjen vertailuarvojen välinen ero. Tarkkuus on testimenetelmän suorituskyvyn mitta ja yksi merkityksellisyyden osatekijöistä. Tarkkuutta ja vastaavuutta (konkordanssi) käytetään usein toisiaan korvaavasti tarkoittamaan testillä saatujen oikeiden tulosten osuutta (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway), haittavaikutusreitti: Tarkastelun kohteena olevan kemikaalin tai samankaltaisten kemikaalien ryhmän kemiallisesta rakenteesta johtuva tapahtumasarja molekyylitasolla tapahtuvasta käynnistävästä tapahtumasta kiinnostuksen kohteena olevaan lopputulokseen *in vivo* (20).

Kemikaali: Aine tai seos.

CV05: Solujen elinkyky (cell viability) 05 eli pienin pitoisuus, jolla kemikaalien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05.

FInSLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa Ind-IL8LA-arvoa. Ks. Ind-IL8LA:n määritelmä.

GAPLA: Vakaan lusiferaasipunaisen (SLR) lusiferaasiaktiivisuus (λmaks. = 630 nm), jota säätelee GAPDH:n promoottori. Arvo kertoo solujen elinkyvyn ja elinkykyisten solujen lukumäärän.

Vaara: Aineen tai tilanteen luontainen ominaisuus, jolla on kyky aiheuttaa haitallisia vaikutuksia, kun organismi, järjestelmä tai (ala)populaatio altistuu kyseiselle aineelle.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Jäsennelty lähestymistapa, jota käytetään kemikaalin tai kemikaaliryhmän aiheuttaman vaaran tunnistamiseen (potentiaali), vaaran luonnehtimiseen (potenssi) ja/tai turvallisuuden arviointiin (potentiaali/potenssi ja altistus), kokoamalla ja punnitsemalla kaikki strategisesti keskeiset tiedot, jotta voidaan tarjota tietoa sääntelyyn perustuvaan päätöksentekoon potentiaalisesta vaarasta ja/tai riskistä ja/tai tarpeesta tehdä lisää kohdennettua ja siksi mahdollisimman vähäistä testausta.

II-SLR-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa Inh-GAPLA-arvoa. Ks. Inh-GAPLA:n määritelmä.

IL-8 (interleukiini-8): Endoteelisoluista, fibroblasteista, keratinosyyteistä, makrofageista ja monosyyteistä saatava sytokiini, joka aiheuttaa neutrofiilien ja T-solulymfosyyttien kemotaksiaa.

IL8LA: Vakaan lusiferaasioranssin (SLO) lusiferaasiaktiivisuus (λmaks. = 580 nm), jota säätelee IL-8:n promoottori.

Ind-IL8LA: nIL8LA:n induktiokerroin. Se saadaan jakamalla kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen nIL8LA-arvo stimuloimattomien THP-G8-solujen vastaavalla arvolla, ja se kertoo kemikaalien aiheuttamasta IL-8:n promoottorin aktivoitumisesta.

Inh-GAPLA: GAPLA:n inhibitio. Se saadaan jakamalla kemikaaleilla käsiteltyjen THP-G8-solujen GAPLA-arvo käsittelemättömien THP-G8-solujen vastaavalla arvolla, ja se kertoo kemikaalien sytotoksisuudesta.

Vähimmäisinduktioraja: Pienin pitoisuus, jolla positiivisen tuloksen perusteet täyttyvät kemikaalin osalta.

▼M8

Seos: Seos tai liuos, joka koostuu kahdesta tai useammasta aineesta.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on vähintään 80 painoprosenttia yhtä pääainesosaa.

Useasta ainesosasta koostuva aine: Aine, jossa sen kvantitatiivisen koostumuksen perusteella on useampaa kuin yhtä pääainesosaa ja jonka ainesosien pitoisuudet ovat ≥ 10 painoprosenttia ja < 80 painoprosenttia. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy valmistusprosessin tuloksena. Seoksen ja useasta ainesosasta koostuvan aineen välinen ero on se, että seos saadaan aikaan sekoittamalla kahta tai useampaa ainetta ilman kemiallista reaktiota. Useasta ainesosasta koostuva aine syntyy kemiallisen reaktion tuloksena.

nIL8LA: SLO-lusiferaasiaktiivisuus, joka kuvastaa IL-8:n promoottorin aktiivisuutta (IL8LA) normalisoituna SLR-lusiferaasiaktiivisuudella, joka kuvastaa GAPDH:n promoottorin aktiivisuutta (GAPLA). Se kuvastaa IL-8:n promoottorin aktiivisuutta solujen elinkyky tai solujen lukumäärä huomioon ottaen.

nSLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa nIL8LA-arvoa. Ks. nIL8LA:n määritelmä.

Positiivinen kontrolli: Rinnakkaisnäyte, jossa on kaikki testijärjestelmän osat ja joka on käsitelty aineella, jonka tiedetään aiheuttavan positiivisen vasteen. Vaste ei kuitenkaan saisi olla liian voimakas, jotta positiivisen kontrollivasteen vaihtelu ajan funktiona voidaan arvioida.

Prehapteenit: Kemikaalit, joista tulee herkistäviä aineita abioottisen transformaation jälkeen.

Prohapteenit: Kemikaalit, jotka vaativat entsymaattista aktivointia ihoa herkistävän potentiaalin käynnistymiseen.

Merkityksellisyys: Kuvaus testin ja toivotun vaikutuksen välisestä suhteesta ja siitä, onko testi tarkoituksenmukainen ja hyödyllinen tiettyä tarkoitusta varten. Merkityksellisyydellä tarkoitetaan sitä, missä määrin testillä voidaan tarkasti mitata tai ennustaa haluttua biologista vaikutusta. Merkityksellisyyden yhteydessä on huomioitava myös testin tarkkuus (vastaavuus) (16).

Luotettavuus: Mittaa sitä, miten testi voidaan toistaa samassa laboratoriossa tai eri laboratorioissa ajan myötä käytettäessä samaa protokollaa. Sitä arvioidaan laskemalla laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen uusittavuus ja laboratorion sisäinen toistettavuus (16).

Testiajo: Testiajo koostuu yhdestä tai useammasta testikemikaalista, jotka testataan samanaikaisesti liuotin-/kantaja-ainekontrollin ja positiivisen kontrollin kanssa

Herkkyys: Niiden positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testin tarkkuutta. Herkkyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (16).

SLO-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa IL8LA-arvoa. Ks. IL8LA:n määritelmä.

SLR-LA: Validointiraportissa ja aiemmissa IL-8 Luc -testiä koskevissa julkaisuissa käytetty lyhenne, joka tarkoittaa GAPLA-arvoa. Ks. GAPLA:n määritelmä.

▼M8

Liuotin-/kantaja-ainekontrolli: Käsittelemätön näyte, jossa on testikemikaalia lukuun ottamatta kaikki testijärjestelmän osat, myös liuotin tai kantaja-aine. Sitä käytetään perusvastetason määrittämiseen näytteille, joissa testikemikaali on liuotettu tai dispergoitu stabiilisti samaan liuottimeen tai kantaja-aineeseen. Kun tällainen näyte testataan samanaikaisesti kasvatusliuoskontrollin kanssa, se osoittaa myös, reagoiko liuotin/kantaja-aine testijärjestelmän kanssa.

Spesifisyys: Kaikkien negatiivisten/inaktiivisten kemikaalien osuus, jotka on luokiteltu testissä oikein. Sillä mitataan luokittavia tuloksia tuottavan testimenetelmän tarkkuutta. Spesifisyys on tärkeää ottaa huomioon arvioitaessa testin merkityksellisyyttä (16).

Aine: Alkuaine ja sen yhdisteet sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa tai tuotantomenetelmin tuotettuina, mukaan luettuina aineen pysyvyyden säilyttämiseksi tarvittavat lisäaineet ja käytetyssä prosessissa muodostuvat epäpuhtaudet, ei kuitenkaan liuottimia, jotka voidaan erottaa vaikuttamatta aineen pysyvyyteen tai muuttamatta sen koostumusta.

Pinta-aktiivinen aine: Aine, esimerkiksi detergentti, joka voi vähentää nesteen pintajännitettä ja saada sen siten vaahtoamaan tai läpäisemään kiinteitä aineita. Tunnetaan myös vettymistä edistävänä aineena. (TG437)

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

THP-G8: IL-8-reportterisolulinja, jota käytetään IL-8 Luc -testissä. Ihmisen makrofagin kaltaiseen THP-1-solulinjaan transfektoitiin SLO- ja SLR-lusiferaasigeenit IL-8:n ja GAPDH:n promoottorien säätelemänä.

YK:n maailmanlaajuisesti yhdenmukaistettu kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmä (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): Tässä järjestelmässä kemikaalit (aineet ja seokset) luokitellaan vakioitujen fysikaalisten sekä terveys- ja ympäristövaarojen tyyppien ja tasojen mukaisesti, ja niille osoitetaan vaaraviestinnän tunnukset, kuten kuvamerkit, huomiosanat, vaaralausekkeet, turvalausekkeet ja turvatiedotteet, jotta voidaan välittää tietoa kemikaalien haittavaikutuksista ihmisten (esimerkiksi työnantajien, työntekijöiden, kuljetushenkilökunnan, kuluttajien ja pelastushenkilöstön) ja ympäristön suojelemiseksi (21).

UVCB-aineet: Koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit.

Validi testimenetelmä: Testi, jonka katsotaan olevan riittävän relevantti ja luotettava tiettyyn tarkoitukseen ja joka perustuu tieteellisesti vakaisiin periaatteisiin. Mitään testiä ei voida koskaan pitää absoluuttisesti validoituna vaan ainoastaan validoituna suhteessa määritettyyn tarkoitukseen.

▼**M8**

Lisäys 3.2

LUSIFERAASIAKTIIVISUUDEN MITTAUSPERIAATE JA OPTISEN SUODATTIMEN TRANSMISSIOKERTOIMIEN MÄÄRITTÄMINEN SLO:TA JA SLR:ÄÄ VARTEN

MultiReporter-testijärjestelmää (Tripluc) voidaan käyttää sellaisen mikrolevytyyppisen luminometrin kanssa, jossa on monivärinen havaintojärjestelmä ja johon voidaan liittää optinen suodatin (esim. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). Mittauksessa käytettävä optinen suodatin on 600–620 nm:n yli- tai alipäästösuodatin tai 600–700 nm:n kaistanpäästösuodatin.

Kaksiväristen lusiferaasien mittaaminen optisella suodattimella.

Tässä esimerkissä käytettävä laite on Phelios AB-2350 (ATTO). Tässä luminometrissä on 600 nm:n ylipäästösuodatin (R60 HOYA Co. 600 nm:n ylipäästösuodatin 1) SLO:n (λmaks. = 580 nm) ja SLR:n (λmaks. = 630 nm) luminesenssin jaottelemiseen.

Jotta voidaan määrittää 600 nm:n ylipäästösuodattimen transmissiokertoimet, mitataan puhdistettuja SLO- ja SLR-lusiferaasientsyymejä käyttämällä i) SLO:n ja SLR:n bioluminesenssin intensiteetti ilman suodatinta (F0), ii) SLO:n ja SLR:n bioluminesenssin intensiteetti, joka läpäisi 600 nm:n ylipäästösuodattimen (suodatin 1) ja iii) lasketaan 600 nm:n ylipäästösuodattimen transmissiokertoimet SLO:lle ja SLR:lle jäljempänä selostetun mukaisesti.

Transmissiokerroin		Lyhenne	Määritelmä
SLO	Suodatin 1Transmissiokerroin	$=\kappa O_{R60}$	Suodattimen transmissiokerroin SLO:lle
SLR	Suodatin 1Transmissiokerroin	κR_{R60}	Suodattimen transmissiokerroin SLR:lle

Jos testinäytteen SLO:n ja SLR:n intensiteetti määritetään kirjaimilla O ja R, i) valon intensiteetti ilman suodatinta (optinen) F0 ja ii) valon intensiteetti, joka siirtyy 600 nm:n ylipäästösuodattimen läpi (suodatin 1) F1, kuvataan jäljempänä selostetun mukaisesti.

F0=O+R

$F1=\kappa O_{R60}$ x O + κR_{R60} x R

Nämä kaavat voidaan ilmaista myös näin:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

O- ja R-arvo lasketaan käyttämällä laskettuja transmissiokertoimia (κO_{R60} ja κR_{R60}) ja mitattuja F0- ja F1-arvoja seuraavasti:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼M8

Transmissiokertoimen määrittämisessä tarvittavat materiaalit ja käytettävät menetelmät

1) *Reagenssit*

Yksittäiset puhdistetut lusiferaasientsyymit:

Kylmäkuivattu puhdistettu SLO-entsyymi

Kylmäkuivattu puhdistettu SLR-entsyymi

(joille on saatu validointitiedot GPC Lab. Co. Ltd:ltä Tottorista Japanista THP-G8-solulinjan kanssa)

Testireagenssi:

Tripluc®-lusiferaasitestin reagenssi (toimittaja esimerkiksi TOYOBO, luettelonro MRA-301)

Kasvatusliuos: Lusiferaasitestille (30 ml, säilytys 2–8 °C)

Reagenssi	Pit.	Loppupit. kasvatusliuoksessa	Tarvittava määrä
RPMI-1640	—	—	27 ml
FBS	—	10 %	3 ml

2) *Entsyymiliuoksen valmistus*

Liuota kylmäkuivattu puhdistettu lusiferaasientsyymi putkessa lisäämällä 200 µl Tris/HCl:ää (10 ~ 100 mM) tai Hepes/HCl:ää (pH 7,5 ~ 8,0), jota on täydennetty 10 prosentilla (paino/tilavuus) glyserolia. Jaa entsyymiliuos 10 µl:n alikvootteihin 1,5 ml:n kertakäyttöputkiin ja laita ne pakastimeen -80 °C:seen. Pakastettua entsyymiliuosta voidaan käyttää enintään kuusi kuukautta. Kun liuosta tarvitaan, lisää jokaiseen entsyymiliuosta (laimennettu entsyymiliuos) sisältävään putkeen 1 ml lusiferaasitestin kasvatusliuosta (RPMI-1640, sis. 10 % FBS:ää) ja laita ne jäähauteeseen deaktivoitumisen estämiseksi.

3) *Bioluminesenssin mittaaminen*

Sulata Tripluc®-lusiferaasitestin reagenssi (Tripluc) ja säilytä sitä huoneenlämpötilassa joko vesihauteessa tai ympäröivän ilman lämpötilassa. Kytke luminometriin virta 30 minuuttia ennen mittauksen aloittamista, jotta valomonistin ehtii stabiloitua. Laita 100 µl laimennettua entsyymiliuosta mustalle 96-kuoppaiselle levylle (tasapohja) (SLO-vertailunäyte kuoppiin B1, B2, B3 ja SLR-vertailunäyte kuoppiin D1, D2, D3). Laita sen jälkeen pipetillä 100 µl esilämmitettyä Triplucia levyn jokaiseen kuoppaan, joka sisältää laimennettua entsyymiliuosta. Ravista levyä noin 10 minuuttia huoneenlämpötilassa (noin 25 °C) levyravistelijaa käyttäen. Poista kuplat, jos niitä ilmaantuu kuopissa oleviin liuoksiin. Aseta levy luminometriin ja mittaa lusiferaasiaktiivisuus. Bioluminesenssia mitataan 3 sekuntia sekä optista suodatinta käyttämättä (F0) että sitä käyttäen (F1).

Optisen suodattimen transmissiokerroin laskettiin näin:

Transmissiokerroin (SLO (κO_{R60}))= (F1:n B1 + F1:n B2 + F1:n B3) / (F0:n B1+ F0:n B2 + F0:n B3)

▼**M8**

Transmissiokerroin (SLR (κO_{R60}))= (F1:n D1 + F1:n D2 + F1:n D3) / (F0:n D1+ F0:n D2 + F0:n D3)

Laskettuja transmissiokertoimia käytetään kaikkiin mittauksiin, jotka tehdään samalla luminometrillä.

Laitteiden laadunvalvonta

IL-8 Luc -protokollassa kuvattuja menettelyjä on käytettävä (18).

▼**M8**

Lisäys 3.3

PÄTEVYYDEN OSOITTAMISEEN TARKOITETUT AINEET

Ennen kuin laboratorio alkaa käyttää tätä testimenetelmää B.71 koskevassa lisäyksessä kuvattua testiä rutiininomaisesti, sen pitää osoittaa tekninen pätevyytensä saamalla odotuksenmukainen ennuste IL-8 Luc -testistä yhdeksälle taulukossa 1 suositellulle pätevyyden osoittamiseen tarkoitetulle aineelle ja saamalla arvot, jotka ovat vastaavilla viitealueilla, ainakin kahdeksalle yhdeksästä pätevyyden osoittamiseen tarkoitetusta aineesta (jotka on valittu edustamaan ihon herkistymisvaarojen vastealuetta). Muita valintaperusteita ovat, että aineiden on oltava kaupallisesti saatavilla ja että saatavilla on korkeatasoisia *in vivo*- ja *in vitro* -vertailutietoja, jotka on tuotettu IL-8 Luc -testillä. Myös IL-8 Luc -testistä on saatavana julkaistuja vertailutietoja (6) (1).

Taulukko 1

Suositellut aineet IL-8 Luc -testiä koskevan teknisen pätevyyden osoittamiseksi

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut aineet	CAS-nro	Olomuoto	Liukoisuus X-VIVO15:ssä, pit. 20 mg/ml	*In vivo* -ennuste ([1])	IL-8 Luc -ennuste ([2])	Viitealue (µg/ml) ([3])	
						CV05 ([4])	IL-8 Luc MIT ([5])
2,4-dinitroklooribentseeni	97-00-7	Kiinteä	Liukenematon	Herkistävä (erittäin voimakas)	Positiivinen	2,3-3,9	0,5-2,3
Formaldehydi	50-00-0	Neste	Liukoinen	Herkistävä (voimakas)	Positiivinen	9-30	4-9
2-merkaptobentsotiatsoli	149-30-4	Kiinteä	Liukenematon	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	250-290	60-250
Etyleenidiamiini	107-15-3	Neste	Liukoinen	Herkistävä (kohtalainen)	Positiivinen	500-700	0,1-0,4
Etyleeniglykolidimetakrylaatti	97-90-5	Neste	Liukenematon	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	>2 000	0,04-0,1
4-allyylianisoli (estragoli)	140-67-0	Neste	Liukenematon	Herkistävä (heikko)	Positiivinen	>2 000	0,01-0,07
Streptomysiinisulfaatti	3810-74-0	Kiinteä	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000
Glyseroli	56-81-5	Neste	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000
Isopropanoli	67-63-0	Neste	Liukoinen	Herkistämätön	Negatiivinen	>2 000	>2 000

Lyhenteet: CAS-nro = Chemical Abstracts Service -rekisterinumero.
([1]) *In vivo* potenssi on saatu käyttämällä ECETOC:n esittämiä kriteerejä (19).
([2]) Aikaisemmin saatujen arvojen perusteella (1) (6).
([3]) CV_{05} ja IL-8 Luc MIT laskettiin käyttämällä EPI Suite™:llä saatua vesiliukoisuutta.
([4]) CV_{05}: pienin pitoisuus, jolla kemikaalien Inh-GAPLA-arvo on alle 0,05.
([5]) MIT: pienin pitoisuus, jolla positiivisen tuloksen perusteet täyttyvät kemikaalin osalta.

▼M8

Lisäys 3.4

SUHDELUVUT JA ARVIOINTIPERUSTEET

nIL8LA (nSLO-LA)

I-pitoisuuden (i = 0–11) j:s toisto (j = 1–4) mitataan IL8LA-arvolle (SLO-LA) ja GAPLA-arvolle (SLR-LA). Normalisoitu IL8LA, josta käytetään lyhennettä nIL8LA (nSLO-LA), määritetään näin:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Tämä on mittauksen perusyksikkö tässä testissä.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

Keskimääräisen nIL8LA:n (nSLO-LA) induktiokerroin, joka koskee i:nnen pitoisuuden toistoa verrattuna siihen 0-pitoisuuden yhteydessä (Ind-IL8LA), on tärkein luku tässä testissä. Tämä suhde saadaan seuraavalla kaavalla:

$$Ind - IL8LA_i = \left\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j}\right\}$$

Johtava laboratorio on ehdottanut, että arvo 1,4 vastaa positiivista tulosta testatulle kemikaalille. Tämä arvo perustuu johtavan laboratorion aikaisempien tietojen tarkasteluun. Aineistonhallintaryhmä käytti tätä arvoa sittemmin kaikissa validointitutkimuksen vaiheissa. Tärkein tulos, Ind-IL8LA, on kahden aritmeettisen keskiarvon suhde, kuten yhtälö osoittaa.

95 prosentin luottamusväli (95 % CI)

Suhdelukuun perustuvalla 95 prosentin luottamusvälillä (95 % CI) voidaan arvioida tämän tärkeimmän tulosluvun tarkkuutta. Jos 95 prosentin luottamusvälin alaraja on ≥ 1, se osoittaa, että i:nnenteen pitoisuuteen liittyvä nIL8LA on huomattavasti suurempi kuin liuotinkontrollilla saatu arvo. On monia tapoja laskea 95 prosentin luottamusväli. Tässä tutkimuksessa olemme käyttäneet Fiellerin teoreema -nimistä menetelmää. Tämä 95 prosentin luottamusväli -teoreema saadaan seuraavalla kaavalla:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

jossa

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

$t_{0.975(\nu)}$ on keskeisen t-jakauman 97,5-persentiili ja ν on vapausaste, jossa

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) \Big/ \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

Inh-GAPLA on keskimääräisen GAPLA-arvon (SLR-LA) suhde i:nnen pitoisuuden toistoon verrattuna liuotinkontrollin arvoon, ja se lasketaan näin:

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} \Big/ \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

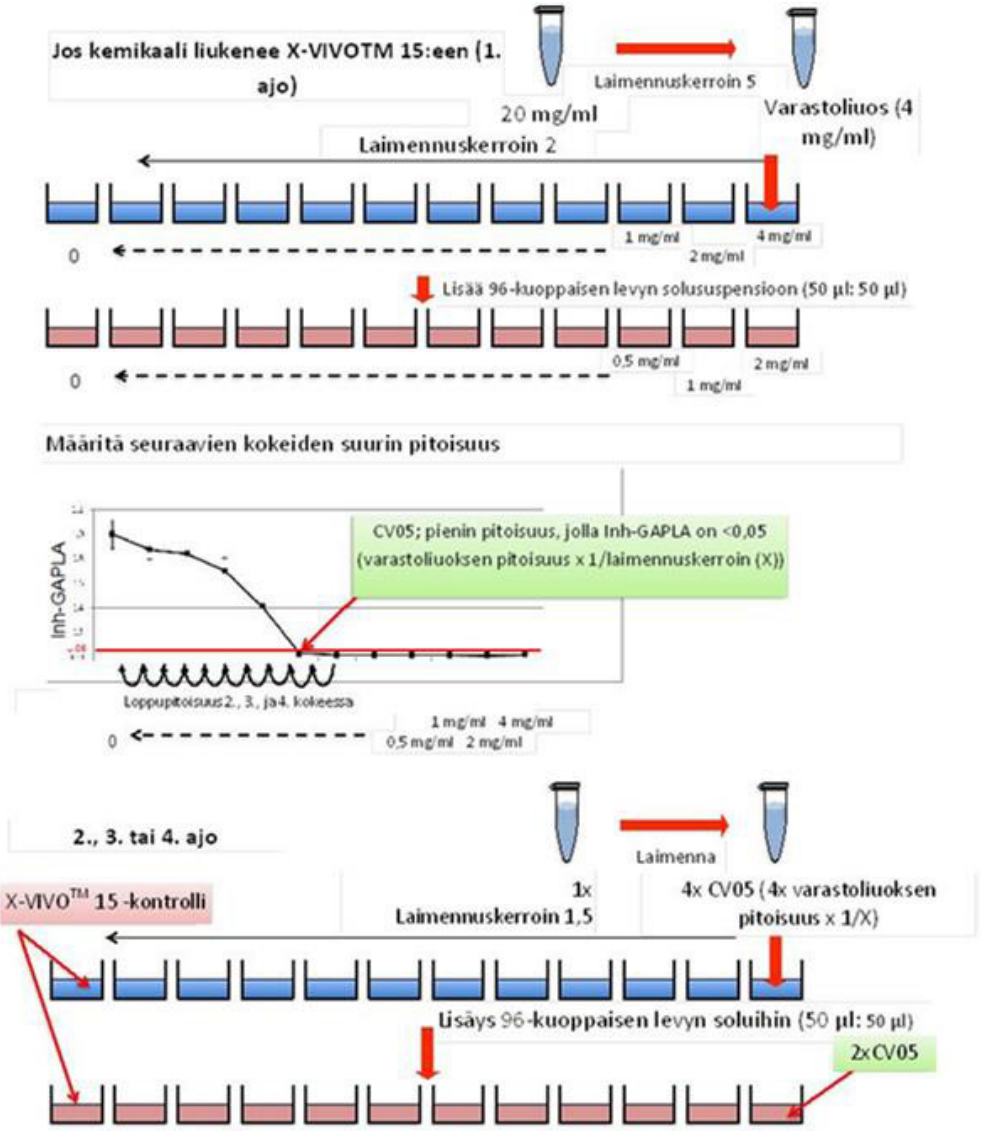
Koska GAPLA on nIL8LA:n nimittäjä, erittäin pieni arvo aiheuttaa suurta vaihtelua nIL8LA-arvoissa. Sen vuoksi Ind-IL8LA-arvot, joihin liittyy erittäin pieni Inh-GAPLA-arvo (alle 0,05), on syytä tulkita huonoksi tarkkuudeksi.

▼**M8**

Lisäys 3.5

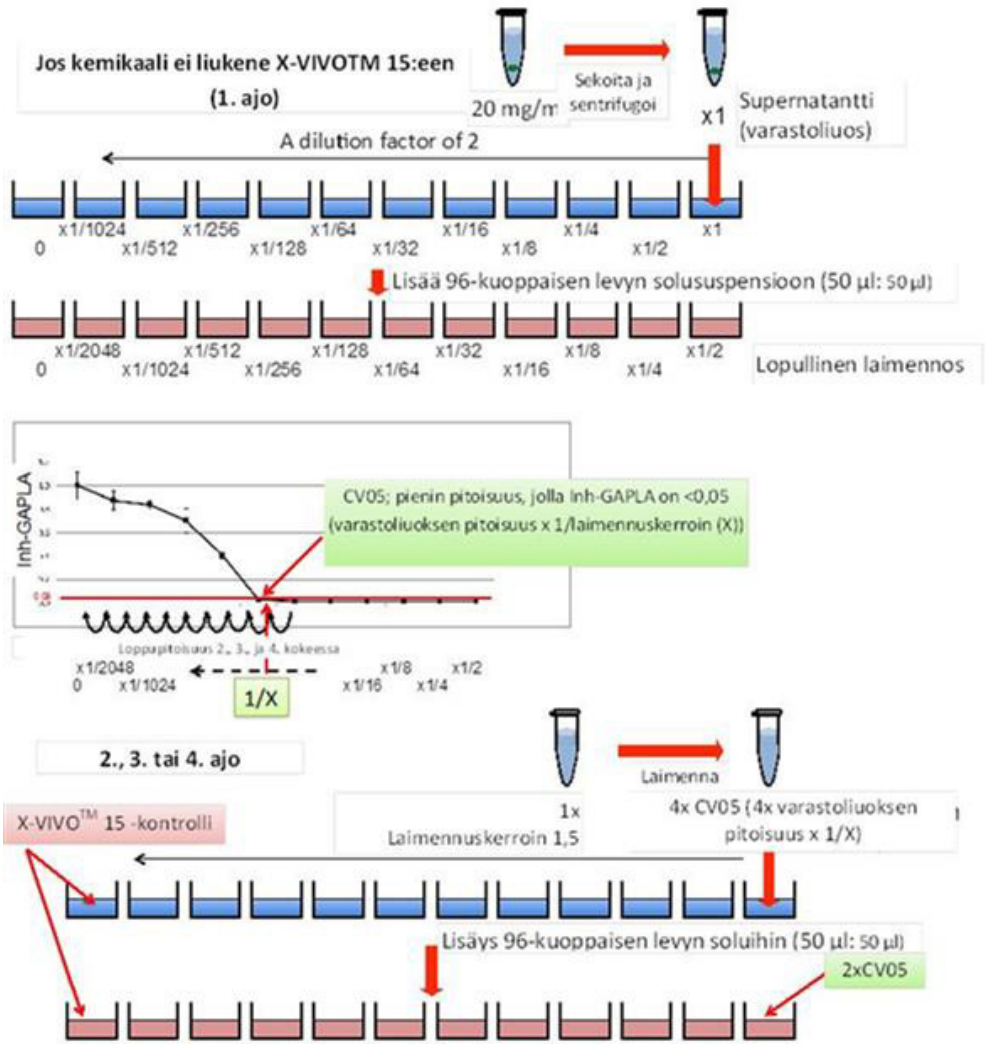
KEMIKAALIEN LIUOTTAMISMENETELMÄT IL-8 LUC -TESTISSÄ.

a) Kemikaalit, jotka liukenevat X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml



▼**M8**

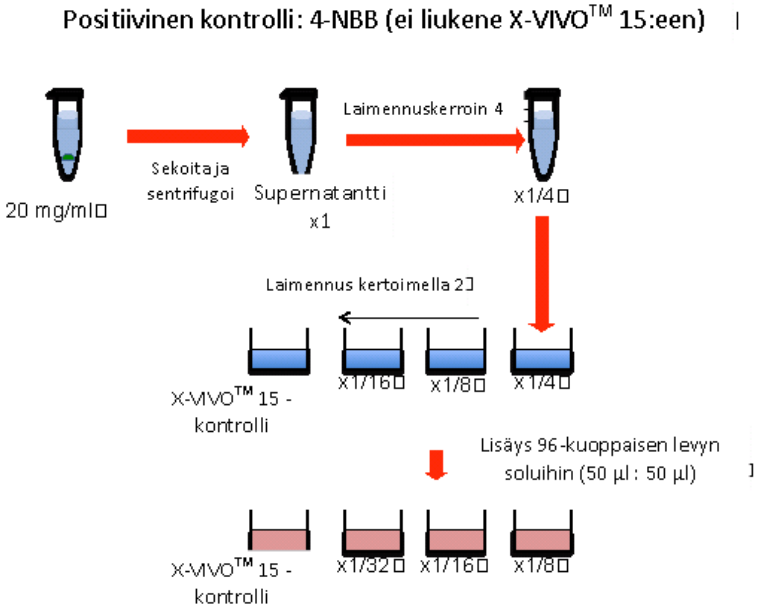
b) Kemikaalit, jotka eivät liukene X-VIVO™ 15:een pitoisuudella 20 mg/ml



▼**M8**

Lisäys 3.6

4-NBB:N LIUOTTAMISMENETELMÄ IL-8 LUC -TESTIN POSITIIVISTA KONTROLLIA VARTEN.



▼B

OSA C: EKOMYRKYLLISYYDEN MÄÄRITTÄMISMENETELMÄT

SISÄLLYSLUETTELO

C.1. AKUUTTI MYRKYLLISYYS KALALLE

C.2. AKUUTIN IMMOBILISAATION TESTI

C.3. MAKEAN VEDEN LEVIEN JA SYANOBAKTEERIEN KASVUNESTYMISTESTI

C.4. BIOHAJOAVUUDEN MÄÄRITYS

OSA I. YLEISTÄ

OSA II. DOC DIE-AWAY-KOE (Menetelmä C.4-A)

OSA III. MUUNNELTU OECD-SEULONTAKOE (Menetelmä C.4-B)

OSA IV. HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUMISKOE (Menetelmä C.4-C)

OSA V. MANOMETRINEN RESPIROMETRIAKOE (Menetelmä C.4-D)

OSA VI. SULJETUN PULLON MENETELMÄ (Menetelmä C.4-E)

OSA VII. MITI-KOE (Menetelmä C.4-F)

C.5. HAJOAMINEN — BIOKEMIALLINEN HAPENKULUTUS

C.6. HAJOAMINEN — KEMIALLINEN HAPENKULUTUS

C.7. HAJOAMINEN — ABIOOTTINEN HAJOAMINEN: HYDROLYYSI PH:NFUNKTIONA

C.8. MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MADOILLA

C.9. BIOLOGINEN HAJOAMINEN — ZAHN-WELLENS-TESTI

C.10. SIMULAATIOTUTKIMUS: AEROBINEN VIEMÄRILIETTEEN KÄSITTELY: C.10-A: AKTIIVILIETEYKSIKÖT – C.10-B: BIOKALVOT

C.11. AKTIIVILIETTEEN SOLUHENGITYKSEN INHIBITIOTESTI (HIILEN JA AMMONIUMIN HAPETTUMINEN)

C.12. BIOLOGINEN HAJOAMINEN — MODIFIOITU SCAS-TESTI

C.13. BIOAKKUMULAATIO KALOISSA: ALTISTAMINEN VEDEN JA RAVINNON VÄLITYKSELLÄ

C.14. KALANPOIKASILLA TEHTÄVÄ KASVUTESTI

C.15. KALAN ALKIO- JA RUSKUAISPUSSIVAIHEEN POIKASILLA TEHTÄVÄ LYHYTAIKAINEN MYRKYLLISYYSTESTI

C.16. MEHILÄISET — SUUN KAUTTA TAPAHTUNEEN ALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

C.17. MEHILÄISET — KOSKETUS ALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

C.18. ADSORPTIO/DESORPTIO ERÄTASAPAINOMENETELMÄÄ KÄYTTÄEN

▼B

C.19. MAA-AINEKSIIN JA VIEMÄRILIETTEESEEN SOVELLETTAVAN ADSORPTIOKERTOIMEN *(K_{OC})* MÄÄRITYS KORKEAN SUORITUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIALLA (HPLC)

C.20. LISÄÄNTYMISTESTI VESIKIRPULLA (*DAPHNIA MAGNA*)

C.21. MAAPERÄN MIKROBIT: TYPEN MUUNTUMISTESTI

C.22. MAAPERÄN MIKROBIT: HIILEN MUUNTUMISTESTI

C.23. KEMIKAALIEN AEROBINEN JA ANAEROBINEN HAJOAMINEN MAAPERÄSSÄ

C.24. AEROBINEN JA ANAEROBINEN HAJOAMINEN VESIYMPÄRISTÖN SEDIMENTTIJÄRJESTELMISSÄ

C.25. AEROBINEN MINERALISAATIO PINTAVEDESSÄ – BIOHAJOAVUUDEN SIMULAATIOTESTI

C.26. LIMASKOJEN (*LEMNA*-LAJIEN) KASVUNESTYMISTESTI

C.27. MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN SEDIMENTTIÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

C.28. MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN VETTÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

C.29. BIOHAJOAVUUS – CO_2 SULJETUISSA ASTIOISSA (HEADSPACE-TESTI)

C.30. BIOKERTYVYYS MAALLA ELÄVISSÄ HARVASUKASMADOISSA

C.31. MAAKASVITESTI: ITÄVYYDEN JA ALKUKASVUN TESTAUS

C.32. LISÄÄNTYMISTESTI ÄNKYRIMADOILLA

C.33. LISÄÄNTYMISTESTI LIEROILLA (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI)*

C.34. ANAEROBISTEN BAKTEERIEN TOIMINNAN ESTYMISEN TOTEAMINEN – KAASUNMUODOSTUKSEN VÄHENTYMINEN ANAEROBISESSA MÄDÄTYSLIETTEESSÄ (JÄTEVEDESSÄ)

C.35. MYRKYLLISYYSTESTI *LUMBRICULUS*-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN KÄSITELTYÄ SEDIMENTTIÄ

C.36. MAA-AINEKSESSA TEHTÄVÄ HARSOSÄÄSKENPETOPUNKIN *(HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER)* LISÄÄNTYMISTESTI

C.37. 21PÄIVÄN MITTAINEN SEULONTATUTKIMUS KALOILLA: LYHYTAIKAINEN ESTROGEENI- JA ANDROGEENIAKTIIVISUUTEEN SEKÄ AROMATAASIN ESTOON KOHDISTUVA SEULONTA

C.38. SAMMAKKOELÄINTEN MUODONVAIHDOSTUTKIMUS (AMA-TUTKIMUS)

C.39. MAA-AINEKSESSA TEHTÄVÄ HYPPYHÄNTÄISTEN LISÄÄNTYMISTESTI

▼B

C.40.	SURVIAISSÄÄSKEN KOKO SUKUPOLVEN KIERRON KÄSITTÄVÄ MYRKYLLISYYSTESTI, KÄYTTÄEN VETTÄ TAI SEDIMENTTIÄ, JOIHIN ON LISÄTTY TUTKITTAVAA AINETTA
C.41.	KALOJEN SUKUPUOLIKEHITYSTÄ TUTKIVA TESTI
C.42.	BIOHAJOAVUUS MERIVEDESSÄ
C.43.	ORGAANISTEN AINEIDEN ANAEROBINEN BIOHAJOAVUUS MÄDÄTYSLIETTEESSÄ: MITTAUSKOHTEENA KAASUNTUOTANTO
C.44.	UUTTUMINEN MAAKOLONNEISSA
C.45.	PUUNSUOJA-AINEILLA KÄSITELLYSTÄ PUUSTA AIHEUTUVIEN YMPÄRISTÖPÄÄSTÖJEN ARVIOINTI: LABORATORIOMENETELMÄ PUUTUOTTEILLE, JOTKA EIVÄT OLE PEITETTYJÄ JA JOTKA OVAT KOSKETUKSISSA MAKEAN VEDEN TAI MERIVEDEN KANSSA
C.46.	BIOKERTYVYYS SEDIMENTIN POHJA-AINEKSESSA ELÄVISSÄ HARVASUKASMADOISSA
C.47.	TOKSISUUSTESTI KALOILLA NIIDEN VARHAISKEHITYSVAIHEISSA
C.48.	KALOJEN LYHYTAIKAINEN LISÄÄNTYMISTUTKIMUS
C.49.	KALOJEN ALKIOILLA TEHTÄVÄ AKUUTTIA TOKSISUUTTA KOSKEVA TESTI (FET-TESTI)
C.50.	SEDIMENTITÖN *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* -LAJILLA TEHTÄVÄ TOKSISUUSTESTI
C.51.	*MYRIOPHYLLUM SPICATUM* -LAJILLA TEHTÄVÄ TOKSISUUSTESTI VESISEDIMENTTIJÄRJESTELMÄSSÄ
C.52.	MEDAKALLA TEHTÄVÄ PIDENNETTY YHDEN SUKUPOLVEN LISÄÄNTYMISTESTI
C.53.	SAMMAKKOELÄINTEN TOUKKIEN KASVUA JA KEHITYSTÄ MITTAAVA TESTI

▼B

C.1 AKUUTTI MYRKYLLISYYS KALALLE

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä voidaan määrittää aineen akuutti tappava myrkyllisyys kalalle makeassa vedessä. Sopivimman testimenetelmän (staattinen, puolistaattinen tai läpivirtaus) löytämiseksi on suositeltavaa hankkia mahdollisuuksien mukaan tietoa aineen vesiliukoisuudesta, höyrynpaineesta, kemiallisesta stabiiliudesta, dissosiaatiovakiosta ja biohajoavuudesta. Näin voidaan varmistaa, että aineen pitoisuus pysyy lähes vakiona koejakson aikana.

Kokeen suunnittelussa ja tulosten tulkinnassa on otettava huomioon mahdolliset lisätiedot (esimerkiksi aineen rakennekaava, puhtausaste, merkittävien epäpuhtauksien laatu ja pitoisuus, lisäaineiden läsnäolo ja määrä sekä n-oktanoli/vesi-jakautumiskerroin).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Akuutti myrkyllisyys on selvästi havaittava haitta, joka aiheutuu eliölle lyhyen ajan kuluessa aineelle altistumisen jälkeen. Kuvattavassa kokeessa akuutti myrkyllisyys ilmaistaan tappavan pitoisuuden mediaanina (LC_{50}). Tappavaa pitoisuutta käytettäessä 50 % vedessä olevasta kalaerästä kuolee määritetyn altistusajan kuluessa.

Testattavan aineen kaikki pitoisuudet ilmaistaan painoyksikköinä tilavuutta kohti (mg/l). Pitoisuus voidaan ilmaista myös painoyksikköinä painoa kohti (mg/kg^{-1}).

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuainetta testaamalla voidaan osoittaa, että laboratorio-olosuhteissa testattavien lajien vaste ei ole merkittävästi muuttunut.

Kuvattavaa koetta varten ei ole määritetty vertailuainetta.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Rajatestin (100 mg/l) avulla voidaan osoittaa, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin rajatestipitoisuus.

Kaloja altistetaan veteen lisätylle aineelle eri pitoisuuksia käyttäen 96 tunnin ajan. Kuolleisuus kirjataan vähintään 24 tunnin väliajoin ja mahdollisuuksien mukaan lasketaan kunkin havaintohetken pitoisuus, joka on tappanut 50 % kaloista (LC_{50}).

1.5 LAATUKRITEERIT

Laatukriteerejä on sovellettava sekä rajatestiin että kattavaan testiin.

Kontrolliryhmien kuolleisuus kokeen päätyttyä ei saa ylittää 10:tä % (tai yhtä kalaa, jos ryhmän koko on alle kymmenen kalaa).

Veteen liuenneen hapen pitoisuuden on ollut oltava yli 60 % testilämpötilan ilmakyllästymisarvosta.

▼B

Testattavan aineen pitoisuuden on koko testin ajan oltava vähintään 80 % alkupitoisuudesta.

Jos aine liukenee helposti veteen muodostaen stabiilin liuoksen (aine ei merkittävästi haihdu, pilkkoudu, hydrolysoidu tai adsorboidu), alkupitoisuutta voidaan pitää nimellisenä pitoisuutena. On esitettävä todisteet siitä, että pitoisuudet on pidetty vakiona testin ajan ja että laatukriteerit on täytetty.

Jos aine

i) on huonosti veteen liukenevaa,

ii) pystyy muodostamaan stabiileja emulsioita tai dispersioita,

iii) ei ole stabiilia vesiliuoksissa,

alkupitoisuutena pidetään liuoksesta mitattua pitoisuutta (jos tämä ei ole teknisesti mahdollista, pitoisuus mitataan vesipatsaasta) testin alussa. Pitoisuus määritetään tasapainon saavuttamisen jälkeen, mutta ennen testattavien kalojen lisäämistä.

Tällaisissa tapauksissa testin kuluessa on tehtävä lisämittauksia, joilla voidaan varmistaa todelliset altistuspitoisuudet ja laatukriteerien täyttyminen.

pH-arvo saa vaihdella enintään yhden yksikön verran.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

Käytettävissä on kolme erityyppistä menetelmää:

Staattinen koe

Tässä myrkyllisyyskokeessa vesiliuos ei virtaa (liuokset pysyvät muuttumattomina testin ajan).

Puolistaattinen koe

Tässä kokeessa vesiliuos ei virtaa, mutta se vaihdetaan säännöllisesti (esimerkiksi 24 tunnin väliajoin) eräkohtaisesti.

Läpivirtauskoe

Myrkyllisyyskoe, jossa testikammioiden vesi vaihtuu jatkuvasti. Testattava kemikaali kulkeutuu veden mukana.

1.6.1 **Reagenssit**

1.6.1.1 *Testattavien aineiden liuokset*

Valmistetaan halutun pitoisia kantaliuoksia liuottamalla ainetta ionisoimattomaan veteen tai kohdan 1.6.1.2 mukaiseen veteen.

Halutut testipitoisuudet valmistetaan kantaliuosta laimentamalla. jos testataan suuria pitoisuuksia, aine voidaan liuottaa suoraan laimennusveteen.

▼B

Yleensä aineita ei pidä testata liukoisuusrajan ylittävinä pitoisuuksina. Joidenkin aineiden kohdalla — esimerkiksi sellaisten, jotka liukenevat huonosti veteen (suuri P_{ow}-arvo) ja sellaisten, jotka muodostavat dispersioita todellisen liuoksen sijasta — on hyväksyttävää käyttää liukoisuusrajan ylittävää testipitoisuutta, jotta voidaan varmistaa, että ainetta on liuennut mahdollisimman paljon ja että liuos on stabiili. On kuitenkin tärkeää, että tämä pitoisuus ei muutoin häiritse testijärjestelmää (esimerkiksi muodostamalla veden pinnalle kalvon, joka estää veden hapettumisen).

Jos aine liukenee huonosti veteen, kantaliuoksen valmistamisessa tai aineen dispergoimisessa testiliuokseen voidaan käyttää apuna ultraäänidispersiota, orgaanisia liuottimia, emulsioliuottimia tai dispergoimisaineita. Jos tällaisia apuaineita käytetään, kaikkien testipitoisuuksien on sisällettävä sama määrä apuainetta ja erillinen kalojen kontrolliryhmä on altistettava testisarjan apuainepitoisuudelle. Tällaisten apuaineiden pitoisuudet on pidettävä mahdollisimman matalina, eivätkä ne koskaan saa ylittää arvoa 100 mg/l testiliuosta.

Koe suoritetaan ilman pH-arvon säätöjä. Jos havaitaan merkkejä pH-arvon merkittävästä muutoksesta, on suositeltavaa tehdä toinen koe, jossa käytetään pH-säätöä, ja raportoida tulokset. Tässä tapauksessa kantaliuoksen pH-arvo säädetään samaksi kuin laimennusveden pH-arvo, ellei tätä vastaan ole erityistä syytä. Suositeltavat pH-säätöaineet ovat HCl ja NaOH; pH-säätö on tehtävä siten, ettei kantaliuoksen testiainepitoisuus muutu merkittävästi. Jos pH-säädön seurauksena tapahtuu jokin kemiallinen reaktio tai testiaine saostuu, ilmiö on raportoitava.

1.6.1.2 *Säilytys- ja laimennusvesi*

Voidaan käyttää juomavettä (jossa ei ole potentiaalisesti vaarallisia pitoisuuksia klooria, raskasmetalleja tai muita aineita), hyvänlaatuista luonnonvettä tai sekoitevettä (katso liitettä I). Suositeltavat kovuusarvot ovat 10–250 mg/l $CaCO_3$ ja suositeltavat pH-arvot 6,0–8,5.

1.6.2 **Laite**

Laitteiden on oltava kemiallisesti inerttiä materiaalia. Seuraavat laitteet tarvitaan:

— automaattinen laimennusjärjestelmä (läpivirtauskoetta varten),

— happimittari,

— laite veden kovuuden määritykseen,

— lämpötilan säätölaite,

— pH-mittari.

1.6.3 **Testattavat kalat**

Kalojen on oltava terveitä, eikä niissä saa olla näkyviä epämuodostumia.

▼B

Lajit valitaan käytännöllisten seikkojen perusteella. Tällaisia perusteita ovat esimerkiksi ympärivuotinen saatavuus, ylläpidon helppous, soveltuvuus testaukseen, suhteellinen kemikaaliherkkyys ja muut taloudelliset, biologiset sekä ekologiset tekijät, joilla voi olla vaikutusta. Kalalajien valinnassa on otettava huomioon myös saatujen tietojen vertailukelpoisuus ja voimassa oleva kansainvälinen yhdenmukaistaminen (viite 1).

Luettelo tätä koetta varten suositeltavista kalalajeista on liitteessä 2. Suositeltavia lajeja ovat seeprakala ja kirjolohi.

1.6.3.1 *Säilytys*

Kalat on mieluiten otettava yhdestä ainoasta samanpituisesta ja -ikäisestä kannasta. Kaloja on säilytettävä vähintään 12 päivän ajan seuraavissa olosuhteissa:

Täyttötapa

Täyttötavan on oltava sopiva järjestelmää ja kalalajia ajatellen.

Vesi

Katso kohtaa 1.6.1.2.

Valo

Päivittäisen valojakson pituus on 12–16 tuntia.

Liuenneen hapen pitoisuus

Vähintään 80 % kyllästysarvosta.

Ruokinta

Kaloja ruokitaan kolme kertaa viikossa tai päivittäin. Ruokinta lopetetaan 24 tuntia ennen kokeen alkua.

1.6.3.2 *Kuolleisuus*

48 tunnin asettumisajan jälkeen kuolleisuus kirjataan seuraavia kriteerejä soveltaen:

— yli 10 % populaatiosta seitsemässä päivässä:

koko erä hylätään

— 5–10 % populaatiosta:

tarkkailujaksoa jatketaan seitsemällä päivällä. Ellei lisäkuolleisuutta esiinny, erä hyväksytään

— alle 5 % populaatiosta:

erä hyväksytään.

1.6.4 **Sopeutuminen**

Kaloja on altistettava kokeessa käytettävälle vedelle ja lämpötilalle vähintään seitsemän päivän ajan ennen kalojen käyttöä.

▼B

1.6.5 **Testin suorittaminen**

Ennen varsinaista testiä voidaan tehdä alueenmäärityskoe, jonka avulla saadaan tietoja varsinaisessa testissä käytettävistä pitoisuuksista.

Testiryhmän lisäksi käytetään kontrolliryhmää, jota ei altisteta aineelle. Jos aineen liuottamiseen on käytetty apuainetta, on käytettävä toista kontrolliryhmää, joka altistetaan apuaineelle.

Valitaan staattinen, puolistaattinen tai läpivirtaukseen perustuva menetelmä testattavan aineen fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien mukaan.

Kalat altistetaan aineelle seuraavasti:

— aika: 96 tuntia,

— eläinten määrä: vähintään 7 kalaa pitoisuutta kohti,

— säiliöt: tilavuus on mukautettava kuormitussuosituksen mukaan,

— kuormitus: staattista ja puolistaattista koetta varten kuormituksen enimmäisarvoksi suositellaan 1 g/l (läpivirtausjärjestelmissä kuormitus voi olla suurempi),

— aineen pitoisuus: vähintään viisi pitoisuutta, jotka poikkeavat toisistaan kertoimella, jonka enimmäisarvo on 2,2, ja jotka kattavat kuolleisuusalueen 0–100 % mahdollisimman hyvin,

— vesi: katso kohtaa 1.6.1.2,

— valo: 12–16 tuntia valoa päivittäin,

— lämpötila: lajille sopiva lämpötila (katso liitettä 2), joka saa vaihdella yksittäisen kokeen aikana enintään ± 1 ^{o}C,

— veteen liuennut happi: vähintään 60 % valitun lämpötilan ilmakyllästymisarvosta,

— ruokinta: kaloja ei ruokita.

Kalat tutkitaan ensimmäisten 2–4 tunnin aikana ja vähintään 24 tunnin väliajoin. Kalat katsotaan kuolleiksi, jos pyrstön koskettaminen ei tuota mitään reaktiota eikä hengitysliikkeitä voi havaita. Kuolleet kalat poistetaan ja kuolleisuudet kirjataan. Näkyvistä poikkeavuuksista pidetään kirjaa. Näitä ovat esimerkiksi tasapainon menettäminen ja muutokset uintitavassa, hengitystoiminnoissa sekä pigmentaatiossa.

Liuoksen pH, liuennut happi ja lämpötila mitataan päivittäin.

Rajatesti

Tämän testimenetelmän avulla voidaan suorittaa rajatesti pitoisuudella 100 mg/l, millä osoitetaan, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin rajapitoisuus.

Jos aineesta ei saada vesiliuosta, jonka pitoisuus on 100 mg/l, rajatesti tehdään pitoisuudella, joka vastaa aineen liukoisuutta (tai enimmäispitoisuutta, jolla saadaan stabiili dispersio) käytettävään veteen (katso myös kohtaa 1.6.1.1).

▼B

Rajatestiin tarvitaan 7–10 kalaa ja samankokoinen kontrolliryhmä (yksi tai kaksi kontrolliryhmää). (Binomiteorian mukaan LC_{50}-arvo on 99,9 prosentin varmuudella suurempi kuin rajatestissä käytetty pitoisuus, jos yhtään kalaa kymmenestä ei kuole. Jos käytetään 7, 8 tai 9 kalaa, nollakuolleisuus osoittaa vähintään 99 prosentin varmuudella, että LC_{50}-arvo on suurempi kuin käytetty pitoisuus.)

Jos kaloja kuolee, on tehtävä kattava testi. Jos havaitaan vaikutuksia, jotka eivät ole hengenvaarallisia, ne on kirjattava.

2. **TIEDOT JA ARVIOINTI**

Jokaista havaintohetkeä (24:ää, 48:aa, 72:ta ja 96:ta tuntia) kohden piirretään jokaisen suositellun altistusjakson kuolleisuusprosentti pitoisuuden funktiona logaritmitodennäköisyyspaperille.

LC_{50}-arvo ja luottamusvälit ($p = 0,05$) arvioidaan havaintohetkittäin mahdollisuuksien mukaan yleisiä menetelmiä käyttäen. Arvot pyöristetään yhteen tai enintään kahteen merkitsevään numeroon (esimerkki pyöristyksestä kahteen merkitsevään numeroon: 173,5 > 170; 0,127 > 0,13; 1,21 > 1,2).

Jos pitoisuus/vaste (%) -käyrä on liian jyrkkä LC_{50}-arvon laskemiseksi, arvon graafinen arvio on riittävän tarkka.

Jos kaksi peräkkäistä pitoisuutta (käyttäen kerrointa 2,2) antavat tulokseksi vain 0 %:n ja 100 %:n kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät osoittamaan alueen, johon LC_{50} osuu.

Jos todetaan, että testattavan aineen stabiiliutta tai homogeenisuutta ei voida ylläpitää, tämä on raportoitava ja otettava huomioon tulosten tulkinnassa.

3. **RAPORTOINTI**

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— kalan tiedot kunkin pitoisuuden osalta (tieteellinen nimi, kanta, toimittaja, mahdolliset esikäsittelyt, koko ja määrä),

— laimennusveden lähde ja tärkeimmät kemialliset ominaisuudet (pH, kovuus, lämpötila),

— kantaliuoksen ja testiliuoksen valmistustapa, jos aine on huonosti veteen liukenevaa,

— mahdollisten apuaineiden pitoisuudet,

— luettelo käytetyistä pitoisuuksista ja käytettävissä olevat tiedot testattavan kemikaalin näiden pitoisuuksien stabiiliudesta käytetyssä testiliuoksessa,

— käytetyt menetelmät ja saadut tulokset, jos on tehty kemiallisia analyysejä,

— mahdollisen rajatestin tulokset,

— käytetyn menetelmän valintaperusteet ja yksityiskohtaiset tiedot (staattinen, puolistaattinen, annostelunopeus, läpivirtausnopeus, onko käytetty ilmastusta, kalakuormitus jne.),

▼B

— laitteen kuvaus,

— valo-olosuhteet,

— testiliuokscn liuenneen hapen pitoisuus, pH-arvo ja lämpötila 24 tunnin väliajoin,

— todisteet laatukriteereiden täyttämisestä,

— taulukko, josta ilmenee kumulatiivinen kuolleisuus kussakin pitoisuudessa ja kontrolliryhmän (sekä tarvittaessa apuaineen kontrolliryhmän) tulokset kunakin suositeltuna tarkkailuajankohtana,

— pitoisuus/vaste (%) -käyrä kokeen päätyttyä,

— mahdollisuuksien mukaan LC_{50}-arvot kunakin suositeltuna tarkkailuajankohtana (95 prosentin luottamusrajoin),

— LC_{50}-arvon määrityksessä käytetyt tilastolliset menetelmät,

— mahdollisen vertailuainetta avulla saadut tulokset,

— suurin testiliuoksen pitoisuus, joka ei ole aiheuttanut kuolleisuutta kokeen aikana,

— pienin testiliuoksen pitoisuus, joka on aiheuttanut 100 prosentin kuolleisuuden kokeen aikana.

4. **VIITTEET**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,*11* and /3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L(15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCK, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. and Exp. Therap., 1949, vol 96, 99.

(16) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K, 1978.

(17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

(18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3–32.

(19) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hasard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65–84.

(20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC_{50}. US EPA.

▼B

Lisäys 1

Sekoitevesi

Esimerkki sopivasta laimennusvedestä

Kaikkien kemikaalien on oltava analyyttistä laatua.

Veden on oltava hyvänlaatuista tislattua tai ionisoimatonta vettä, jonka johtavuus on alle 5 $\mu S/cm^{-1}$.

Veden tislauslaite ei saa sisältää kuparista valmistettuja osia.

Kantaliuokset

$CaCl_2$ x 2 H_2O (kalsiumkloridihydraatti): 11,76 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen

$MgSO_4$ x 7 H_2O (magnesiumsulfaattiheptahydraatti): 4,93 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen

$NaHCO_3$ (natriumvetykarbonaatti): 2,59 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen

KO (kaliumkloridi): 0,23 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen

Sekoitettu laimennusvesi

25 ml kutakin kantaseosta sekoitetaan ja liuos laimennetaan litran tilavuuteen.

Liuosta ilmastetaan, kunnes liuenneen hapen pitoisuus saavuttaa ilmakyllästymisarvon.

pH-arvon on oltava 7,8 ± 0,2.

pH:ta säädetään tarvittaessa NaOH:lla (natriumhydroksidilla) tai HCl:llä (suolahapolla).

Näin valmistettu sekoitevesi pannaan syrjään noin 12 tunniksi, eikä sitä tarvitse enää ilmastaa.

Liuoksen Ca- ja Mg-ionien yhteenlaskettu pitoisuus on 2,5 millimoolia/1. Ca- ja Mg-ionien suhde on 4:1 ja Na- ja K-ionien suhde 10:1. Liuoksen kokonaisalkalisuus on 0,8 millimoolia/1.

Mahdolliset poikkeavuudet laimennusveden valmistuksessa eivät saa vaikuttaa veden koostumukseen tai sen ominaisuuksiin.

▼B

Liite 2

Suositeltavat kalalajit

Suositeltava laji	Suositeltava testilämpötila-alue (°C)	Koe-eläimen suositeltava kokonaispituus (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) seeprakala	20–24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20–24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) karppi	20–24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck et Schlegel 1850) Red killifish	20–24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) miljoonakala	20–24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus(Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Bluegill	20–24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) kirjolohi	12–17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) säyne	20–24	6,0 ± 2,0

Saatavuus

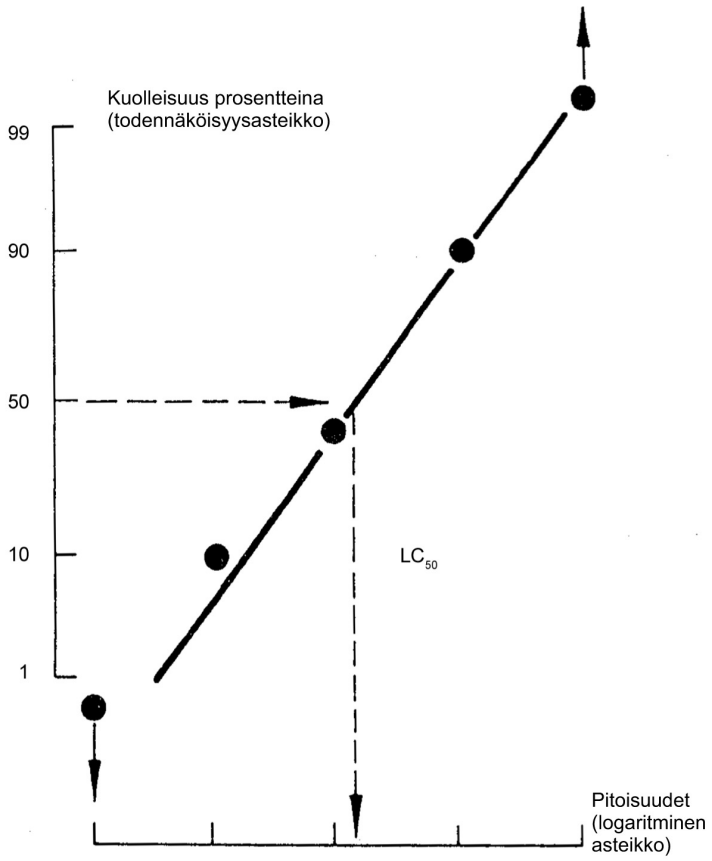
Edellä luetellut kalalajit ovat helposti viljeltävissä tai yleisesti saatavissa läpi koko vuoden. Niitä voidaan viljellä kalanviljelylaitoksissa tai laboratorioissa, edellyttäen, että sairauden ja loisten esiintymistä valvotaan. Näin saadaan terveitä koe-eläimiä, joiden tausta on tiedossa. Näitä kalalajeja on saatavana suuressa osassa maailmaa.

▼B

Liite 3

Pitoisuusesimerkki: prosentuaalinen kuolleisuus

Esimerkki LC_{50}-määrityksestä logaritmitodennäköisyyspaperin avulla



▼B

C.2. *DAPHNIA* SP. AKUUTIN IMMOBILISAATION TESTI

1. MENETELMÄ

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta TG 2002 (2004).

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä testataan akuuttia myrkyllisyyttä arvioimalla kemikaalien vaikutuksia vesikirppuihin *(Daphnia)*. Jo olemassa olevia testimenetelmiä käytetään hyväksi mahdollisuuksien mukaan (1) (2) (3).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

EC_{50}: pitoisuus, jossa 50 % vesikirpuista arvioidaan immobilisoituvan määrätyn altistusajan kuluessa. Jos käytetään muuta määritelmää, se on ilmoitettava viittauksineen.

Immobilisaatio: Eläimet, jotka eivät kykene uimaan 15 sekunnin kuluessa sen jälkeen, kun testiastiaa on heilutettu varovasti, katsotaan immobilisoituneiksi (vaikka ne voisivat edelleen liikuttaa tuntosarviaan).

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Nuoria vesikirppuja (testin alussa alle 24 tunnin ikäisiä) altistetaan testiaineelle sopivaksi arvioidulla pitoisuusalueella 48 tunnin ajan. Immobilisaatio kirjataan 24 ja 48 tunnin kuluttua ja sitä verrataan kontrolliarvoihin. Tulokset analysoidaan EC_{50}:n laskemiseksi 48 tunnin kohdalla (katso määritelmät kohdassa 1.2). EC_{50}:n määrittely 24 tunnin kohdalla on vapaaehtoista.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Testiaineen vesiliukoisuus ja höyrynpaine on oltava tiedossa, ja aineen kvantifioimiseksi testiliuoksissa on oltava käytettävissä luotettava analyysimenetelmä, jonka saantoteho on raportoitu, ja määritysraja pitäisi olla saatavissa. Tarpeellisia tietoja ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilisuus vedessä tai valossa, P_{ow} ja helpon biohajoavuuden testin (ks. testimenetelmä C.4) tulokset.

Huom.: Ohjeita sellaista tapausta varten, kun fysikokemialliset ominaisuudet tekevät testiaineista vaikeasti testattavia: kirjallisuusviite (4).

1.5 VERTAILUAINEET

Testiolosuhteiden luotettavuuden varmistamiseksi EC_{50} voidaan testata vertailuaineella. Tätä tarkoitusta varten suositellaan kansainvälisissä yhteistutkimuksissa (ring test) käytettyjä myrkyllisiä kemikaaleja (1) (5) ([1]). Suosituksena on, että vertailuaineella tehtävä koe tai kokeet suoritetaan joka kuukausi ja ainakin kahdesti vuodessa.

([1]) Näiden monilaboratoriotestien tulosten sekä oikaistun ISO 634 -standardin mukaan kaliumdikromaatin (K_2Cr_2O7) EC50 (24 h) sijoittuu välille 0,6 mg/l–1,7 mg/l.

▼B

1.6 LAATUVAATIMUKSET

Jotta testi olisi validi, seuraavien vaatimusten on täytyttävä:

— Kontrolleissa (mukaan lukien liuotusapuaineen sisältävä kontrolli) enintään 10 % vesikirpuista saa immobilisoitua.

— Liuenneen hapen pitoisuuden testin lopussa on oltava ≥ 3 mg/l kontrolli- ja koeastioissa.

Huom.: Ensimmäinen vaatimus merkitsee, että enintään 10 prosenttia kontrollivesikirpuista saa immobilisoitua tai osoittaa muita sairauden tai stressin merkkejä, esimerkiksi värimuutoksia tai epätavallista käyttäytymistä (esim. jääminen pysyvästi vedenpinnalle).

1.7 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 **Laitteet**

Astioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Testiastiat ovat tavallisesti lasisia koeputkia tai dekanterilaseja. Ne on puhdistettava ennen jokaista käyttöä laboratorion normaaleilla menettelyillä. Koeastiat on peitettävä väljästi, jotta vältettäisiin veden menetys haihtumisen kautta ja pölyn pääsy liuoksiin. Haihtuvat aineet pitäisi testata täysin suljetuissa astioissa, jotka ovat tarpeeksi suuria, ettei happipitoisuus muodostu rajoittavaksi tekijäksi tai alene liiaksi (ks. kohta 1.6 ja kohdan 1.8.3 ensimmäinen alakohta).

Lisäksi tarvitaan joitakin tai kaikkia seuraavista laitteista: happimittari (joka on varustettu mikroelektrodilla tai muulla sopivalla laitteella, jolla voidaan mitata liuennut happi pienitilavuuksisissa näytteissä); pH-mittari; asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön; laitteet orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuuden (TOC) mittaamiseen; laitteet kemiallisen hapenkulutuksen (COD) mittaamiseen; laitteet veden kovuuden mittaamiseen jne.

1.7.2 **Testiorganismi**

Testissä suositellaan käytettäväksi *Daphnia magna* Straus -organismia. Muita sopivia vesikirppulajeja (e.g. *Daphnia pulex)* saa myös käyttää. Testin alussa eläinten on oltava alle 24 tunnin ikäisiä, ja ominaisuuksien vaihtelun vähentämiseksi suositellaan painokkaasti, että ne eivät ole ensimmäistä sikiösarjaa. Niiden olisi oltava peräisin terveestä varastokannasta (ts. niissä ei saa näkyä merkkejä stressistä, kuten korkeaa kuolleisuutta, koiraita ja lepomunia, viivästymistä ensimmäisten sikiöiden tuottamisessa, värihäiriöisiä eläimiä jne.). Kaikkien tietyssä testissä käytettävien organismien on oltava peräisin saman vesikirppukannan viljelystä. Varastokannan eläimiä on pidettävä samanlaisissa viljelyoloissa (valo, lämpötila, viljelyneste) kuin testissä käytettäviä. Jos testissä käytettävä viljelyneste eroaa vesikirpun viljelyssä normaalisti käytetystä viljelynesteestä, on hyvä noudattaa käytäntöä, että eläimet totutetaan viljelyoloihin ennen testiä. Viljelystä saatuja vesikirppuja on tätä varten pidettävä laimennusvedessä testilämpötilassa vähintään 48 tunnin ajan ennen testin alkua.

▼B

1.7.3 **Viljely- ja laimennusvesi**

Luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi tai talousvesi, josta on poistettu kloori, ovat hyväksyttäviä viljely- ja laimennusvesiä, jos vesikirput voivat elää siinä viljelyn, totuttamisen ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Mikä tahansa vesi, joka täyttää liitteessä 1 mainitut hyväksyttävän liuoksen kemialliset ominaisuudet, soveltuu käytettäväksi testissä. Veden laadun on oltava tasainen testin ajan. Synteettinen vesi voidaan valmistaa lisäämällä tietyt määrät reagensseja (tunnustettu analyyttinen laatu) deionisoituun tai tislattuun veteen. Kirjallisuusviitteissä (1) ja (6) ja liitteessä 2 annetaan esimerkkejä synteettisestä vedestä. On huomattava, että tunnettuja kelatoivia aineita sisältäviä viljelynesteitä, kuten M4- ja M7-viljelynesteitä (ks. liite 2), ei suositella metalleja sisältävien aineiden testaukseen. pH-arvon pitäisi olla 6–9. *Daphnia Magna* -organismia varten suositellaan kovuutta 140–250 mg/l ($CaCO_3$), mutta muita *Daphnia*-organismeja varten käy myös vähäisempi kovuus. Laimennusvettä voidaan ilmastaa ennen testin alkua, jotta liuenneen hapen pitoisuus saavuttaa kyllästymispisteen.

Jos käytetään luonnonvettä, laatuparametrit on tarkistettava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi (ks. edellinen kohta ja liite 1). Lisäksi on määritettävä raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni). Käytettäessä vettä, josta on poistettu kloori, suositellaan päivittäistä kloorianalyysiä. Jos laimennusvesi on pinta- tai pohjavesilähteestä, johtokyky, orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) tai kemiallinen hapenkulutus (COD) on mitattava.

1.7.4 **Testiliuokset**

Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla varastoliuosta. Varastoliuokset olisi mieluiten tehtävä liuottamalla testiaine laimennusveteen. Liuottimien, emulgointiaineiden tai dispergointiaineiden käyttöä olisi mahdollisuuksien mukaan vältettävä. Niitä voidaan kuitenkin tarvita joissakin tapauksissa sopivan väkevyisen varastoliuoksen valmistamiseksi. Kirjallisuusviitteessä (4) on tietoa sopivien liuottimien, emulgointiaineiden tai dispergointiaineiden käytöstä. Testiaineen pitoisuus testiliuoksissa ei saa missään tapauksessa ylittää aineen liukoisuusrajaa laimennusvedessä.

Testi on suoritettava säätämättä pH:ta. Jos pH ei pysy välillä 6–9, voidaan suorittaa toinen testi, jossa varastoliuoksen pH säädetään vastaamaan laimennusveden pH:ta ennen testiaineen lisäämistä. pH:ta säädettäessä on huolehdittava siitä, että varastoliuoksen pitoisuus ei muutu merkittävässä määrin ja ettei aiheuteta kemiallisia reaktioita eikä saostumista testiaineessa. Suositeltavia aineita ovat HCl ja NaOH.

▼B

1.8 MENETTELY

1.8.1 **Altistusolosuhteet**

1.8.1.1 *Testi- ja kontrolliryhmät*

Koeastiat täytetään sopivaan tilavuuteen laimennusvedellä ja testiaineen sisältävillä liuoksilla. Ilman ja veden tilavuuden keskinäisen suhteen astiassa pitäisi olla sama sekä testi- että kontrolliryhmässä. Vesikirput pannaan astioihin. Kutakin testipitoisuutta ja kontrolliryhmää varten olisi käytettävä vähintään 20 eläintä, mielellään jaettuina neljään viiden eläimen ryhmään. Kutakin eläintä varten olisi varattava vähintään 2 ml testiliuosta (ts. 10 ml testiliuosta viittä vesikirppua ja yhtä koeastiaa kohti). Testi suoritetaan siten, että liuos vaihtuu semistaattisissa oloissa tai läpivirtausolosuhteissa, jos testiaineen pitoisuus ei ole stabiili.

Testisarjan lisäksi on suoritettava yksi laimennusvesikontrollisarja ja tarvittaessa myös yksi liuotusapuaineen sisältävä kontrollisarja.

1.8.1.2 *Testipitoisuudet*

Varsinaisen testin pitoisuusalueiden määrittämiseksi voidaan tehdä pitoisuusalueen määrittelykoe, jollei testiaineen myrkyllisyydestä ole saatavilla tietoa. Tätä varten vesikirput altistetaan useille testiaineen pitoisuuksille laajoin pitoisuusvälein. Viisi vesikirppua on altistettava kullekin pitoisuudella enintään 48 tunnin ajaksi. Rinnakkaiskokeita ei tarvita. Altistusaika voidaan lyhentää (esim. 24 tuntiin tai tämän alle), jos pitoisuusalueen määrittelyyn sopivat tiedot saadaan lyhyemmässä ajassa.

Kokeessa pitäisi olla vähintään viisi testipitoisuutta geometrisessa sarjassa, eikä kerroin saisi olla suurempi kuin 2,2. Jos käytetään vähempää määrää pitoisuuksia, tämä on perusteltava. Suosituksena on, että suurin testattava pitoisuus johtaa 100 prosentin immobilisaatioon ja että pienin testattava pitoisuus ei aiheuta havaittavaa vaikutusta.

1.8.1.3 *Inkubaatio-olosuhteet*

Lämpötilan pitäisi olla välillä 18–22 °C ja pysyä kussakin yksittäisessä testissä vakiona (± 1 °C). Testissä suositellaan käytettäväksi sykliä, jossa on 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeyttä. Myös jatkuva pimeys hyväksytään, erityisesti jos testiaine on epästabiili valossa.

Koeastioita ei saa ilmastaa testin aikana. Testi suoritetaan säätämättä pH:ta. Vesikirppuja ei saa ruokkia testin aikana.

1.8.1.4 *Kesto*

Testin kesto on 48 tuntia.

1.8.2 **Huomautukset**

Kunkin koeastian osalta on tarkistettava 24 ja 48 tunnin kuluttua testin alusta, onko siinä immobilisoituneita vesikirppuja (ks. määritelmät kohdassa 1.2). Immobilisaation lisäksi on kirjattava mahdollinen epänormaali käyttäytyminen tai ulkonäkö.

▼B

1.8.3 **Mittaukset**

Liuennut happi ja pH määritetään testin alussa ja lopussa kontrollissa (tai kontrolleissa) ja testiaineen suurimmassa pitoisuudessa. Kontrolleissa todetun liuenneen hapen pitoisuuden olisi oltava laatuvaatimuksen mukainen (ks. kohta 1.6). pH-arvo ei tavallisesti saisi vaihdella enemmän kuin 1,5 yksikköä yksittäisessä testissä. Lämpötila mitataan yleensä kontrolliastioista tai ilmasta, ja sitä on rekisteröitävä mielellään jatkuvaluonteisesti testin aikana tai vähintään testin alussa ja lopussa.

Vähintään suurin ja pienin testiaineen pitoisuus olisi mitattava testin alussa ja lopussa (4). Tulokset on suositeltavaa määritellä mitattujen pitoisuuksien perusteella. Jos on näyttöä siitä, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävällä tavalla ± 20 prosentissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulokset voivat perustua nimellispitoisuuksiin tai alkupitoisuuksiin.

1.9 RAJA-ANNOSTESTI

Tässä testimenetelmässä kuvattuja menettelyjä käyttäen voidaan suorittaa raja-annostesti, jossa testiaineen pitoisuus on 100 mg/l tai sama kuin aineen liukoisuusraja-arvo testissä käytettävässä viljelynesteessä (sen mukaan, kumpi on alempi), sen osoittamiseksi, että EC_{50} on suurempi kuin kyseinen pitoisuus. Raja-annostesti on suoritettava 20 vesikirpulla (jotka suositellaan jaettaviksi neljään viiden eläimen ryhmään). Kontrollissa (tai kontrolleissa) niitä on oltava sama määrä. Jos immobilisaatiota havaitaan, on tehtävä täydellinen testi. Mahdollinen epänormaali käyttäytyminen on kirjattava.

2. **TULOKSET**

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa siten, että sekä testi- että kontrolliryhmistä ilmoitetaan käytetty vesikirppujen määrä ja immobilisaatio kunakin havaintoajankohtana. Prosentuaalinen immobilisaatio 24 ja 48 tunnin kohdalla on esitettävä graafisesti testipitoisuuksien funktiona. Tulokset analysoidaan sopivilla tilastomenetelmillä (esim. probittianalyysi), ja kuvaajien kulmakertoimet ja EC_{50} lasketaan 95 prosentin luottamusvälillä ($p = 0,05$) (7) (8).

Jos EC_{50}:n tavanomaiset laskentamenetelmät eivät sovellu saatuun aineistoon, sitä suurinta pitoisuutta, joka ei aiheuta immobilisaatiota, ja sitä pienintä pitoisuutta, joka aiheuttaa 100 prosentin immobilisaation, on käytettävä likiarvon laskemiseen siten, että EC_{50} katsotaan kyseisten kahden pitoisuuden geometriseksi keskiarvoksi.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä,

▼B

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien puhtaus.

Koelajit:

— *Daphnian* laji ja hankintapaikka tai alkuperä (jos se tunnetaan) sekä käytetyt viljelyolosuhteet (mm. ravinnon lähde, tyyppi ja määrä, ruokintatiheys).

Koeolosuhteet:

— koeastioiden kuvaus: astioiden tyyppi, liuoksen tilavuus, vesikirppujen määrä koeastiaa kohti, koeastioiden (rinnakkaiskokeet) määrä pitoisuutta kohti,

— varasto- ja testiliuosten valmistusmenetelmät (mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen nimi ja pitoisuus on ilmoitettava),

— laimennusvedet: lähde ja veden laatu (pH, kovuus, Ca/Mg-suhde, Na/K-suhde, emäksisyys, johtokyky jne.); synteettisen veden koostumus (jos käytetty),

— inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valon voimakkuus ja jaksoittaisuus, liuennut happi, pH jne.

Tulokset:

— niiden vesikirppujen määrä ja prosentuaalinen osuus, joka immobilisoituivat tai osoittivat haitallisia vaikutuksia (mm. epänormaali käyttäytyminen) kontrolleissa ja kussakin testiryhmässä kunakin havaintoajankohtana, sekä havaittujen vaikutusten luonne,

— vertailuaineella tehdyn testin tulokset ja päivämäärä (jos käytettävissä),

— nimelliset testipitoisuudet sekä tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritetään testiaineen pitoisuus koeastioissa; lisäksi on ilmoitettava menetelmän saantoteho sekä määritysraja,

— kaikki testin aikana tehdyt fysikokemialliset lämpötilan, pH:n ja liuenneet hapen pitoisuuden mittaustulokset,

— EC_{50} immobilisaatiolle 48 tunnin kohdalla, luottamusvälit, EC_{50}:n laskemiseen käytetyn sovitetun mallin graafiset kuvaajat, annos-vastekäyrien kulmakertoimet ja niiden keskivirhe; EC_{50}:n määrittämiseen käytettyjen tilastomenetelmien kuvaus (jos nämä tulokset määritettiin myös 24 tunnin kohdalla, myös ne on ilmoitettava),

— selitykset mahdolliseen testimenetelmästä poikkeamiseen ja vaikuttiko poikkeaminen tuloksiin.

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

1. ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp. 65–84.

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

LIITE 1

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Pitoisuus
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ammoniakki (ionisoitumaton)	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä ja polyklooratut bifenyylit	< 50 ng/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼B

Liite 2

ESIMERKKEJÄ SOPIVASTA SYNTEETTISESTÄ TESTIVEDESTÄ

ISO-testivesi (1)

Varastoliuokset (yksi aine)		Synteettinen vesi valmistetaan lisäämällä seuraavat määrät varastoliuosta 1 litraan vettä (*)
Aine	1 vesilitraan lisätty määrä (*)	
Kalsiumkloridi $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnesiumsulfaatti $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natriumbikarbonaatti $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kaliumkloridi KCl	0,23 g	25 ml

(*) Veden on oltava sopivan puhdasta, esimerkiksi deionisoitua, tislattua tai käänteisosmoosilla puhdistettua, ja johtavuus ei saisi olla yli 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendt M7- ja M4-viljelynesteet

Totuttaminen Elendt M7- ja M4-viljelynesteeseen

Joissakin laboratorioissa on ollut vaikeuksia, kun ne ovat siirtäneet vesikirput suoraan M4- tai M7-viljelynesteeseen. Siirto onnistuu paremmin totuttamalla vesikirput asteittain uuteen viljelynesteeseen: ensin siirretään entisestä viljelynesteestä 30-prosenttiseen, sitten 60-prosenttiseen ja lopulta 100-prosenttiseen Elendt-viljelynesteeseen. Totuttamisvaiheen pitää mahdollisesti olla jopa kuukauden pituinen.

Valmistelu

Hivenaineet

Ensin valmistetaan erilliset varastoliuokset (I) yksittäisistä mineraaleista sopivan puhtaaseen (esim. deionisoituun, tislattuun tai käänteisosmoosilla puhdistettuun) veteen. Näistä eri varastoliuoksista (I) valmistetaan yksi ainoa varastoliuos (II), jossa on kaikkia hivenaineita (yhdistetty liuos), ts.:

Varastoliuokset I (yksi aine)	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) kertainen	Valmistettaessa yhdistettyä varastoliuosta II lisätään veteen seuraavat määrät varastoliuosta I (ml/l)	
			M4	M7
$H_3\ BO_3$	57 190	20 000	1,0	0,25
$MnCl_2\ .\ 4H_2O$	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25

▼B

Varastoliuokset I (yksi aine)	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) kertainen	Valmistettaessa yhdistettyä varastoliuosta II lisätään veteen seuraavat määrät varastoliuosta I (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2 . 6H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2 MoO_4 . 2H_2O$	1 230	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2 . 2H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2 . 6H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
$Na_2 SeO_3$	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2 EDTA . $2H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4 . 7H_2O$	1 991	2 000	—	—

Sekä Na_2 EDTA- että $FeSO_4$-liuokset valmistetaan erikseen, yhdistetään ja autoklavoidaan välittömästi.

Tuloksena on:

21Fe-EDTA-liuos		1 000	20,0	5,0

M4- ja M7-viljelyneste

M4- ja M7-viljelynesteet valmistetaan käyttäen varastoliuosta II, makroravinteita ja vitamiineja seuraavasti:

	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) -kertainen	Viljelynesteen valmistamiseen tarvittava varastoliuoksen määrä (ml/l)	
			M4	M7
Varastoliuos II (yhdistetyt hivenaineet)		20	50	50
Makroravinteiden varastoliuos (yksittäisiä aineita)				
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
$Na_2 SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1

▼B

	Veteen lisätty määrä (mg/l)	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) -kertainen	Viljelynesteen valmistamiseen tarvittava varastoliuoksen määrä (ml/l)	
			M4	M7
Yhdistetty vitamiinien varastoliuos	—	10 000	0,1	0,1
Yhdistetty vitamiinien varastoliuos valmistetaan lisäämällä kaikkia kolmea vitamiinia 1 litraan vettä seuraavasti:				
Tiamiini-hydrokloridi	750	10 000		
Syaani-kobalamiini (B_{12})	10	10 000		
Biotiini	7,5	10 000		

Yhdistetty vitamiinien varastoliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä. Vitamiinit lisätään viljelynesteeseen vähän ennen käyttöä.

Huom.: Jotta suolat eivät saostuisi lopullista viljelynesteliuosta valmistettaessa, varastoliuokset lisätään 500–800 ml:aan deionisoitua vettä ja täytetään sitten 1 litraksi.

Huom.: M4-viljelynesteen kokoonpanoa koskeva ensimmäinen julkaisuviite on Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M6

C.3. MAKEAN VEDEN LEVIEN JA SYANOBAKTEERIEN KASVUNESTYMISTESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 201 (2006, liite oikaistu vuonna 2011). On todettu tarpeelliseksi laajentaa testimenetelmää, jotta siihen voidaan lisätä uusia lajeja ja jotta menetelmää voidaan päivittää siten, että vaaranarviointia ja kemikaalien luokitusta koskevat vaatimukset täyttyvät. Menetelmän tarkistus perustuu laajaan käytännön kokemukseen, tieteen kehitykseen leviin kohdistuvien myrkyllisyystutkimusten alalla sekä testimenetelmän aiemman version laajaan käyttöön sääntelyssä.

2. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

3. Testin tavoitteena on määrittää testattavan kemikaalin vaikutukset makean veden viherlevien ja/tai syanobakteereiden kasvuun. Eksponentiaalisesti kasvavat koe-eliöt altistetaan testikemikaalille panosviljelmissä yleensä 72 tunnin ajan. Vaikka testi on suhteellisen lyhyt, sillä voidaan arvioida useaan sukupolveen kohdistuvia vaikutuksia.

4. Järjestelmän vasteena on kasvun väheneminen sarjassa leväviljelmiä (testiyksiköitä), jotka on altistettu testikemikaalin eri pitoisuuksille. Vastetta arvioidaan altistuspitoisuuden funktiona vertaamalla sitä rinnakkaisten, altistumattomien kontrolliviljelmien keskimääräiseen kasvuun. Jotta järjestelmän vaste myrkkyvaikutuksiin ilmenisi kokonaan (optimaalinen herkkyys), viljelmien kasvua ei rajoiteta vaan niiden annetaan kasvaa eksponentiaalisesti olosuhteissa, joissa on riittävästi ravinteita ja valonsaanti on jatkuvaa, kunnes spesifisen kasvunopeuden pieneneminen on mitattavissa.

5. Kasvua ja kasvun estymistä kvantifioidaan mittaamalla leväbiomassa ajan funktiona. Leväbiomassa määritetään kuivapainona tilavuutta kohden, esimerkiksi milligrammoina levää yhtä litraa testiliuosta kohden. Kuivapainoa on kuitenkin vaikea mitata, minkä vuoksi käytetään korvaavia parametreja. Useimmin käytettyjä ovat solumäärät. Muita korvaavia parametreja ovat muun muassa solutilavuus, fluoresenssi ja optinen tiheys. Mitatun korvaavan parametrin ja biomassan välinen muuntokerroin on tunnettava.

6. Testin loppupisteenä on kasvun estyminen, joka ilmenee biomassan logaritmisesta kasvusta (keskimääräisestä spesifisestä kasvunopeudesta) altistusaikana. Testiliuossarjassa mitattujen keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien avulla määritetään pitoisuus, jossa kasvunopeus vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_rC_x-arvona (esimerkiksi E_rC_{50}).

7. Toinen testimenetelmässä käytetty vastemuuttuja on tuotos, jota voidaan tarvita joissakin maissa erityisten sääntelyvaatimusten täyttämiseksi. Tuotoksella tarkoitetaan altistusajan lopussa mitatun biomassan ja altistusajan alussa mitatun biomassan erotusta. Testiliuossarjassa mitatun tuotoksen avulla määritetään pitoisuus, jossa tuotos vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_yC_x-arvona (esimerkiksi E_yC_{50}).

8. Tilastollisesti voidaan määrittää myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

▼**M6**

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

9. Testikemikaalia koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, puhtaus, stabiilius valossa, stabiilius testiolosuhteissa, valonabsorbointiominaisuudet, pKa ja muuntumistutkimusten tulokset, mukaan luettuna biohajoavuus vedessä.

10. Testikemikaalin vesiliukoisuus, oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin (P_{ow}) ja höyrynpaine on tunnettava, ja testiliuoksissa olevan testikemikaalin kvantifioimiseen tarvitaan validoitu menetelmä, jonka saantoteho ja havaitsemisraja tunnetaan.

TESTIN VALIDITEETTI

11. Jotta testi olisi validi, sen on täytettävä seuraavat vaatimukset:

— Biomassan on täytynyt kasvaa kontrolliviljelmissä eksponentiaalisesti vähintään 16-kertaiseksi 72 tunnin testijakson aikana. Tämä vastaa spesifistä kasvunopeutta 0,92 päivää kohden. Useimmin käytetyillä lajeilla kasvunopeus on yleensä huomattavasti suurempi (ks. lisäys 2). Tämä vaatimus ei välttämättä täyty käytettäessä lajeja, jotka kasvavat hitaammin kuin lisäyksessä 2 luetellut lajit. Siinä tapauksessa testijaksoa on pidennettävä, jotta kontrolliviljelmissä saavutettaisiin vähintään 16-kertainen kasvu, ja kasvun on oltava eksponentiaalista koko testijakson ajan. Testijaksoa voidaan lyhentää 48 tuntiin saakka rajoittamattoman eksponentiaalisen kasvun ylläpitämiseksi koko testin ajan, jos kasvukerroin on vähintään 16.

— Kontrolliviljelmien jaksoittaisten spesifisten kasvunopeuksien (72 tunnin testeissä päivät 0–1, 1–2 ja 2–3) keskimääräinen variaatiokerroin (ks. lisäys 1 kohdassa ”Variaatiokerroin”) saa olla enintään 35 prosenttia. Jaksoittaisen spesifisen kasvunopeuden laskemista käsitellään 49 kohdassa. Tämä vaatimus koskee rinnakkaisia kontrolliviljelmiä varten laskettujen variaatiokertoimien keskiarvoa.

— Rinnakkaisten kontrolliviljelmien keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien variaatiokerroin saa olla koko testijakson aikana enintään 7 prosenttia, jos testeissä käytetään lajeja *Pseudokirchneriella subcapitata* ja *Desmodesmus subspicatus*. Käytettäessä muita, harvemmin testattuja lajeja tämä arvo saa olla enintään 10 prosenttia.

VERTAILUKEMIKAALI

12. Testimenetelmä voidaan tarkistaa testaamalla vertailukemikaali (-kemikaalit), kuten 3,5-dikloorifenoli, jota on käytetty kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (1). Viherleviä viljeltäessä vertailukemikaalina voidaan käyttää myös kaliumdikromaattia. Vertailukemikaali olisi hyvä testata vähintään kahdesti vuodessa.

TESTIN SOVELTUVUUS

13. Tätä testimenetelmää voidaan parhaiten soveltaa vesiliukoisiin kemikaaleihin, jotka todennäköisesti pysyvät veteen liuenneina testiolosuhteissa. Testattaessa kemikaaleja, jotka ovat haihtuvia, voimakkaasti adsorboivia, värillisiä tai huonosti veteen liukenevia, tai kemikaaleja, jotka voivat vaikuttaa

▼M6

testiviljelyaineessa olevien ravinteiden tai kivennäisaineiden saantiin, voi olla tarpeen tehdä tiettyjä mukautuksia tässä kuvattuun menetelmään (esimerkiksi suljettu järjestelmä ja koeastioiden erityisvalmistelu). Kirjallisuusviitteissä (2), (3) ja (4) annetaan ohjeita joistakin sopivista mukautuksista.

TESTIMENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

14. Astioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Ne on pestävä huolellisesti, jotta mitkään orgaaniset tai epäorgaaniset epäpuhtaudet eivät vaikuttaisi leväkasvuun tai testiliuosten koostumukseen.

15. Koeastiat ovat yleensä lasipulloja, jotka ovat niin suuria, että viljelmän tilavuus riittää testin aikaisiin mittauksiin ja CO_2:n siirtyminen ilmakehästä on riittävää (ks. 30 kohta). Nestetilavuuden täytyy olla riittävän suuri analyyttisiä määrityksiä varten (ks. 37 kohta).

16. Lisäksi saatetaan tarvita joitakin tai kaikkia seuraavista laitteista:

— Viljelylaite: Suosituksena on käyttää kaappia tai kammiota, jossa valittua inkubointilämpötilaa voidaan pitää yllä ± 2 °C:n tarkkuudella.

— Valonmittauslaitteet: On tärkeää muistaa, että valon voimakkuuden mittausmenetelmä ja erityisesti mittausanturin (keräimen) tyyppi saattavat vaikuttaa mitattuun arvoon. Mittauksissa olisi mieluimmin käytettävä pyöreää (4 π) mittausanturia (joka reagoi suoraan valoon ja heijastuneeseen valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) tai 2 π:n mittausanturia (joka reagoi valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta).

— Leväbiomassan määrityslaite: Solumäärä, joka on yleisin leväbiomassan sijasta käytetty parametri, voidaan laskea käyttämällä elektronista hiukkaslaskinta, laskukammiolla varustettua mikroskooppia tai virtaussytometria. Muita biomassan sijasta käytettyjä parametreja voidaan mitata virtaussytometrilla, fluorimetrilla, spektrofotometrilla tai kolorimetrilla. On hyödyllistä laskea solumäärän ja kuivapainon välinen muuntokerroin. Jotta mittaukset onnistuisivat spektrofotometrilla pienissä biomassapitoisuuksissa, voi olla tarpeen käyttää kyvettejä, joissa valotien pituus on vähintään 4 cm.

Testiorganismit

17. Testissä voidaan käyttää monia kiinnittymättömiä mikrolevä- ja syanobakteerilajeja. Lisäyksessä 2 lueteltujen kantojen on todettu soveltuvan tähän testimenetelmään.

18. Jos testissä käytetään muita lajeja, niiden kanta ja/tai alkuperä on ilmoitettava. Varmista, että testiin valitun levän eksponentiaalista kasvua voidaan pitää yllä testiolosuhteissa koko testijakson ajan.

Viljelyaine

19. Testiä varten suositetaan kahta vaihtoehtoista viljelyainetta: OECD- ja AAP-viljelyainetta. Niiden koostumus esitetään lisäyksessä 3. On syytä huomata, että näiden kahden viljelyaineen alkuperäinen pH-arvo ja puskurikapasiteetti (joka säätelee pH:n kasvua) ovat erilaisia, minkä vuoksi ne voivat antaa erilaisia tuloksia varsinkin, kun testataan ionisoivia kemikaaleja.

▼M6

20. Viljelyaineita voidaan joutua mukauttamaan esimerkiksi silloin, kun testataan metalleja ja kelatoivia aineita tai kun testaus suoritetaan erilaisilla pH-arvoilla. Mukautetun viljelyaineen käyttö on perusteltava ja kuvattava yksityiskohtaisesti (3), (4).

Biomassan alkupitoisuus

21. Biomassan alkupitoisuuden on oltava sama kaikissa testiviljelmissä ja niin pieni, että kasvu on eksponentiaalista koko inkubointiajan ilman, että ravinteet uhkaavat loppua. Biomassan alkupitoisuus saa olla enintään 0,5 mg/l kuivapainona ilmaistuna. Suosituksena on käyttää seuraavia solujen alkupitoisuuksia:

Pseudokirchneriella subcapitata	$5 \times 10^3 \ldots 10^4$ solua/ml
Desmodesmus subspicatus	$2 \ldots 5 \times 10^3$ solua/ml
Navicula pelliculosa	10^4 solua/ml
Anabaena flos-aquae	10^4 solua/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 \ldots 10^5$ solua/ml

Testikemikaalin pitoisuudet

22. Pitoisuusalue, jolla vaikutuksia todennäköisesti esiintyy, voidaan määrittää alueenmäärityskokeiden avulla. Varsinaista testiä varten on valittava vähintään viisi pitoisuutta, jotka muodostavat geometrisen sarjan, jonka suhdeluku on enintään 3,2. Suurempikin suhdeluku voi olla aiheellinen, jos testikemikaalilla saadaan laakea pitoisuus-vastekäyrä. Pitoisuussarjan tulisi käsittää pitoisuusalue, jolla levän kasvunopeus hidastuu 5–75 prosenttia.

Toistot ja kontrollit

23. Testiin on kuuluttava kolme toistoa kutakin pitoisuutta kohden. Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, koejärjestelyä voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden. Kontrollitoistoja on oltava vähintään kolme, ja niitä on mieluimmin tehtävä kaksi kertaa enemmän kuin kutakin testipitoisuutta kohden tehtyjä toistoja.

24. Testikemikaalin pitoisuuksien analyyttisiä määrityksiä varten voidaan valmistaa erillinen testiliuossarja (ks. 36 ja 38 kohdat).

25. Jos testikemikaali on liuotettava liuottimella, koejärjestelyyn on kuuluttava ylimääräisiä kontrolliviljelmiä, jotka sisältävät liuotinta samana pitoisuutena kuin testiviljelmät.

Inokulaattiviljelmän valmistaminen

26. Jotta testissä käytettävät levät sopeutuisivat testiolosuhteisiin ja olisivat eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, kun ne siirrostetaan testiliuoksiin, testiviljelyaineeseen valmistetaan 2–4 päivää ennen testin alkua inokulaattiviljelmä. Leväbiomassaa on säädeltävä siten, että eksponentiaalinen kasvu jatkuu inokulaattiviljelmässä testin alkuun saakka. Inkuboi inokulaattiviljelmää samoissa olosuhteissa kuin testiviljelmiä. Biomassan kasvu inokulaattiviljelmässä mitataan sen varmistamiseksi, että kasvu vastaa testissä käytettävän kannan normaalia kasvua viljelyolosuhteissa. Lisäyksessä 4 annetaan yksi

▼M6

esimerkki levänviljelymenetelmistä. Inokulaattiviljelmässä voidaan joutua käynnistämään toinen lisäysvaihe, jotta testin aikana ei tapahtuisi synkronista solunjakautumista.

Testiliuosten valmistaminen

27. Viljelyaineen pitoisuuden ja testilevän biomassan alkupitoisuuden on oltava samat kaikissa testiliuoksissa. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan yleensä sekoittamalla testikemikaalin kantaliuos viljelyaineen ja inokulaattiviljelmän kanssa. Kantaliuokset valmistetaan yleensä liuottamalla testattava kemikaali testiviljelyaineeseen.

28. Liuottimia, kuten asetonia, t-butyylialkoholia ja dimetyyliformamidia, voidaan käyttää kantoaineina, kun testiviljelyaineeseen lisätään huonosti veteen liukenevia kemikaaleja (2), (3). Liuottimen pitoisuus saa olla enintään 100 µl/l, ja kaikkiin testisarjan viljelmiin (kontrolliviljelmät mukaan luettuina) on lisättävä samanpitoista liuotinta.

Inkubointi

29. Koeastiat suljetaan ilmaa läpäisevillä tulpilla. Astioita ravistellaan ja ne asetetaan viljelylaitteeseen. Niitä on ravisteltava ja sekoitettava koko testin ajan, jotta levät pysyisivät suspendoituneina ja CO_2:n siirtyminen liuoksiin helpottuisi. Viljelmien lämpötila pidetään alueella 21–24 °C (säätötarkkuus ± 2 °C). Käytettäessä muita kuin lisäyksessä 2 lueteltuja lajeja, kuten trooppisia lajeja, lämpötila voi olla korkeampikin, kunhan validiteettivaatimukset täyttyvät. Suositeltavaa on sijoittaa pullot satunnaiseen järjestykseen ja vaihtaa niiden paikkaa inkubaattorissa päivittäin.

30. Yleensä kontrolliviljelyaineen pH-arvo saa kokeen aikana vaihdella enintään 1,5 yksikön verran. Kun on kyse metalleista ja kemikaaleista, jotka ionisoituvat osittain jotakuinkin samassa pH:ssa kuin testissä, pH-muutoksia voidaan joutua rajoittamaan tarkkojen ja toistettavien tulosten saamiseksi. Muutokset voidaan rajoittaa teknisesti alle 0,5 yksikköön varmistamalla, että CO_2:ta siirtyy riittävän nopeasti ilmasta testiliuokseen. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi lisäämällä ravistelunopeutta. Toinen mahdollisuus on vähentää CO_2:n tarvetta pienentämällä biomassan alkupitoisuutta tai lyhentämällä testin kestoa.

31. Pintaa, jolla viljelmät inkuboidaan, on valaistava tasaisella loistevalolla, esimerkiksi kylmänvalkoisella tai päivänvalon kaltaisella valolla. Levien ja syanobakteerien valontarpeet vaihtelevat eri kantojen välillä. Valon voimakkuus on valittava koe-eliön mukaan. Suositeltuja viherlevälajeja varten valitse valon voimakkuus siten, että se on testiliuosten tasolla 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, kun se mitataan sopivalla mittausanturilla fotosynteesille suotuisalla aallonpituusalueella 400–700 nm. Eräät lajit, erityisesti *Anabaena flos-aquae*, kasvavat hyvin heikommassakin valaistuksessa ja voivat vahingoittua suurilla valon voimakkuuksilla. Tällaisia lajeja varten keskimääräinen valon voimakkuus on valittava alueelta 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$. (Jos valonmittauslaitteet on kalibroitu lux-yksikköä varten, suositeltu valonvoimakkuus 60–120 $\mu E \cdot mm^{-2} s^{-1}$ vastaa suunnilleen kylmänvalkoisen valon voimakkuusaluetta 4 440–8 880 lux.) Huolehdi, että valon voimakkuus ei vaihtele yli ± 15 prosenttia inkubointialueen keskimääräisestä valon voimakkuudesta.

▼M6

Testin kesto

32. Testi kestää yleensä 72 tuntia. Se voi kestää myös lyhyemmän tai pitemmän ajan, jos kaikki 11 kohdassa esitetyt validiteettivaatimukset täyttyvät.

Mittaukset ja analyyttiset määritykset

33. Kussakin pullossa oleva leväbiomassa määritetään ainakin kerran päivässä testijakson aikana. Jos mittauksissa käytetään testiliuoksesta pipetoituja pieniä tilavuuksia, niitä ei saa korvata vastaavilla tilavuuksilla.

34. Biomassa mitataan laskemalla solut manuaalisesti mikroskoopin avulla tai käyttämällä elektronista hiukkaslaskinta (solunlaskenta ja/tai biovolyymin määritys). Muutkin tekniikat, kuten virtaussytometria, klorofyllin in vitro- tai in vivo -fluoresenssin määritys (5), (6) tai optisen tiheyden määritys, ovat sallittuja, jos voidaan osoittaa, että ne korreloivat tyydyttävästi biomassan kanssa testin biomassa-arvoilla.

35. Mittaa liuosten pH testin alussa ja lopussa.

36. Jos käytettävissä on analyysimenetelmä, jolla testikemikaali voidaan määrittää testissä käytetyllä pitoisuusalueella, testiliuokset on analysoitava, jotta voidaan tarkistaa alkupitoisuudet sekä altistuspitoisuuksien säilyminen testin aikana.

37. Jos altistuspitoisuudet todennäköisesti vaihtelevat alle 20 prosenttia nimellisarvoista testin aikana, voi olla riittävää analysoida testikemikaalin pitoisuus testin alussa ja lopussa pienessä ja suuressa testipitoisuudessa sekä pitoisuudessa, joka on lähellä oletettua EC_{50}-arvoa. Kaikkien testipitoisuuksien analysointia testin alussa ja lopussa suositellaan silloin, kun pitoisuudet eivät todennäköisesti pysy 80:n ja 120 prosentin välillä nimellispitoisuudesta. Jos testikemikaali on haihtuva, epästabiili tai voimakkaasti adsorboivia, suosituksena on ottaa analysoitaviksi lisänäytteitä 24 tunnin välein altistusajan kuluessa, jotta testikemikaalin häviö olisi helpommin määritettävissä. Tällaisia kemikaaleja varten saatetaan tarvita ylimääräisiä toistoja. Kaikissa tapauksissa testikemikaalin pitoisuudet tarvitsee määrittää vain yhdestä toistossa käytetystä astiasta (tai kaikkien toistoissa käytettyjen astioiden yhdistetystä sisällöstä) kutakin testipitoisuutta kohden.

38. Testiviljelyaineita, jotka on valmistettu erityisesti altistuspitoisuuksien analysoimiseksi testin aikana, on käsiteltävä samalla tavalla kuin testaukseen käytettyjä liuoksia, toisin sanoen niihin on siirrostettava leviä ja niitä on inkuboitava samoissa olosuhteissa. Jos liuenneen testikemikaalin pitoisuus on analysoitava, voi olla tarpeen erottaa levät viljelyaineesta. Levien erottaminen on mieluimmin tehtävä sentrifugoimalla käyttämällä pientä g-voimaa, joka riittää kuitenkin niiden erottamiseen.

39. Jos on näyttöä siitä, että testattavan kemikaalin pitoisuus on pysynyt tyydyttävästi ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin. Jos pitoisuus poikkeaa enemmän kuin ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta, tulosten analysoinnin on perustuttava pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon altistuksen aikana tai malleihin, jotka kuvaavat testikemikaalin pitoisuuden vähenemistä (3), (7).

▼M6

40. Leväkasvun estymistesti on dynaamisempi testijärjestelmä kuin useimmat muut lyhytaikaiset kokeet, joilla testataan aineiden myrkyllisyyttä vesieliöille. Sen vuoksi todellisten altistuspitoisuuksien määritys voi olla vaikeaa varsinkin, kun on kyse adsorboituvista kemikaaleista, joita testataan pienillä pitoisuuksilla. Jos kemikaali tällaisissa tapauksissa katoaa liuoksesta adsorboitumalla kasvavaan leväbiomassaan, se ei kuitenkaan merkitse sitä, että se olisi kadonnut koko testijärjestelmästä. Analysoitaessa testin tuloksia on tarkistettava, liittyykö testikemikaalin pitoisuuden väheneminen testin aikana kasvun estymisen vähenemiseen. Jos näin on, voidaan harkita sopivan mallin käyttöä kuvaamaan testikemikaalin pitoisuuden pienenemistä (7). Muussa tapauksessa voi olla aiheellista analysoida tuloksia (nimellisten tai mitattujen) alkupitoisuuksien pohjalta.

Muut havainnot

41. Mikroskoopin avulla on varmistettava, että inokulaattiviljelmä näyttää normaalilta ja terveeltä, sekä tutkittava testin lopussa levissä esiintyvät epänormaaliudet (jotka voivat johtua altistumisesta testikemikaalille).

Raja-annostesti

42. Joissakin tapauksissa, esimerkiksi silloin, kun alustava testi osoittaa, että testikemikaalilla ei ole myrkkyvaikutuksia pitoisuusarvoon 100 mg/l saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testiaineella on testiviljelyaineessa (sen mukaan, kumpi näistä on pienempi), voidaan tehdä raja-annostesti, jossa verrataan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteita (pitoisuudessa 100 mg/l tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa). On erittäin suotavaa analysoida altistuspitoisuus rajatestin tueksi. Kaikki edellä kuvatut testiolosuhteet ja validiteettivaatimukset koskevat myös raja-annostestiä, lukuun ottamatta käsiteltyjen toistojen määrää, jonka on oltava vähintään kuusi. Kontrolli- ja käsitellyn ryhmän vastemuuttujia voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja. Jos näiden kahden ryhmän varianssit eivät ole yhtä suuria, on tehtävä erisuuruisiin variansseihin mukautettu t-testi.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Kasvukäyrien piirtäminen

43. Koeastioissa oleva biomassa voidaan ilmaista mittauksissa käytetyn korvaavan parametrin (esimerkiksi solumäärän ja fluoresenssin) yksikkönä.

44. Biomassan määritetty pitoisuus testi- ja kontrolliviljelmissä esitetään kasvukäyrien piirtämistä varten taulukkona, josta ilmenevät myös testiaineen pitoisuudet ja mittausajankohdat, jotka on rekisteröity vähintään täysien tuntien tarkkuudella. Tässä ensimmäisessä vaiheessa voi olla hyödyllistä käyttää sekä logaritmiasteikkoja että lineaarisia asteikkoja, mutta logaritmisasteikot ovat pakollisia ja antavat yleensä paremman kuvan kasvun vaihteluista testijakson aikana. On syytä huomata, että kun eksponentiaalista kasvua kuvataan logaritmiasteikolla, tuloksena on suora viiva, ja viivan kaltevuus ilmaisee spesifisen kasvunopeuden.

45. Käyrien avulla tutkitaan, kasvavatko kontrolliviljelmät oletetulla nopeudella eksponentiaalisesti koko testin ajan. Tarkastele kriittisesti kaikkia datapisteitä ja käyrien muotoa ja tarkista raakatiedot ja menetelmät mahdollisten virheiden havaitsemiseksi. Erityisesti tarkistetaan ne datapisteet, jotka näyttävät poikkeavan systemaattisen virheen vuoksi. Jos havaitaan ilmeisiä menetelmävirheitä ja/tai niitä pidetään hyvin todennäköisinä, kyseinen datapiste merkitään vieraaksi havainnoksi eikä sitä oteta huomioon myöhemmässä tilastoanalyysissä. (Jos leväpitoisuus on nolla yhdessä kahdesta tai kolmesta

▼M6

toistoissa käytetyssä astiassa, tämä voi olla merkki siitä, että levien siirrostamista astiaan ei ole tehty oikein tai astiaa ei ole puhdistettu kunnolla.) Testiraportissa on perusteltava selvästi, minkä vuoksi datapiste on hylätty vieraana havaintona. Hyväksyttäviä syitä ovat ainoastaan (harvinaiset) menetelmävirheet eikä pelkästään huono tarkkuus. Tämäntyyppisissä ongelmissa ei ole kovin hyödyllistä yrittää tunnistaa vieraita havaintoja tilastomenetelmien avulla, eivätkä tällaiset menetelmät voi korvata asiantuntijan arviota. Vieraat havainnot (jotka on merkitty sellaisiksi) tulisi säilyttää niiden datapisteiden joukossa, jotka merkitään myöhemmin graafisiin tai taulukkomuotoisiin esityksiin.

Vastemuuttujat

46. Testin tarkoituksena on määrittää testikemikaalin vaikutukset levien kasvuun. Tässä testimenetelmässä kuvataan kahta eri vastemuuttujaa, koska eri oikeudenkäyttöalueilla suositaan erilaisia käytänteitä ja noudatetaan erilaisia sääntelyvaatimuksia. Jotta testitulokset voitaisiin hyväksyä kaikilla oikeudenkäyttöalueilla, vaikutuksia olisi arvioitava käyttämällä molempia vastemuuttujia a ja b, joita kuvataan jäljempänä.

a) Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: tämän vastemuuttujan laskentaperusteena on biomassan logaritminen kasvu päivää kohden testijakson aikana.

b) Tuotos: tällä vastemuuttujalla tarkoitetaan testin lopussa mitattua biomassaa, josta on vähennetty testin alussa mitattu biomassa.

47. On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut myrkyllisyysarvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat yleensä suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus perustuu yleiseen kasvumalliin, joka kuvaa levän eksponentiaalista kasvua rajoittamattomissa viljelmissä, joista toksisuus arvioidaan kasvunopeuteen kohdistuvien vaikutusten perusteella ottamatta huomioon kontrollin spesifisen kasvunopeuden absoluuttista tasoa, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuutta tai testin kestoa. Tuotosta kuvaavaan vastemuuttujaan perustuvat tulokset riippuvat sen sijaan kaikista näistä muista muuttujista. E_yC_x riippuu kussakin testissä käytetyn levälajin spesifisestä kasvunopeudesta ja suurimmasta spesifisestä kasvunopeudesta, joka voi vaihdella eri lajien ja jopa eri leväkantojen välillä. Tätä vastemuuttujaa ei saa käyttää vertailtaessa eri levälajien tai eri kantojenkaan herkkyyttä myrkyllisille aineille. Vaikka tieteen kannalta on parempi arvioida myrkyllisyyttä keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden perusteella, tähän testimenetelmään on otettu mukaan myös tuotokseen perustuvat myrkyllisyyden arvioinnit, jotta voidaan täyttää eräiden maiden nykyiset sääntelyvaatimukset.

Keskimääräinen kasvunopeus

48. Tietyn ajanjakson keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan biomassan logaritmisena kasvuna soveltamalla seuraavaa kaavaa [1] kuhunkin kontrolli- ja käsittelyryhmän astiaan:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{päivä}^{-1}) \qquad [1],$$

jossa

μ_{i-j} keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä *i–j*

X_i biomassa hetkellä *i*

X_j biomassa hetkellä *j*.

Kullekin testiryhmälle ja kontrolliryhmälle lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

49. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan koko testin ajalta (yleensä päivästä 0 päivään 3) käyttämällä lähtöarvona siirrostetun biomassan nimellisarvoa mitatun lähtöarvon sijasta, koska näin saadaan yleensä parempi tarkkuus. Biomassan mitattua alkupitoisuutta voidaan käyttää, jos inokulaatin pieni biomassa voidaan määrittää riittävän tarkasti biomassan mittauslaitteella (esimerkiksi virtaussytometrilla). Lisäksi määritetään jaksoittainen kasvunopeus, joka saadaan laskemalla spesifiset kasvunopeudet kultakin päivältä testin aikana (päivät 0–1, 1–2 ja 2–3), ja tutkitaan, pysyykö kontrolliryhmän kasvunopeus vakiona (ks. validiteettivaatimukset, 11 kohta). Jos spesifinen kasvunopeus on huomattavasti pienempi ensimmäisenä päivänä kuin spesifisten kasvunopeuksien keskiarvo, se voi olla merkki viivevaiheesta. Vaikka viivevaihe voidaan minimoida ja poistaa käytännössä kokonaan kontrolliviljelmistä esiviljelmän asianmukaisella lisäyksellä, testiaineelle altistetuissa viljelmissä viivevaihe voi osoittaa toipumista toksisuuden aiheuttamasta alkustressistä tai vähentynyttä altistumista, joka johtuu testikemikaalin häviämisestä (esimerkiksi sorptiosta levämassaan) alkuvaiheen altistumisen jälkeen. Tällöin voidaan tarkastella jaksoittaista kasvunopeutta, jonka avulla voidaan arvioida testikemikaalin vaikutuksia altistusaikana. Merkittävät erot jaksoittaisen kasvunopeuden ja keskimääräisen kasvunopeuden välillä osoittavat, että kasvu poikkeaa jatkuvasta eksponentiaalisesta kasvusta, jolloin kasvukäyriä on syytä tarkastella lähemmin.

50. Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen kussakin käsitellyssä toistossa lasketaan seuraavan kaavan [2] avulla:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

jossa

$\%I_r$ = keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

μ_C = keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden (μ) keskiarvo kontrolliryhmässä

μ_T = keskimääräinen spesifinen kasvunopeus käsitellyssä toistossa.

51. Jos testiliuosten valmistamisessa käytetään liuottimia, kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen on laskettava liuottimia sisältävistä kontrolliviljelmistä eikä niistä kontrolliviljelmistä, joissa ei ole liuottimia.

Tuotos

52. Tuotos lasketaan vähentämällä testin lopussa mitatusta biomassasta testin alussa mitattu biomassa kontrolli- ja käsittelyryhmän kunkin astian osalta. Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan tuotoksen keskiarvo varianssiestimaatteineen. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen (% I_y) voidaan laskea kutakin käsiteltyä toistoa varten seuraavasti:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

jossa

$\%\ I_y$ = tuotoksen prosentuaalinen estyminen

Y_C = tuotoksen keskiarvo kontrolliryhmässä

Y_T = tuotoksen arvo käsitellyssä toistossa.

Pitoisuus-vastekäyrän piirtäminen

53. Prosentuaalinen estyminen merkitään graafisesti suhteessa testikemikaalin pitoisuuden logaritmiin. Näin saatuja pisteitä tarkastellaan huolellisesti ottamatta huomioon datapisteitä, joita pidettiin ensimmäisessä vaiheessa vieraina havaintoina. Datapisteiden kautta vedetään tasaisesti muuttuva viiva joko silmämääräisesti tai interpoloimalla tietokoneen avulla, jotta pitoisuuden ja vasteen suhteesta saataisiin alustava käsitys. Tämän jälkeen käytetään tarkempaa menetelmää, mieluimmin tietokonepohjaista tilastomenetelmää. Sen perusteella, mihin tietoja aiotaan käyttää, mikä on niiden laatu (tarkkuus) ja määrä ja mitä välineitä on käytettävissä niiden analysoimiseen, voidaan päättää, että tietojen analysointi lopetetaan tähän vaiheeseen (mikä on joskus hyvin aiheellistakin), ja ainoastaan lukea keskeiset arvot EC_{50} ja EC_{10} (ja/tai EC_{20}) silmämääräisesti piirretyltä käyrältä (ks. myös jäljempänä oleva kohta stimuloivista vaikutuksista). Päteviä syitä olla käyttämättä tilastomenetelmää ovat muun muassa seuraavat syyt:

— Vaikka tietoja käsiteltäisiin tietokoneistetulla menetelmällä, tulokset eivät olisi sen luotettavampia kuin jos tiedot olisi annettu asiantuntijan arvioitaviksi. Tällaisissa tapauksissa on jopa mahdollista, että eräillä tietokoneohjelmilla ei saada minkäänlaista luotettavaa tulosta (esimerkiksi sen vuoksi, että iteraatiot eivät konvergoidu).

— Tietokoneohjelmilla ei pystytä käsittelemään kunnolla stimuloinnin aiheuttamia kasvuvasteita (ks. jäljempänä).

Tilastomenetelmät

54. Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus-vastesuhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-yksiköiksi (8) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (8). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (9), (10) ja (11) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista. Epälineaarisen regressioanalyysin käyttöä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 5.

55. Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus-vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaatit. Jokaiselle estimaatille on määritettävä 95 prosentin luottamusväli, jos se on mahdollista. Vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja. Jos epälineaariseen käyrän sovitus on vaikeaa tai mahdotonta, koska tiedot ovat liian

▼M6

hajallaan, ongelma voidaan kiertää tekemällä regressio ryhmien keskiarvoille, mikä on käytännöllinen tapa vähentää mahdollisten vieraiden havaintojen vaikutusta. Tämän vaihtoehdon käyttö on mainittava testiraportissa tavanomaisesta menetelmästä poikkeavana keinona, jota on käytetty sen vuoksi, että käyrän sovittaminen yksittäisiin toistoihin ei antanut hyvää tulosta.

56. EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit voidaan saada myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (13), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

57. Jotta voidaan arvioida LOEC-pitoisuus ja siten myös NOEC-pitoisuus sekä testikemikaalin vaikutukset kasvunopeuteen, käsiteltyjen liuosten keskiarvoja on verrattava varianssianalyysitekniikoiden avulla (ANOVA). Sen jälkeen on verrattava kunkin pitoisuuden keskiarvoa kontrolliryhmän keskiarvoon käyttämällä sopivaa moniulotteista vertailumenetelmää tai trenditestimenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testi voi olla käyttökelpoinen (12), (14), (15), (16), (17). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Arviointi voidaan tehdä graafisesti tai virallisen testin avulla (17). Sopivia testejä ovat Levenen ja Bartlettin testit. Jos oletus varianssin homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Jonckheeren alaspäin askeltava trenditesti. Kirjallisuusviitteessä (11) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

58. Tieteen viimeaikaisen kehityksen perusteella on suositeltu, että NOEC-käsitteestä luovuttaisiin ja se korvattaisiin regressioanalyysiin perustuvilla EC_x:n piste-estimaateilla. Sopivaa x:n arvoa ei ole vielä vahvistettu tätä levätestiä varten. Sopivalta vaikuttaisi väli 10–20 prosenttia (valitun vastemuuttujan mukaan), ja suositeltavaa on ilmoittaa sekä EC_{10}- että EC_{20}-arvo.

Kasvun edistyminen

59. Pienissä pitoisuuksissa havaitaan joskus kasvun edistymistä (negatiivista estymistä). Tämä voi johtua joko hormesis-vaikutuksesta (”toksisuudesta johtuva kasvun edistyminen”) tai stimuloivien kasvutekijöiden lisäämisestä testiaineen kanssa testissä käytettyyn minimaaliseen viljelyaineeseen. On muistettava, että epäorgaanisten ravinteiden lisäämisellä ei pitäisi olla suoranaista vaikutusta, koska testiliuoksessa on oltava ravinteita ylimäärin koko testin ajan. Pieniannoksinen stimulointi voidaan yleensä jättää huomioimatta EC_{50}-arvon laskemisessa, jollei se ole hyvin merkittävää. Jos se on merkittävää tai jos EC_x-arvo on laskettava pientä x:n arvoa varten, voi olla tarpeen käyttää erityismenetelmiä. Stimuloinnin aiheuttamien vasteiden poistamista tietojen analysoinnista olisi vältettävä mahdollisuuksien mukaan, ja jos käytettävissä oleva käyränsovitusohjelmisto ei pysty käsittelemään vähäistä stimulointia, voidaan käyttää lineaarista interpolointia yhdessä bootstrap-menetelmän kanssa. Jos stimulointi on hyvin merkittävää, voidaan harkita hormesis-mallin käyttöä (18).

Muusta kuin toksisuudesta johtuva kasvun estyminen

60. Valoa absorboivat testimateriaalit voivat hidastaa kasvunopeutta, koska varjostus vähentää käytettävissä olevan valon määrää. Tällaiset fysikaaliset vaikutukset olisi erotettava myrkkyvaikutuksista muuttamalla testiolosuhteita, ja fysikaalisista vaikutuksista olisi raportoitava erikseen. Tästä annetaan ohjeita kirjallisuusviitteissä (2) ja (3).

TESTIRAPORTTI

61. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

▼**M6**

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, joilla on merkitystä, muun muassa vesiliukoisuuden raja-arvo,

— kemialliset tunnistetiedot (esimerkiksi CAS-numero), mukaan luettuna puhtaus (epäpuhtaudet).

Koelajit:

— kanta, sen toimittaja tai lähde ja viljelyolosuhteet.

Testiolosuhteet:

— testin alkamispäivä ja kesto,

— koejärjestelyn kuvaus: koeastiat, viljelmien tilavuudet ja biomassan tiheys testin alussa,

— viljelyaineen koostumus,

— testipitoisuudet ja toistot (esimerkiksi toistojen määrä, testipitoisuuksien määrä ja testissä käytetty geometrinen porrastus),

— kuvaus testiliuosten valmistamisesta, muun muassa liuottimien käyttö,

— viljelylaite,

— valon voimakkuus ja laatu (lähde, homogeenisuus),

— lämpötila,

— testatut pitoisuudet: nimelliset testipitoisuudet ja mahdolliset tulokset analyyseistä, joilla on määritetty testikemikaalin pitoisuus koeastioissa. Menetelmän saantoteho ja määritysraja testimatriisissa on ilmoitettava,

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä,

— biomassan määritysmenetelmä sekä näyttö mitatun parametrin ja kuivapainon korrelaatiosta.

Tulokset:

— pH-arvot kokeen alussa ja lopussa kaikista käsittelyistä,

— kussakin pullossa oleva biomassa kunakin mittausajankohtana sekä biomassan mittausmenetelmä,

— kasvukäyrät (biomassa ajan funktiona),

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin,

— pitoisuuden ja vaikutuksen suhteen graafinen esitys,

▼M6

— myrkyllisyyden arvioinnit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja NOEC-pitoisuudet, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät,

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi vähiten merkitsevä erotus),

— mahdollinen kasvun edistyminen käsitellyissä liuoksissa,

— muut havaitut vaikutukset, esimerkiksi levien morfologiset muutokset,

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) International Organisation for Standardization (ISO) (1993). ISO 8692: Water quality – Algal growth inhibition test.

(2) International Organisation for Standardization (ISO) (1998). ISO/DIS 14442: Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.

(3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(4) International Organisation for Standardization (ISO) (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525–2531.

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919–925

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073–2079.

(8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713–718.

(9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157–167.

(10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485–1494.

(11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096–1121.

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519–531.

(17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä ja lyhenteitä:

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin kuivapaino ilmaistuna tiettyä tilavuutta kohden, esimerkiksi milligrammoina levää yhtä litraa testiliuosta kohden. Yleensä ”biomassa” määritellään massaksi, mutta tässä testissä sillä tarkoitetaan massaa tilavuutta kohden. Tässä testissä biomassaa mitataan usein myös epäsuorasti esimerkiksi solumäärien ja fluoresenssin avulla, minkä vuoksi ”biomassa”-termi käsittää myös nämä korvaavat menetelmät.

Kemikaali: aine tai seos.

Variaatiokerroin: Parametrin vaihtelua ilmaiseva dimensioton suure, joka määritellään keskihajonnan ja keskiarvon suhteeksi. Se voidaan ilmaista myös prosenttiarvona. Rinnakkaisten kontrolliviljelmien keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskimääräinen variaatiokerroin lasketaan seuraavasti:

1. Keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden variaatiokerroin lasketaan (prosentteina) kunkin rinnakkaisviljelmän päivittäisistä tai jaksoittaisista kasvunopeuksista.

2. Lasketaan kaikkien kohdassa 1 laskettujen arvojen keskiarvo, jotta saadaan rinnakkaisten kontrolliviljelmien päivittäisen tai jaksoittaisen spesifisen kasvunopeuden keskimääräinen variaatiokerroin.

Ecx: Testiviljelyaineeseen liuenneen testikemikaalin pitoisuus, jossa testattavan eliön kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia ”E_rC” ja jälkimmäisestä symbolia ”E_yC”.

Viljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testilevät kasvavat, kun ne altistetaan testikemikaalille. Yleensä testikemikaali liuotetaan testiviljelyaineeseen.

Kasvunopeus (keskimääräinen spesifinen kasvunopeus): biomassan logaritminen kasvu altistuksen aikana.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa kemikaalilla havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Vastemuuttuja: Muuttuja, jonka avulla arvioidaan myrkyllisyyttä. Vastemuuttuja johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä testimenetelmässä kasvunopeudet ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittaamalla biomassaa suoraan tai käyttämällä edellä mainittuja korvaavia menetelmiä.

▼**M6**

Spesifinen kasvunopeus: vastemuuttuja, joka määritellään havainnoitavan parametrin (tässä testimenetelmässä biomassan) luonnollisten logaritmien erotuksen ja vastaavan ajanjakson väliseksi suhteeksi.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Tuotos: altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo.

▼**M6**

Lisäys 2

Testiin sopivat kannat

Viherlevät

Pseudokirchneriella subcapitata (aiemmin *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (aiemmin *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Piilevät

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Syanobakteerit

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Kantojen alkuperä

Suositellut kannat ovat saatavissa vain yhtä levää sisältävinä viljelminä seuraavista kokoelmista (jotka luetellaan aakkosjärjestyksessä):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
YHDYSVALLAT

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
YHDISTYNYT KUNINGASKUNTA

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
SAKSA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
YHDYSVALLAT

▼M6

Suositeltujen lajien ulkonäkö ja ominaisuudet

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Ulkonäkö	Kaarevia ja kierteisiä yksittäisiä soluja	Soikeita, yleensä yksittäisiä soluja	Sauvoja	Soikeiden solujen muodostamia ketjuja	Sauvoja
Koko (pituus × leveys) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Solutilavuus (μm^3/solu)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Solujen kuivapaino (mg/solu)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Kasvunopeus (3) (päivä$^{-1}$)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Elektronisella hiukkaslaskimella mitattuna.
(2) Koon perusteella laskettuna.
(3) Yleisimmin havaittu kasvunopeus OECD-viljelyaineessa, kun valon voimakkuus on noin 70 µE m^{-2} s^{-1} ja lämpötila 21 °C.

Suositeltujen koelajien viljelyä ja käsittelyä koskevat erityissuositukset

Pseudokirchneriella subcapitata ja Desmodesmus subspicatus

Näitä viherleviä on yleensä helppo ylläpitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista. Solut ovat yleensä yksittäisinä soluina, ja solutiheys on helposti mitattavissa elektronisen hiukkaslaskimen tai mikroskoopin avulla.

Anabaena flos-aquae

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. On erityisen tärkeää huolehtia siitä, että panoskasvatuksessa ei ohiteta kasvun viivevaihetta vaihdon yhteydessä, koska muuten palautuminen on vaikeaa.

Anabaena flos-aquae muodostaa solurihmoista vyyhtimäisiä kasaumia. Näiden kasaumien koko voi vaihdella viljelyolosuhteiden mukaan. Voi olla tarpeen rikkoa nämä kasaumat, jos biomassan määrityksessä käytetään mikroskooppilaskentaa tai elektronista hiukkaslaskinta.

Rihmojen pilkkomiseen voidaan käyttää osanäytteiden ultraäänihajotusta, millä voidaan vähentää laskentatulosten vaihtelevuutta. Solut voivat kuitenkin tuhoutua, jos ultraäänihajotusta jatketaan kauemmin kuin rihmojen pilkkominen lyhyemmiksi kappaleiksi edellyttää. Ultraäänihajotuksen voimakkuuden ja keston on oltava sama kaikissa käsittelyissä.

Hemosytometrilla lasketaan riittävän monta kenttää (vähintään 400 solua) vaihtelevuuden tasoittamiseksi. Tämä parantaa mikroskooppisten tiheysmääritysten luotettavuutta.

Kun solurihmat on pilkottu huolellisella ultraäänihajotuksella, *Anabaena*-solujen kokonaistilavuus voidaan määrittää elektronisella hiukkaslaskimella. Ultraäänihajotuksen energia on säädettävä siten, etteivät solut rikkoudu.

Käyttämällä Vortex-ravistelijaa tai muuta vastaavaa menetelmää varmistetaan, että leväsuspensio, jota käytetään koeastioiden siirostamiseen, on hyvin sekoitettu ja homogeeninen.

▼**M6**

Koeastiat on sijoitettava tasoravistelijaan, joka tekee edestakaista tai orbitaaliliikettä frekvenssillä 150 rpm. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää jaksoittaista ravistelua, joka vähentää Anabaenan taipumusta muodostaa rykelmiä. Jos rykelmiä kuitenkin muodostuu, on varmistettava, että biomassan mittauksia varten saadaan edustavia näytteitä. Ennen näytteiden ottoa voi olla tarpeen ravistella astioita voimakkaasti levärykelmien hajottamiseksi.

Synechococcus leopoliensis

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista.

Synechococcus leopoliensis kasvaa yksittäisinä sauvanmuotoisina soluina. Solut ovat hyvin pieniä, mikä vaikeuttaa mikroskooppilaskennan käyttöä biomassan mittauksissa. Elektroniset hiukkaslaskimet, joilla voidaan laskea jopa noin 1 µm:n suuruisia hiukkasia, ovat käyttökelpoisia. Lisäksi voidaan käyttää *in vitro* -fluoresenssimittauksia.

Navicula pelliculosa

Kantaviljelmää voidaan pitää erilaisissa viljelyaineissa. Kantakokoelmia pitävät laitokset antavat tietoja sopivista viljelyaineista. Viljelyaineissa on oltava silikaattia.

Navicula pelliculosa voi tietyissä kasvuolosuhteissa muodostaa kasaumia. Lipidituotannon vuoksi leväsolut pyrkivät joskus kerääntymään pintakalvoon. Siinä tapauksessa on ryhdyttävä erityistoimiin, jotta biomassan määritykseen saadaan edustavat osanäytteet. Voimakas ravistelu esimerkiksi Vortex-ravistimella voi olla tarpeen.

▼**M6**

Lisäys 3

Viljelyaine

Tässä testimenetelmässä voidaan käyttää jompaakumpaa seuraavista viljelyaineista:

— OECD-viljelyaine: alkuperäinen OECD:n testiohjeen (TG) nro 201 mukainen viljelyaine, joka on myös ISO 8692 -standardin mukainen.

— Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston (US EPA) viljelyaine AAP, joka on myös ASTM-standardin mukainen.

Näitä viljelyaineita valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

AAP-viljelyaineen (US EPA) ja OECD:n testiohjeen (TG) nro 201 mukaisen viljelyaineen koostumus

Komponentit	AAP		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

EDTA:n ja raudan moolisuhde on hieman suurempi kuin yksi. Näin estetään raudan saostumisen ja minimoidaan samalla raskasmetalli-ionien kelatoituminen.

Testissä, jossa käytetään *Navicula pelliculosa* -piilevää, molempiin viljelyaineisiin on lisättävä $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$:ta, kunnes Si-pitoisuudeksi saadaan 1,4 mg/l.

▼**M6**

Viljelyaineen pH saadaan, kun viljelyaineen karbonaattijärjestelmä ja CO_2:n osapaine ilmassa ovat päässeet tasapainoon. Viljelyaineen pH:n ja molaarisen bikarbonaattipitoisuuden likimääräinen suhde 25 °C:ssa saadaan seuraavan kaavan avulla:

$$pH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

Kun $NaHCO_3$ on 15 mg/l, pH_{eq} = 7,5 (US EPA -viljelyaine), ja kun $NaHCO_3$ on 50 mg/l, pH_{eq} = 8,1 (OECD-viljelyaine).

Testiaineen alkuainekoostumus

Alkuaine	AAP	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

OECD-viljelyaineen valmistus

Ravinne	Pitoisuus kantaliuoksessa
Kantaliuos 1: makroravinteet	
NH_4Cl	1,5 g/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Kantaliuos 2: rauta	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Kantaliuos 3: hivenaineet	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Ravinne	Pitoisuus kantaliuoksessa
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Kantaliuos 4: bikarbonaatti	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	

Kantaliuokset steriloidaan kalvoerotuksella (keskimääräinen huokoskoko 0,2 μm) tai autoklavoimalla (120 °C, 15 min). Liuoksia säilytetään pimeässä 4 °C:n lämpötilassa.

Kantaliuoksia 2 ja 4 ei saa käsitellä autoklaavissa, vaan ne on steriloitava kalvoerotuksella.

Viljelyaine valmistetaan lisäämällä veteen sopiva määrä kantaliuoksia 1–4:

Noin 500 ml:aan steriloitua vettä lisätään:

10 ml kantaliuosta 1

1 ml kantaliuosta 2

1 ml kantaliuosta 3

1 ml kantaliuosta 4

Liuokseen lisätään steriloitua vettä, kunnes tilavuus on 1 000 ml.

Sen jälkeen on odotettava, kunnes viljelyaine ja ilman CO_2 ovat päässeet tasapainoon. Tarvittaessa liuokseen johdetaan tätä varten steriiliä suodatettua ilmaa muutaman tunnin ajan.

US EPA -viljelyaineen valmistus

1. Lisätään 1 ml kutakin *2.1–2.7* kohdissa mainittua kantaliuosta noin 900 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä ja laimennetaan liuos 1 litraksi.

2. Makroravinteita sisältävät kantaliuokset valmistetaan liuottamalla seuraavat aineet 500 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä. Reagenssit *2.1, 2.2, 2.3* ja *2.4* voidaan yhdistää yhdeksi kantaliuokseksi.

2.1	$NaNO_3$	12,750 g
2.2	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	6,082 g
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g
2.4	Mikroravinteitä sisältävä kantaliuos (ks. 3)	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g
2.6	K_2HPO_4	0,522 g
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	ks. huomautus 1.

▼**M6**

Huomautus 1: Käytetään vain piilevälajien viljelyssä. Voidaan lisätä suoraan (202,4 mg) tai kantaliuoksessa, jotta viljelyaineen lopulliseksi Si-pitoisuudeksi saadaan 20 mg/l.

3. Mikroravinteita sisältävä kantaliuos valmistetaan liuottamalla seuraavat aineet 500 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä.

3.1	H_3BO_3	92,760 mg
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg
3.5	CoCl2·6H2O	0,714 mg
3.6	$Na2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg. [Dinatrium(eteenidinitrilo)tetra-asetaatti]
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg (ks. huomautus 2)

Huomautus 2: Käytetään kantaviljelmien viljelyaineessa vain, kun viljellään piilevälajeja.

4. Säädetään pH arvoon 7,5 ± 0,1 käyttämällä 0,1 *N* tai 1,0 *N* NaOH:ta tai HCl:a.

5. Viljelyaine suodatetaan steriiliin astiaan kalvosuodattimen läpi, jonka huokoskoko on 0,22 μm, jos käytetään hiukkaslaskinta. Jollei käytetä hiukkaslaskinta, huokoskoko on 0,45 μm.

6. Viljelyainetta säilytetään käyttöön saakka pimeässä noin 4 °C:een lämpötilassa.

▼M6

Lisäys 4

Esimerkki levänviljelymenetelmästä

Yleisiä huomautuksia

Tässä kuvattavan menetelmän avulla voidaan viljellä leviä myrkyllisyyskokeita varten.

Sopivien menetelmien avulla varmistetaan, että leväviljelmissä ei ole bakteeritartuntaa. Aina on varmistettava, että viljelmissä esiintyy vain yhtä levälajia. Tämä pätee myös akseenisia viljelmiä käytettäessä.

Bakteerien tai muiden levien pääsy viljelmään on estettävä tekemällä kaikki toimet steriileissä olosuhteissa.

Välineet ja materiaalit

Katso testimenetelmän kohta Laitteisto.

Leväviljelmien tuottaminen

Ravintoliuosten (viljelyaineiden) valmistus:

Kaikki viljelyaineen ravintosuolat valmistetaan väkevänä kantaliuoksena, ja niitä säilytetään pimeässä ja viileässä. Liuokset steriloidaan suodattamalla tai autoklavoimalla.

Viljelyaine valmistetaan lisäämällä sopiva määrä kantaliuosta steriiliin tislattuun veteen. Samalla on huolehdittava siitä, ettei synny infektioita. Jos viljelyaine on kiinteää, lisätään 0,8 prosenttia agaria.

Kantaviljelmä:

Kantaviljelmät ovat pieniä leväviljelmiä, jotka siirretään säännöllisesti tuoreeseen elatusaineeseen, jossa ne toimivat testin alkumateriaalina. Jos viljelmiä ei käytetä säännöllisesti, ne valutetaan kallistettuihin agarputkiin. Putket siirretään tuoreeseen elatusaineeseen vähintään kahden kuukauden väliajoin.

Kantaviljelmiä viljellään sopivaa elatusainetta sisältävissä erlenmeyerpulloissa (tilavuus noin 100 ml). Kun leviä inkuboidaan 20 °C:ssa jatkuvassa valaistuksessa, siirrot on tehtävä viikoittain.

Siirrossa ”vanhan” viljelmän osa siirretään steriilin pipetin avulla tuoretta elatusainetta sisältävään pulloon. Jos laji on nopeasti kasvava, alkupitoisuuden on oltava noin sadasosa vanhan viljelmän pitoisuudesta.

Lajin kasvunopeus voidaan määrittää kasvukäyrän avulla. Näin on mahdollista arvioida, kuinka usein viljelmä on siirrettävä uuteen elatusaineeseen. Siirto on tehtävä, ennen kuin viljelmä kuolee.

Esiviljely:

Esiviljelyn avulla saadaan levämäärä, joka on sopiva testiviljelmien siirrostukseen. Esiviljelmää inkuboidaan testiolosuhteissa, ja viljelmä käytetään sen ollessa vielä eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa, yleensä 2–4 päivän pituisen inkubaation jälkeen. Leväviljelmät, jotka sisältävät epämuodostuneita tai poikkeavia soluja, on hylättävä.

▼M6

Lisäys 5

Tietojen analysointi epälineaarisen regression avulla

Yleisiä huomautuksia

Levätesteissä ja muissa testeissä, joissa mitataan mikro-organismien kasvua (biomassan kasvua), vastetta kuvaava muuttuja on luonnostaan jatkuva ja metrinen: prosessin nopeus, jos käytetään kasvunopeutta, ja sen integraali ajan funktiona, jos käytetään biomassaa. Molempia muuttujia verrataan toistoina tehtyjen altistumattomien kontrollien vastaavaan keskimääräiseen vasteeseen ottaen huomioon, että kontrollit reagoivat maksimaalisesti kulloisiinkin olosuhteisiin; levätestissä valo ja lämpötila ovat pääasialliset määräävät tekijät. Järjestelmä voi olla jakautunut tai homogeeninen, ja biomassaa voidaan pitää jatkumona ottamatta huomioon yksittäisiä soluja. Tämän järjestelmän vastetyypin varianssin jakautuminen riippuu ainoastaan testiolosuhteista (joille ovat luonteenomaisia virheiden logaritmiset normaalijakaumat tai normaalijakaumat). Tämä poikkeaa tyypillisistä dikotomisista vasteista biologisissa testeissä, joissa oletetaan usein, että yksittäisten organismien toleranssi (jolle on tyypillistä binomijakauma) on hallitseva varianssikomponentti. Tällöin kontrollivasteet ovat nolla tai taustan tasoa.

Normalisoitu tai suhteellinen vaste r pienenee yksinkertaisessa tapauksessa tasaisesti 1:stä (ei kasvun estymistä) 0:aan (100-prosenttinen estyminen). On muistettava, että kaikkiin vasteisiin liittyy virhe ja että ilmeinen negatiivinen kasvun estyminen voi laskelmissa johtua pelkästään satunnaisvirheestä.

Regressioanalyysi

Mallit

Regressioanalyysin tavoitteena on kuvata pitoisuus-vastekäyrää matemaattisena regressiofunktiona $Y = f(C)$ tai yleisemmin $F(Z)$, jossa $Z = \log C$. Käänteisesti funktio $C = f^{-1}(Y)$ antaa mahdollisuuden laskea EC_x-arvot, kuten EC_{50}-, EC_{10}- ja EC_{20}-arvot, ja niiden 95 prosentin luottamusvälit. Useiden yksinkertaisten matemaattisten funktioiden on todettu soveltuvan pitoisuusvastesuhteen kuvaamiseen leväkasvun estymistesteissä. Niihin kuuluvat muun muassa logistinen kaava, epäsymmetrinen Weibull-jakauma ja logaritminen normaalijakauma, jotka ovat kaikki S-käyriä, jotka lähestyvät asymptoottisesti arvoa nolla, kun $C \rightarrow 0$, ja yhtä, kun $C \rightarrow$ ääretön.

Jatkuvan kynnysfunktion malleja (esimerkiksi Kooijmanin malli, joka kuvaa populaation kasvun estymistä; Kooijman ym., 1996) on hiljattain ehdotettu vaihtoehdoiksi asymptoottisille malleille. Tällaisissa malleissa oletetaan, että vaikutuksia ei esiinny tiettyä kynnysarvoa EC_0+ pienemmillä pitoisuuksilla. Tämä pitoisuus arvioidaan ekstrapoloimalla vaste–pitoisuus-suhde siten, että se leikkaa pitoisuusakselin, käyttämällä yksinkertaista jatkuvaa funktiota, joka ei ole differentioituva lähtöpisteessä.

Analyysinä voi olla jäännösneliösummien yksinkertainen minimointi (kun varianssin oletetaan olevan vakio) tai painotettujen neliösummien yksinkertainen minimointi, jos varianssin heterogeenisuus kompensoidaan.

Menettely

Menettely on seuraava: Valitaan sopiva funktionaaliyhtälö $Y = f(C)$ ja sovitetaan se tietoihin epälineaarisella regressiolla. Tässä yhteydessä on parempi käyttää jokaisesta yksittäisestä pullosta tehtyjä mittauksia kuin toistojen keskiarvoja, jotta tiedoista saataisiin mahdollisimman paljon informaatiota. Toisaalta käytännön kokemus viittaa siihen, että jos varianssi on suuri, toistojen keskiarvoilla saadaan

▼**M6**

luotettavampi matemaattinen arviointi, johon tiedoissa esiintyvät satunnaisvirheet eivät vaikuta yhtä paljon kuin jos jokainen yksittäinen datapiste säilytettäisiin.

Sovitettu käyrä ja mitatut tiedot esitetään graafisesti, minkä jälkeen tutkitaan, onko käyrä sovitettu asianmukaisesti. Jäännösten analysointi voi olla erityisen käyttökelpoinen keino tähän tarkoitukseen. Jos pitoisuus–vaste-käyrän kuvaamiseen valittu funktionaalinen suhde ei kuvaa hyvin koko käyrää tai jotain sen olennaista osaa, kuten vastetta pienillä pitoisuuksilla, valitaan toisenlainen käyränsovitus, esimerkiksi Weibull-funktion kaltainen epäsymmetrinen käyrä symmetrisen käyrän sijasta. Negatiiviset inhibitiot voivat olla ongelmallisia muun muassa logaritmisen normaalijakauman yhteydessä ja voivat vaatia vaihtoehtoisen regressiofunktion käyttöä. Ei ole suositeltavaa merkitä näitä negatiivisia arvoja nollaksi tai antaa niille pientä positiivista arvoa, koska se vääristää virhejakaumaa. Voi olla aiheellista tehdä erilliset käyränsovitukset joillekin käyrän osille, esimerkiksi sille osalle, jossa kasvun estyminen on pientä, $EC_{pieni\ x}$-estimaattien määrittämiseksi. Sovitetusta yhtälöstä lasketaan (käänteisfunktiolla $C = f^{-1}(Y)$) EC_x:n luonteenomaiset piste-estimaatit, ja niistä ilmoitetaan ainakin EC_{50}-arvo ja yksi tai kaksi $EC_{pieni\ x}$-arvoa. Käytännön testauksesta saadut kokemukset ovat osoittaneet, että levätestillä saadaan yleensä kohtuullisen tarkka estimaatti pitoisuuksilla, joilla kasvun estyminen on 10-prosenttista, jos datapisteitä on riittävästi ja pienillä pitoisuuksilla ei esiinny kasvun edistymistä häiritsevänä tekijänä. EC_{20}-estimaatin tarkkuus on yleensä huomattavasti parempi kuin EC_{10}-estimaatin, koska EC_{20} sijaitsee yleensä pitoisuus–vaste-käyrän keskiosan lähes lineaarisessa osassa. Joskus EC_{10}-arvoa voi olla vaikea tulkita kasvun edistymisen vuoksi. Sen vuoksi on suositeltavaa ilmoittaa aina myös EC_{20}-arvo, vaikka EC_{10}-arvo saadaankin yleensä riittävän tarkasti.

Painotuskertoimet

Testissä varianssi ei yleensä ole vakio, ja tavallisesti siihen sisältyy suhteellinen komponentti. Sen vuoksi on hyödyllistä tehdä painotettu regressio rutiininomaisesti. Tähän analyysin tarvittavien painotuskertoimien oletetaan yleensä olevan käänteisesti verrannollisia varianssiin:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Monet regressio-ohjelmat antavat mahdollisuuden tehdä painotettu regressioanalyysi painotuskertoimilla, jotka valitaan taulukosta. Painotuskertoimet voidaan helposti normalisoida kertomalla ne luvulla $n/\Sigma\ w_i$ (jossa n on datapisteiden määrä), jotta niiden summa olisi yksi.

Vasteiden normalisointi

Normalisointi kontrollien keskimääräisen vasteen avulla aiheuttaa joitakin periaatteellisia ongelmia ja johtaa melko mutkikkaaseen varianssirakenteeseen. Vastearvojen jakaminen kontrollien keskimääräisellä vastearvolla kasvunestymisprosentin määrittämiseksi aiheuttaa lisävirheen, joka johtuu kontrollien keskiarvoon liittyvästä virheestä. Jollei tämä virhe ole mitättömän pieni, regressioon sovellettavat painotuskertoimet ja luottamusvälit on korjattava ottaen huomioon kovarianssi kontrollin kanssa (Draper ja Smith, 1981). On tärkeää, että kontrollien keskimääräinen vaste estimoidaan hyvin tarkasti, jotta voidaan minimoida suhteellisen vasteen kokonaisvarianssi. Varianssi saadaan seuraavasti:

(Alaindeksi i tarkoittaa pitoisuutta i ja alaindeksi 0 tarkoittaa kontrolleja.)

$$Y_i = \text{Suhteellinen vaste} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼M6

kun varianssi on: $Var(Y_i) = Var(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/ \partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

ja koska $(\partial Y_i/ \partial r_i) = 1/r_0$ ja $(\partial Y_i/ \partial r_0) = r_i/r_0^2$

kun data on normaalisti jakautunut ja m_i ja m_0 ovat toistoja: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

suhteellisen vasteen Y_i kokonaisvarianssi on:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Kontrollien keskiarvoon liittyvä virhe on kääntäen verrannollinen niiden kontrollitoistojen määrän neliöjuureen, joista keskiarvo on laskettu. Joskus voi olla aiheellista ottaa mukaan aiempia tietoja, jotta virhettä voidaan pienentää merkittävästi. Vaihtoehtoisena menetelmänä on, että tietoja ei normalisoida eikä absoluuttisia vasteita soviteta, kontrolleja koskevat vastetiedot mukaan luettuina, vaan kontrollivasteen arvo otetaan käyttöön lisäparametrina, joka sovitetaan epälineaarisella regressiolla. Käytettäessä tavanomaista kahden parametrin regressioyhtälöä tämä menetelmä edellyttää kolmen parametrin sovittamista ja vaatii sen vuoksi enemmän datapisteitä kuin sellaisten tietojen epälineaarinen regressio, jotka on normalisoitu käyttämällä ennalta määritettyä kontrollivastetta.

Käänteiset luottamusvälit

On melko monimutkaista laskea epälineaarisen regression luottamusvälit estimoimalla käänteisfunktion avulla, eikä tätä vaihtoehtoa ole saatavilla tavanomaisissa tilasto-ohjelmistopaketeissa. Likimääräiset luottamusvälit voidaan saada tavanomaisilla ohjelmilla, joita käytetään epälineaarisen regression laskemiseen, käyttämällä uudelleenparametrisointia (Bruce ja Versteeg, 1992), jolloin matemaattinen kaava kirjoitetaan uudelleen käyttämällä haluttuja piste-estimaatteja, esimerkiksi EC_{10}- ja EC_{50}-arvoa, arvioitavina parametreina. (Funktioksi valitaan I = f (α, β, pitoisuus) ja käytetään määritelmäsuhteita f (α, β, EC_{10}) = 0,1 ja f (α, β, EC_{50}) = 0,5 korvaamaan f (α, β, pitoisuus) vastaavalla funktiolla g(EC_{10}, EC_{50}, pitoisuus).

Laskenta voidaan tehdä suoraan (Andersen ym., 1998) säilyttämällä alkuperäinen yhtälö ja käyttämällä Taylorin laajennusta r_i:n ja r_0:n keskiarvojen ympäristössä.

Viimeaikoina on käytetty yhä enemmän ”bootstrap”-menetelmiä. Näissä menetelmissä arvioidaan empiiristä varianssijakaumaa käyttämällä mitattuja tietoja ja tiheää uusintanäytteiden ottoa, jota ohjataan satunnaislukugeneraattorilla.

VIITTEET

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625–1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R..D. and Versteeg,, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485–1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405–420.

▼B

C.4 BIOHAJOAVUUDEN MÄÄRITYS

OSA I YLEISTÄ

I.1 JOHDANTO

Jäljempänä kuvataan kuusi menetelmää, joiden avulla voidaan tutkia kemikaalin biohajoavuutta aerobisessa vesiliuoksessa. Menetelmät ovat seuraavat:

a) Liukoinen orgaaninen hiili (DOC — Dissolved Organic Carbon) Die-Away -menetelmä C.4-A,

b) Muunneltu OECD-seulonta (DOC Die-Away) -menetelmä C.4-B,

c) Hiilidioksidin (CO_2) muodostus (muunneltu Sturm-testi) — menetelmä C.4-C

d) Manometrinen respirometria -menetelmä C.4-D

e) Suljettu pullo -menetelmä C.4-E

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry, Japani) -menetelmä C.4-E

Menetelmäkuvausten osassa I on kunkin testin yleiskuvaus. Osissa II–VII on kuvattu menetelmän erityispiirteet. Liitteissä on määritelmiä, suureyhtälöitä ja ohjeita.

OECD-maiden laboratorioiden välinen, vuonna 1988 suoritettu testi osoitti, että menetelmillä saadut tulokset ovat yhtenäiset. Menetelmää valittaessa on kuitenkin otettava huomioon testattavan aineen fysikaaliset ominaisuudet.

I.2 MENETELMÄN VALINTA

Sopivimman menetelmän löytämiseksi on hankittava tietoja aineen kemiallisesta liukoisuudesta, höyrynpaineesta ja adsorptio-ominaisuuksista. Aineen kemiallinen rakenne tai kaava on selvitettävä teoreettisten arvojen laskentaa tai mitattujen parametrien — esimerkiksi ThOD:n, $ThCO_2$:n, DOC:n, TOC:n ja COD:n — tarkistamista varten (katso liitteitä I ja II).

Kemikaaleja, joiden vesiliukoisuus on vähintään 100 mg/l, voidaan tutkia kaikilla menetelmillä, edellyttäen, etteivät kemikaalit ole haihtuvia tai adsorboivia. Huonosti veteen liukenevia, haihtuvia tai adsorboivia kemikaaleja varten soveltuvat menetelmät luetellaan taulukossa 1. Esimerkkejä huonosti veteen liukenevien ja haihtuvien kemikaalien käsittelymahdollisuuksista kuvataan liitteessä III. Lievästi haihtuvia kemikaaleja voidaan testata DOC Die-Away -menetelmällä, edellyttäen että testausastiassa on riittävä kaasutila (astian on oltava suljettua tyyppiä). Tällöin on tehtävä abioottisia tarkistuksia mahdollista fysikaalista hukkaa ajatellen.

▼B

Taulukko 1

Testimenetelmien soveltuvuus

Testi	Analyyttinen menetelmä	Soveltuvuus		
		huonosti liukenevat aineet	haihtuvat aineet	adsorboivat aineet
DOC Die-Away	Liuennut orgaaninen hiili	—	—	+/-
Muunneltu OECD Die-Away	Liuennut orgaaninen hiili	—	—	+/-
CO_2:n muodostus	Respirometria: CO_2:n muodostus	+	—	+
Manometrinen respirometria	Manometrinen respirometria: hapenkulutus	+	+/-	+
Suljettu pullo	Respirometria: liuennut happi	+/-	+	+
MITI	Respirometria: hapenkulutus	+	+/-	+

Tulosten tulkintaa varten tarvitaan tietoja testattavan aineen pääosien puhtaudesta tai niiden suhteellisista osuuksista, etenkin jos tuloksena saatavat arvot ovat pieniä tai marginaalisia.

Sopivan testauspitoisuuden löytämiseksi on suositeltavaa selvittää aineen myrkyllisyys bakteereille (liite IV). Näiden tietojen avulla voidaan usein varmistaa oikea tulkinta, jos tuloksena saatu biohajoavuus on heikko.

I.3 VERTAILUAINEET

Menetelmän tarkistamiseksi biohajoavuuskriteerin täyttäviä vertailukemikaaleja testataan rinnan testiajojen kanssa tarkoitukseen sopivassa pullossa.

Sopivia vertailukemikaaleja ovat (vastatislattu) aniliini, natriumasetaatti ja natriumbentsoaatti, jotka kaikki hajoavat näiden menetelmien mukaan käsiteltynä, myös ilman siirrosaineen lisäystä.

On ehdotettu sellaisen vertailukemikaalin etsimistä, jolla olisi hyvä biohajoavuus, mutta joka edellyttäisi siirrosaineen lisäystä. Tarkoitukseen on ehdotettu kaliumvetyftalaattia, josta on kuitenkin saatava lisätodisteita, ennen kuin se voidaan hyväksyä vertailuaineeksi.

Respirometrisissä testeissä typpeä sisältävät yhdisteet voivat häiritä hapenottoa nitrifikaation vuoksi (katso liitteitä II ja V).

I.4 TESTIMENETELMIEN PERIAATE

Testattavaa ainetta, joka on liuotettu tai suspendoitu epäorgaaniseen aineeseen, siirrostetaan ja inkuboidaan aerobisissa olosuhteissa pimeässä tai heikossa valaistuksessa. Testiliuoksen siirrostuksesta saadun DOC-määrän on oltava mahdollisimman pieni testattavasta aineesta saatuun DOC-määrään verrattuna. Siirrosaineen endogeeninen aktiviteetti otetaan huomioon ajamalla rinnan taustakokeita käyttäen pelkää siirrosainetta ilman testattavaa ainetta, vaikka solujen endogeeninen aktiviteetti testattavan aineen vaikutusten vuoksi ei ole täysin sama kontrolliliuoksessa ja testiliuoksessa. Menetelmien tarkistamiseksi ajetaan rinnakkaiskoe vertailuainetta käyttäen.

▼B

Hajoamisvaiheen jälkeen seuraa yleensä parametrien (esimerkiksi DOC:n, CO_2-tuotannon ja hapenoton) määritys. Biohajoavuusvaiheen alku ja loppu voidaan todeta tekemällä mittauksia riittävän usein. Jos käytetään automaattisia respirometrejä, mittaaminen on jatkuvaa. DOC-arvo mitataan eräissä tapauksissa toisen parametrin mittauksen yhteydessä, mutta tavallisimmin DOC-mittaus tehdään kokeen alussa ja lopussa. Spesifisen kemiallisen analyysin avulla voidaan määrittää myös testattavan aineen primaarinen hajoaminen ja mahdollisesti muodostuvat välituotteet (pakollinen osa MITI-testiä).

Kokeen kesto on yleensä 28 päivää. Koe voidaan keskeyttää aiemmin, jos biohajoavuuskäyrässä on vähintään kolmen mittauksen pituinen tasanne. Koetta voidaan myös jatkaa 28. päivän jälkeen, jos biohajoavuuskäyrästä nähdään, että biohajoamisvaihe on alkanut, mutta ei vielä ole saavuttanut tasannetta 28. päivän kohdalla.

I.5 LAATUKRITEERIT

I.5.1 **Toistettavuus**

Biohajoavuuden ominaisuuksien ja siirrosaineksena käytettyjen yhdistettyjen bakteeriviljelmien ominaisuuksien vuoksi määritykset on tehtävä vähintään kaksi kertaa.

Käytäntö on osoittanut, että mitä suurempi on kokeen alussa testiliuokseen lisättyjen pieneliöiden pitoisuus, sitä vähäisempi on toistojen välinen vaihtelu. Rengastesteillä on voitu osoittaa, että eri laboratorioista saadut tulokset voivat vaihdella merkittävästi. Niiden aineiden osalta, joiden biohajoavuus on hyvä, on kuitenkin yleensä saatu varsin yhteneviä tuloksia.

I.5.2 **Kokeen hyväksyminen**

Koe hyväksytään, jos kemikaalin hajoamisarvojen ero biohajoavuuskäyrän tasanteen kohdalla (testin alussa tai 10-päiväisen jakson lopussa) toistojen ääriarvojen osalta on enintään 20 % ja jos vertailuaineen prosentuaalinen hajoaminen on saavuttanut hyvän biohajoavuuden tason 14 päivän kuluessa. Jos jompikumpi näistä ehdoista ei täyty, koe on toistettava. Koska menetelmien valinnanvara on vähäinen, pienet arvot eivät välttämättä tarkoita sitä, ettei aineen biohajoavuus luonnonympäristössä voisi olla hyvä. Pienet arvot osoittavat kuitenkin, että aineen biohajoavuuden määrittämiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Jos myrkyllisyystestissä, jossa käytetään sekä testattavaa ainetta että vertailukemikaalia, saadaan tulokseksi hajoaminen, joka 14 päivän kuluessa on DOC-pohjaisena enintään 35 % tai THOD- tai $ThCO_2$-pohjaisena enintään 25 %, voidaan olettaa, että testattavalla kemikaalilla on inhibitonsia ominaisuuksia (katso myös liitettä IV). Tällöin koesarja on toistettava, mahdollisesti pienempää kemikaalin pitoisuutta tai suurempaa siirrosaineen pitoisuutta käyttäen, ei kuitenkaan yli 30 mg:aa kuiva-ainetta litraa kohti.

I.6 YLEISIÄ MENETELMIÄ JA VALMISTELUJA

Taulukossa 2 on yhteenveto testiin sovellettavista yleisistä olosuhteista. Yksittäisten kokeiden laitteet ja olosuhteet kuvataan tarkemmin kokeiden omissa menetelmäkuvauksissa.

▼B

Taulukko 2

Testiolosuhteet

Koe	DOC Die-Away	CO_2-muodostus	Manometrinen respirometria	Muunneltu OECD-seulonta	Suljettu pullo	MITI (I)
Testattavan aineen pitoisuus						
mg/l			100		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20	10–40			
mg ThOD/1			50–100		5–10	
Siirrosaineen pitoisuus (soluja/l, likiarvo)	≤ 30 mg/l SS tai ≤ 100 ml jätevettä/l (10^7 – 10^8)			0,5 ml sekundaarista jätevettä/l (10^5)	≤ 5 ml jätevettä/l (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Epäorgaanisen liuoksen koostumus (mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 - 0,1				0,05 - 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					suositus: 7,0
Lämpötila	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Liuennut orgaaninen hiili ThOD = Teoreettinen hapentarve SS = Suspendoitunut kuiva-aine

I.6.1 **Laimennusvesi**

Laimennukseen käytetään ionivaihdettua tai tislattua vettä, jossa ei ole inhibitoorisia pitoisuuksia myrkyllisiä aineita (esimerkiksi Cu^{++}-ioneja). Vedessä saa olla enintään 10 % testattavasta materiaalista saatua orgaanista hiiltä. Erittäin puhtaan veden käyttö on oleellista suurten tausta-arvojen välttämiseksi. Veteen voi tulla saasteita luontaisista epäpuhtauksista, ioninvaihtohartseista tai bakteereista ja levistä liuenneista aineista. Koesarjoittain on käytettävä samaa vesierää, jolle on ensin tehtävä DOC-analyysi. Suljetun pullon koetta varten tätä tarkistusta ei tarvita, mutta veden hapenkulutuksen on oltava pieni.

▼B

I.6.2 **Epäorgaanisten ainesosien kantaliuos**

Testiliuokset valmistetaan epäorgaanisia aineita sisältävistä kantaliuoksista. Jäljempänä luetellut kantaliuokset soveltuvat (sopivasti laimennettuina) seuraaviin menetelmiin: DOC Die-Away, muunneltu OECD-seulonta, CO_2-muodostus, manometrinen respirometria, suljetun pullon koe.

Laimennuskertoimet ja MITI-kokeen epäorgaanisen liuoksen spesifinen valmistelutapa mainitaan kunkin kokeen otsikon alla.

Kantaliuokset:

Valmistetaan seuraavat kantaliuokset analyyttisen puhtaita reagensseja käyttäen:

a) Kaliumdivetyortofosfaattia, KH_2PO_4 8,50 g

Dikaliummonovetyortofosfaattia, K_2HPO_4 21,75 g

Dinatriummonovetyortofosfaattidihydraattia, $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ 33,40 g

Ammoniumkloridia, NH_4CI 0,50 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen. Liuoksen pH-arvon on oltava 7,4.

b) Kalsiumkloridia, $CaCl_2$ 27,50 g

tai kalsiumkloridididihydraattia, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 36,40 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

c) Magnesiumsulfaattiheptahydraattia, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 22,50 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

d) Rauta(III)kloridi-heksahydraattia, $FeCl_3 \times 6H_2O$ 0,25 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

Huomautus: Jotta liuosta ei tarvitsisi valmistaa välittömästi ennen käyttöä, siihen voidaan lisätä tippa väkevää suolahappoa tai 0,4 g EDTA:ta litraa kohti.

I.6.3 **Kemikaaleista valmistetut kantaliuokset**

Jos aineen liukoisuus on yli 1 g/1, 1–10 g testattavaa tai kontrollina käytettävää kemikaalia liuotetaan ionivaihdettuun veteen ja liuos laimennetaan yhden litran tilavuuteen. Muussa tapauksessa kantaliuos voidaan valmistaa epäorgaaniseen liuokseen tai kemikaalia voidaan lisätä suoraan epäorgaaniseen liuokseen. Huonosti liukenevien kemikaalien käsittely kuvataan liitteessä ITL MITI-kokeessa (menetelmä C.4-F) ei saa käyttää liuottimia tai emulgaattoreita.

▼B

I.6.4 **Siirrosaine**

Siirrosaine voi olla peräisin useasta lähteestä: aktivoidusta lietteestä, jätevedestä (ilman kloorikäsittelyä), pintavedestä, maa-aineksesta tai näiden seoksesta. Jos DOC Die-Away-, CO_2-muodostus- ja manometrinen respirometria -kokeissa käytetään aktiivilietettä, se on otettava käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta, johon syötetään pääosin kotitalouksista tulevaa jätevettä. Muista lähteistä otetun siirrosaineen on todettu aiheuttavan varsin epäyhtenäisiä tuloksia. Muunneltua OECD-seulontamenetelmää ja suljetun pullon menetelmää varten tarvitaan matalapitoista siirrosainetta ilman lieteflokkeja. Tällöin suositellaan talousveden esikäsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitokscsta saatua sekundaarista jätevettä. MITI-menetelmää varten tarvittava siirrosaine saadaan sekoittamalla eri lähteistä saatuja aineita (tarkempi kuvaus löytyy MITI-menetelmän otsikon alta).

I.6.4.1 *Siirrosaine aktiivilietteestä*

Aktiivilietenäyte otetaan sellaisenaan pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän vedenpuhdistamon tai laboratoriolaitoksen ilmastussäiliöstä. Tarvittaessa karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla hienon seulan läpi, minkä jälkeen liete pidetään aerobisena.

Lietteen annetaan asettua tai se sentrifugoidaan (esimerkiksi 1 100 g 10 minuutin ajan) karkeiden hiukkasten poiston jälkeen. Pintaliete hylätään. Lietettä voidaan pestä epäorgaanisessa liuoksessa. Väkevöity liete suspendoidaan epäorgaaniseen liuokseen (lopullinen pitoisuus 3–5 g kuiva-ainetta/1) ja säilötään ilmastettuna.

Lietteen on tultava tehokkaasti toimivasta, perinteisen tekniikan mukaisesta laitoksesta. Jos liete on otettava suurkuormituslaitoksesta tai jos epäillään lietteen sisältävän inhibiittoreita, liete on pestävä. Liete sekoitetaan hyvin, minkä jälkeen uudelleen suspendoitunut liete saa asettua tai se sentrifugoidaan. Pintaliete hylätään ja pesty liete suspendoidaan uudelleen uuteen epäorgaaniseen liuokseen. Menettelyä toistetaan, kunnes voidaan katsoa, ettei lietteessä ole enää ylimääräistä substraattia tai inhibiittoria.

Kun liete on täysin uudelleensuspendoitunut (tai jos lietettä käytetään sellaisenaan), näyte kerätään välittömästi ennen käyttöä. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus määritetään näytteestä.

Yksi vaihtoehto on lisäksi aktiivilietteen homogenointi (3–5 g suspendoitunutta kuiva-ainetta/l). Lietettä käsitellään mekaanisessa sekoittimessa keskinopeudella 2 minuutin ajan. Sekoitetun lietteen annetaan asettua 30 minuutin ajan (tai tarvittaessa kauemmin), ja neste dekantoidaan. Näin saatua nestettä käytetään siirrosaineena (pitoisuus: 10 ml/l epäorgaanista liuosta).

I.6.4.2 *Muita siirrosainelähteitä*

Siirrosainetta voidaan valmistaa myös pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän laitoksen tai laboratoriolaitoksen sekundaarisesta jätevedestä. Kerätään tuore näyte, joka pidetään aerobisena kuljetuksen ajan. Näytteen annetaan asettua tunnin ajan tai se suodatetaan karkean suodatinpaperin läpi. Näin saatua dekantoitua jätevettä tai suodosta säilytetään aerobisena, kunnes sitä tarvitaan. Tämäntyyppistä siirrosainetta voidaan käyttää enintään 100 ml liuoslitraa kohti.

▼B

Siirrosainetta voidaan ottaa myös pintavedestä. Esimerkiksi joen tai järven pintavedestä otetaan näyte, jota säilytetään aerobisena, kunnes sitä tarvitaan. Tarvittaessa siirrosaine voidaan väkevöidä suodattamalla tai sentrifugoimalla.

I.6.5 **Siirrosaineen esikäsittely**

Esikäsittelyn avulla siirrosaine voidaan sopeuttaa testiolosuhteisiin, mutta ei testattavaan kemikaaliin. Esikäsittelyssä aktiivilietettä ilmastetaan epäorgaanisessa liuoksessa tai sekundaarisessa jätevedessä 5–7 päivän ajan testilämpötilassa. Esikäsittelyn avulla on mahdollista saada tarkempia tuloksia, koska tausta-arvot jäävät pois. MITI-menetelmän avulla valmistettua siirrosainetta ei tarvitse esikäsitellä.

I.6.6 **Abioottiset tarkistukset**

Tarvittaessa testattavan aineen mahdollinen abioottinen hajoaminen on tarkistettava määrittämällä DOC:n poistuma, hapenotto tai hiilidioksidinmuodostus steriilistä vertailunäytteestä, jossa ei ole siirrosainetta. Sterilointi tehdään kalvosuodatuksella (0,2–0,45 μm) tai lisäämällä sopiva määrä soveltuvaa myrkyllistä ainetta. Jos käytetään kalvosuodatusta, näytteet on otettava aseptisesti steriiliyden varmistamiseksi. Ellei testattavan kemikaalin adsorptiomahdollisuutta ole voitu sulkea pois, testeihin, joissa mitataan biohajoamista DOC:n poistuman avulla (etenkin käytettäessä aktiivilietettä siirrosaineena), on sisällytettävä abioottinen (siirrostettu ja myrkytetty) vertailunäyte.

I.6.7 **Pullojen määrä**

Tyypillisessä kokeessa käytettävä pullomäärä mainitaan kunkin kokeen otsikon alla.

Seuraavia pullotyyppejä voidaan käyttää:

— Testisuspensio: pullossa testattavaa ainetta ja siirrosainetta

— Siirrosaineen taustanäyte: pullossa pelkkää siirrosainetta

— Menetelmän vertailunäyte: pullossa vertailu- ja siirrosainetta

— Steriili abioottinen vertailunäyte: steriili pullo, jossa on testattavaa ainetta

— Adsorptiotarkistus: pullossa testattavaa ainetta, siirrosainetta ja steriloivaa ainetta

— Myrkyllisyyskoe: pullossa testattavaa ainetta, vertailuainetta ja siirrosainetta.

Testisuspension ja siirrosaineen taustanäytteen määritykset on ehdottomasti tehtävä rinnan. On suositeltavaa tehdä myös muiden pullojen määritykset rinnan.

Tämä ei ehkä aina ole mahdollista. On tärkeää, että otetaan riittävä määrä näytteitä tai lukemia, jotta 10-päiväisen jakson aikana syntyvä prosentuaalinen poistuma voidaan määrittää.

▼B

I.7 TIEDOT JA ARVIOINTI

D_t-arvon laskennassa käytetään prosentuaalista hajoamista, parametrin kaksoismittausten keskiarvoja molempien testisäiliöiden osalta ja siirrosaineen taustanäytettä. Laskentaan käytettävät suureyhtälöt mainitaan jäljempänä kunkin kokeen yhteydessä. Hajoaminen esitetään graafisessa muodossa (10-päiväinen jakso merkitään). Lasketaan ja raportoidaan saavutettu prosentuaalinen poistuma 10-päiväisen jakson lopussa samoin kuin käyrän tasanteen arvo tai arvo kokeen päätyttyä (valitaan sopivampi arvo).

Respirometrisissä testeissä typpeä sisältävät yhdisteet voivat häiritä hapenottoa nitrifikaation vuoksi (katso liitteitä II jaV).

I.7.1 **DOC-määrityksen avulla mitattu hajoaminen**

Lasketaan jokaisen näytteenoton ajankohdan prosentuaalisen hajonnan arvo D_t kutakin testattavaa ainetta kohti DOC-kaksoismittausten keskiarvoja käyttäen (kaksoismittausten avulla voidaan vahvistaa kokeen hyväksyttävyys — katso kohtaa 1,5.2). D_t-arvo lasketaan seuraavan suureyhtälön avulla:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

jossa

D_t = prosentuaalinen hajoaminen ajankohtana t,

C_o = siirrostetun, testiainetta sisältävän viljelmän keskimääräinen DOC-pitoisuus kokeen alussa (mg DOC/l),

C_t = siirrostetun, testiainetta sisältävän viljelmän keskimääräinen DOC-pitoisuus hetkellä t (mg DOC/l),

C_{bo} = siirrostetun, taustanäytteenä käytettävän epäorgaanisen liuoksen keskimääräinen DOC-pitoisuus kokeen alussa (mg DOC/l)

C_{bt} = siirrostetun, taustanäytteenä käytettävän epäorgaanisen liuoksen keskimääräinen DOC-pitoisuus hetkellä t (mg DOC/l).

Kaikki pitoisuudet mitataan kokeellisesti.

I.7.2 **Spesifisen analyysin avulla mitattava hajoaminen**

Jos käytettävissä on spesifisiä analyyttisiä tietoja primaarinen biohajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

jossa:

D_t = prosentuaalinen hajonta hetkellä t (yleensä 28 päivää)

S_a = testattavan aineen jäännösmäärä (mg) siirrostetussa liuoksessa kokeen lopussa

S_b = testattavan aineen jäännösmäärä (mg) taustanäytteessä (vettä/liuosta, johon on lisätty vain testattavaa ainetta)

▼B

I.7.3 **Abioottinen hajoaminen**

Jos käytetään abioottista, steriiliä vertailunäytettä, prosentuaalinen abioottinen hajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$\text{prosentuaalinen abioottinen hajoaminen} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

jossa

$C_{s(o)}$ = steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus päivänä 0 (kokeen alussa)

$C_{s(t)}$ = steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus päivänä t

I.8 RAPORTOINTI

Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

— testattavat aineet ja vertailuaineet sekä niiden puhtausluokka,

— testiolosuhteet,

— siirrosaineen laatu ja ottopaikka (-paikat), pitoisuus ja mahdolliset esikäsittelyt,

— jäteveden teollisuusjätteiden osuus ja laatu (jos tunnetaan),

— kokeen kesto ja lämpötila,

— mahdollisten huonosti liukenevien käsittely,

— käytetty testimenetelmä; kaikista muutoksista on annettava tieteelliset perustelut ja selvitykset,

— tietolomake,

— mahdollisesti havaitut inhibiitioilmiöt,

— mahdollisesti havaittu abioottinen hajoaminen,

— spesifiset kemialliset analyysitiedot (jos käytettävissä),

— välituotteiden analyyttiset tiedot (jos käytettävissä),

— käyrät, jotka esittävät testattavan aineen ja vertailuaineiden prosentuaalisen hajoamisen ajan funktiona; lepovaihe, hajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja kaltevuus on merkittävä selvästi (liite I). Jos testi täyttää testikriteent, käyrässä voidaan käyttää testattavan aineen prosentuaalisen hajoamisen keskiarvoa,

— prosentuaalinen poistuma 10-päiväisen jakson jälkeen ja käyrän tasanteella tai kokeen lopussa.

OSA II. **DOC DIE-AWAY-KOE** (menetelmä C.4-A)

II. 1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattu tilavuus siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10–40 mg DOC/l) ainoana nimellisenä hiililähteenä, ilmastetaan heikossa valossa tai pimeässä pitäen yllä lämpötilaa 22 ± 2 °C.

▼B

Hajoamista seurataan usein tehtävien DOC-analyysien avulla 28 päivän jakson aikana. Hajoamisaste lasketaan ilmaisemalla poistuneen DOC:n (siirrostetun taustanäytteen arvolla korjattuna) prosenttiosuus alkupitoisuudesta. Primaarisen biohajoamisen aste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehdyn kemiallisen analyysin avulla.

II.2 MENETELMÄKUVAUS

II.2.1 **Laite**

a) erlenmeyerpulloja (tilavuudeltaan esimerkiksi 250 ml–2 1) DOC-analyysin edellyttämän tilavuuden mukaan,

b) ravistuskone pulloja varten (koneessa on oltava automaattinen lämpötilan säätö tai sitä on käytettävä lämpötilasäädetyssä huoneessa, ja sen on pystyttävä ylläpitämään aerobisia olosuhteita kaikissa pulloissa),

c) sopivin kalvoin varustettu suodatuslaite,

d) DOC-analysaattori,

e) liuenneen hapen määrityslaite,

f) sentrifugi.

II.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

II.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

II.2.4 **Pullojen valmistelu**

Pannaan epäorgaanista liuosta 2 litran erlenmeyerpulloihin esimerkiksi 800 ml:n annoksina. Riittävä määrä testattavan aineen ja vertailuaineen kantaliuosta lisätään eri pulloihin siten, että saadaan kemikaalipitoisuus, joka vastaa pitoisuutta 10–40 ml DOC/l. Tarkistetaan pH ja säädetään se tarvittaessa arvoon 7,4. Pullot siirrostetaan aktiivilietteellä tai muulla siirrosaineella (katso kohtaa I.6.4) siten, että lopullinen pitoisuus on enintään 30 mg suspendoitunutta kuiva-ainetta/l. Valmistetaan myös siirrosaineen vertailunäytteet epäorgaaniseen liuokseen, mutta ilman testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa testattavan kemikaalin mahdolliset inhibitooriset ominaisuudet on tarkistettava siirrostamalla yhteen pulloista epäorgaanista liuosta, jossa on vertailukelpoiset pitoisuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa valmistetaan myös erillinen steriili pullo, jonka avulla tarkistetaan testattavan kemikaalin abioottinen hajoaminen käyttäen kemikaalin liuosta, johon ei ole lisätty siirrosainetta (katso kohtaa I.6.6).

▼B

Jos epäillään, että testattava kemikaali adsorboituu merkittävissä määrin esimerkiksi lasiin tai lietteeseen, voidaan tehdä alustava kemikaalin adsorption todennäköisen laajuuden määritys, jonka perusteella voidaan arvioida testimenetelmän soveltuvuutta tälle kemikaalille (katso taulukkoa 1). Alustavaa määritystä varten pulloon lisätään testattavaa ainetta, siirrosainetta ja sterilointiainetta.

Kaikkien pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella yhden litran tilavuuteen. Sekoituksen jälkeen jokaisesta pullosta otetaan näyte alkuperäisen DOC-pitoisuuden määritystä varten (katso liitettä II.4). Pullojen suut peitetään esimerkiksi alumiinifoliolla siten, että ilma pääsee vapaasti vaihtumaan pullon ja ympäristön välillä. Tämän jälkeen pullot pannaan ravistuskoneeseen kokeen aloittamista varten.

II.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Adsorption vertailunäyte

Pullo 8: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

II.2.6 **Testin suorittaminen**

Testin aikana kunkin pullon DOC-pitoisuus määritetään kahdesti tietyin välein. Määritykset on tehtävä riittävän usein, jotta voidaan määrittää 10-päiväisen jakson alku ja prosentuaalinen poistuma tämän jakson lopussa. Määrityksiä varten otetaan pienin mahdollinen määrä testisuspensiota.

Ennen näytteenottoa pulloista haihtunut vesimäärä on kompensoitava lisäämällä pulloihin tarpeellinen määrä laimennusvettä (I.6.1). Pullojen sisältö sekoitetaan huolellisesti varmistaen, että pullojen seinämiin kiinnittynyt aines liukenee tai suspendoituu ennen näytteenottoa. Näytteet kalvosuodatetaan tai sentnfugoidaan heti näytteenoton jälkeen (katso liitettä II.4). Ellei näytteitä analysoida samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2–4 ^{o}C:ssa enintään 48 tuntia tai alle –18 ^{o}C:ssa, jos ne joutuvat odottamaan tätä pitempään.

II.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

II.3.1 **Tulosten käsittely**

Annetun hetken t prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdan I.7.1 mukaan (DOC-määritys) ja vaihtoehtoisesti kohdan I.7.2 mukaan (spesifinen analyysi).

Tulokset kirjataan jäljempänä kuvattavaan tietolomakkeeseen.

▼B

II.3.2 **Tulosten hyväksyttävyys**

Katso kohtaa I.5.2.

II.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

II.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomakkeesta.

DOC DIE-AWAY -KOE

1 **LABORATORIO**

2 **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3 **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, t_o: mg/l kemikaalina

4 **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5 **HIILIMÄÄRITYKSET**

Hiilianalysaattori:

	Pullon numero		DOC-arvo n päivän jälkeen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta	1	a_1					
		a_2					
		a:n keskiarvo $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b:n keskiarvo $C_{b(t)}$					

▼B

	Pullon numero		DOC-arvo n päivän jälkeen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Siirrosaineen taustanäyte ilman testattavaa kemikaalia	3	c_1					
		c_2					
		c:n keskiarvo $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d:n keskiarvo $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **LÄHDETIETOJEN ARVIOINTI**

Pullon numero		Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskiarvo (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

7. **ABIOOTTINEN TARKISTUS** (valinnainen)

	Aika (päivää)	
	0	t
Steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus (mg/l)	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{Prosentuaalinen abioottinen hajoavuus} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPESIFINEN KEMIALLINEN ANALYYSI** (valinnainen)

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa (mg/l)	Prosentuaalinen primaarinen hajoaminen
Steriili vertailunäyte	s_b	

▼B

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa (mg/l)	Prosentuaalinen primaarinen hajoaminen
Siirrostettu testiliuos	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

OSA III **MUUNNELTU OECD-SEULONTAKOE** (menetelmä C.4-B)

III.1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattuun tilavuuteen epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10–40 mg DOC/l) ainoana nimellisenä hiililähteenä, siirrostetaan 0,5 ml jätevettä liuoslitraa kohti. Seos ilmastetaan heikossa valossa tai pimeässä pitäen yllä lämpötilaa 22 ± 2 °C.

Hajoamista seurataan usein tehtävien DOC-analyysien avulla 28 päivän jakson aikana. Hajoamisaste lasketaan ilmaisemalla poistuneen DOC:n (siirrostetun taustanäytteen arvolla korjattuna) prosenttiosuus alkupitoisuudesta. Primaarisen biohajoamisen aste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehtävän kemiallisen analyysin avulla.

III.2 MENETELMÄKUVAUS

III.2.1 Laite

a) erlenmeyerpulloja (tilavuudeltaan esimerkiksi 250 ml–21) DOC-analyysin edellyttämän tilavuuden mukaan,

b) ravistuskone pulloja varten (koneessa on oltava automaattinen lämpötilan säätö tai sitä on käytettävä lämpötilasäädetyssä huoneessa, ja sen on pystyttävä ylläpitämään aerobisia olosuhteita kaikissa pulloissa),

c) sopivin kalvoin varustettu suodatuslaite,

d) DOC-analysaattori,

e) liuenneen hapen määrityslaite,

f) sentrifugi.

III.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 80 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

Tässä menetelmässä siirrostukseen käytetään vain 0,5 ml jätevettä/l, joten liuosta on eräissä tapauksissa rikastettava hivenaineilla ja kasvutekijöillä. Tämä tehdään lisäämällä liuokseen jokaista lopullista liuoslitraa kohti 1 ml kutakin seuraavaa liuosta:

▼B

Hivenaineliuos:

Mangaanisulfaattitetrahydraatti, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Boorihappoa, H_3BO_3	57,2 mg
Sinkkisulfaattiheptahydraatti, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdaatti $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Rautakelaatti ($FeCl_3$-etyleenidiamiinitetraetikkahappo)	100,0 mg

Liuotetaan laimennusveteen ja laimennetaan 1 000 ml:n tilavuuteen.

Vitamiiniliuos:

Hiivauute	15,0 mg

Hiivauute liuotetaan 100 ml:aan vettä. Liuos steriloidaan kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2 mikronia, tai käytetään sellaisenaan.

III.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteenä käytetään pääosin kotitalousjätevesiä puhdistavasta käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta saatavaa sekundaarista jätevettä. (Katso kohtia 1.6.4.2 ja 1.6.5.)

Käytetään 0,5 ml siirrosainetta epäorgaanisen liuoksen litraa kohti.

III.2.4 **Pullojen valmistelu**

Epäorgaanista liuosta pannaan 2 litran erlenmeyerpulloihin esimerkiksi 800 ml:n annoksina. Riittävä määrä testattavan aineen ja vertailuaineen kantaliuosta lisätään eri pulloihin siten, että saadaan kemikaalipitoisuus, joka vastaa pitoisuutta 10–40 ml DOC/l. Tarkistetaan pH ja säädetään se tarvittaessa arvoon 7,4. Pullot siirrostetaan 0,5 ml:lla jätevettä pulloissa olevaa liuoslitraa kohti (katso kohtaa I.6.4.2). Valmistetaan myös siirrosaineen vertailunäytteet epäorgaaniseen liuokseen, mutta ilman testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa testattavan kemikaalin mahdollisten inhibitooriset ominaisuudet on tarkistettava siirrostamalla yhteen pulloista epäorgaanista liuosta, jossa on vertailukelpoiset pitoisuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia.

Tarvittaessa valmistetaan myös erillinen steriili pullo, jonka avulla tarkistetaan testattavan kemikaalin abioottinen hajoaminen. Tällöin käytetään kemikaalin liuosta, johon ei ole lisätty siirrosainetta (katso kohtaa I.6.6).

Jos epäillään, että testattava kemikaali adsorboituu merkittävissä määrin esimerkiksi lasiin tai lietteeseen, voidaan tehdä alustava kemikaalin adsorption todennäköisen laajuuden määritys, jonka perusteella voidaan arvioida testimenetelmän soveltuvuutta tälle kemikaalille (katso taulukkoa 1). Alustavaa määritystä varten pulloon lisätään testattavaa ainetta, siirrosainetta ja sterilointiainetta.

Kaikkien pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella yhden litran tilavuuteen. Sekoituksen jälkeen jokaisesta pullosta otetaan näyte alkuperäisen DOC-pitoisuuden määritystä varten (katso liitettä II.4). Pullojen suut peitetään esimerkiksi alumiinifoliolla siten, että ilma pääsee vapaasti vaihtumaan pullon ja ympäristön välillä. Tämän jälkeen pullot pannaan ravistuskoneeseen kokeen aloittamista varten.

▼B

III.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Adsorption vertailunäyte

Pullo 8: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

III.2.6 **Testin suorittaminen**

Testin aikana kunkin pullon DOC-pitoisuus määritetään kahdesti tietyin välein. Määritykset on tehtävä riittävän usein, jotta voidaan määrittää 10-päiväisen jakson alku ja prosentuaalinen poistuma tämän jakson lopussa. Määrityksiä varten otetaan pienin mahdollinen määrä testisuspensiota.

Ennen näytteenottoa pulloista haihtunut vesimäärä on kompensoitava lisäämällä pulloihin tarpeellinen määrä laimennusvettä (I.6.1). Pullojen sisältö sekoitetaan huolellisesti varmistaen, että pullojen seinämiin kiinnittynyt aines liukenee tai suspendoituu ennen näytteenottoa. Näytteet kalvosuodatetaan tai sentrifugoidaan heti näytteenoton jälkeen (katso liitettä II.4). Ellei näytteitä analysoida samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2–4 °C:ssa enintään 48 tuntia tai alle –18 °C:ssa, jos ne joutuvat odottamaan tätä pitempään.

III.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

III.3.1 **Tulosten käsittely**

Annetun ajankohdan t prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdan I.7.1 mukaan (DOC-määritys) ja vaihtoehtoisesti kohdan I.7.2 mukaan (spesifinen analyysi).

Tulokset kirjataan jäljempänä kuvattavaan tietolomakkeeseen.

III.3.2 Tulosten hyväksyttävyys

Katso kohtaa I.5.2.

III.3.3 Raportointi

Katso kohtaa I.8.

III.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomakkeesta.

MUUNNELTU OECD-SEULONTAKOE

1 **LABORATORIO**

2 **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

▼B

3 **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, t_0: mg/l kemikaalina

4 **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5 HIILIMÄÄRITYKSET

Hiilianalysaattori:

	Pullon numero		DOC-arvo n päivän jälkeen mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta	1	a_1					
		a_2					
		a:n keskiarvo $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b:n keskiarvo $C_{b(t)}$					
Siirrosaineen taustanäyte ilman testattavaa kemikaalia	3	c_1					
		c_2					
		c:n keskiarvo $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d:n keskiarvo $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **LÄHDETIETOJEN ARVIOINTI**

Pullon numero		Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Pullon numero		Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Keskiarvo (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

7. **ABIOOTTINEN TARKISTUS** (valinnainen)

	Aika (päivää)	
	0	t
Steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus (mg/l)	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\text{Prosentuaalinen abioottinen hajoavuus} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPESIFINEN KEMIALLINEN ANALYYSI** (valinnainen)

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa (mg/l)	Prosentuaalinen primaarinen hajoaminen
Steriili vertailunäyte	s_b	
Siirrostettu testiliuos	s_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

OSA IV. HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUMISKOE (menetelmä C.4-C)

IV.1 MENETELMÄN PERIAATE

Mitattu tilavuus siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa ainetta (10–20 mg DOC tai TOC/1) ainoana nimellisenä hiililähteenä, ilmastetaan johtamalla liuoksen läpi hiilidioksiditonta ilmaa, jonka virtausta säädetään. Ilmastus tehdään heikossa valossa tai pimeässä. Hajoamista seurataan 28 päivän ajan määrittämällä muodostuvan hiilidioksidin määrä. Tätä varten hiilidioksidi kerätään barium- tai natriumhydroksidiin, ja hiilidioksidimäärä mitataan titraamalla jäännöshydroksidi tai mittaamalla epäorgaanisen hiilen määrä. Testattavasta kemikaalista muodostetun hiilidioksidin määrä (korjattuna siirrostetun taustanäytteen arvolla) ilmaistaan $ThCO_2$-prosenttiarvona. Biohajoamisaste voidaan laskea myös inkubaation alussa ja lopussa tehtävän DOC-analyysin avulla.

▼B

IV.2 MENETELMÄKUVAUS

IV.2.1 **Laite**

a) pulloja (tilavuudeltaan 2–5 litraa), jotka on varustettu lähes pullon pohjaan ulottuvalla ilmastusletkulla ja ulostulolla,

b) magneettisia sekoittimia (kun tutkitaan huonosti liukenevia kemikaaleja),

c) kaasuabsorptiopulloja,

d) ilmanvirtauksen säätö- ja mittauslaite,

e) kaasunpesulaite, jonka avulla saadaan hiilidioksiditonta ilmaa (vaihtoehtoisesti voidaan käyttää painepulloista otetun hiilidioksidittoman hapen ja hiilidioksidittoman typen seosta suhteessa 20 % happea ja 80 % typpeä),

f) hiilidioksidin määrityslaite, jonka toiminta perustuu titraukseen tai epäorgaanisen hiilen analysointiin,

g) kalvosuodatin (valinnainen),

h) DOC-analysaattori (valinnainen).

IV.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

IV.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, 1.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

IV.2.4 **Pullojen valmistelu**

Seuraavassa kappaleessa kuvattavat tilavuudet ja painot koskevat 5 l:n pulloja, joissa on 3 1 suspensiota. Myös tätä pienempiä tilavuuksia voidaan käyttää arvoja korjaamalla, edellyttäen, että muodostunut hiilidioksidi voidaan mitata riittävän tarkasti.

2 400 ml epäorgaanista liuosta johdetaan 5 l:n pulloihin. Pulloihin lisätään sopiva määrä valmistettua aktiivilietettä (katso kohtia I.6.4 ja I.6.5), niin että lopullisessa 3 l:n liuoksessa on enintään 30 mg suspendoitunutta kuiva-ainetta litraa kohti. Vaihtoehtoisesti voidaan ensin laimentaa valmistettu liete suspensioksi (500–1 000 mg/l epäorgaanista liuosta) ja lisätä tämän jälkeen alikvootti 5 l;n pulloon siten, että lopullinen pitoisuus on 30 mg/l. Vaihtoehtoinen menetelmä on tarkempi. Myös muita siirroslähteitä voidaan käyttää (katso kohtaa I.6.4.2).

Siirrostetuista seoksista poistetaan hiilidioksidi ilmastamalla niitä yön yli hiilidioksidittomalla ilmalla.

▼B

Testattavaa ainetta ja vertailuainetta lisätään pulloihin erikseen kantaliuoksen tunnettuna tilavuutena (jokaista pitoisuutta kohti tarvitaan kaksi pulloa), niin että pullojen sisällön DOC- tai TOC-pitoisuus on 10–20 mg/l. Muutama pullo tarvitaan siirrosainekontrolleiksi, joten niihin ei lisätä kemikaaleja. Huonosti liukenevat aineet lisätään suoraan pulloihin tunnettuna painona tai tilavuutena (katso liitettä III).

Yhden pullon avulla voidaan tarvittaessa selvittää testattavan kemikaalin inhibitoorisia ominaisuuksia. Tähän pulloon lisätään testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia, niin että niiden pitoisuudet ovat samat kuin muissa pulloissa.

Tarvittaessa selvitetään steriilin pullon ja siirrostamattoman kemikaaliliuoksen avulla, onko testattava kemikaali abioottisesti hajoavaa (katso kohtaa I.6.6). Sterilointi tehdään lisäämällä liuokseen myrkyllistä ainetta sopivana pitoisuutena.

Kaikkien pullojen suspensioiden tilavuus säädetään 3 l:ksi lisäämällä pulloihin epäorgaanista liuosta, joka on ilmastettu hiilidioksidittomalla ilmalla. Vaihtoehtoisesti pulloista voidaan ottaa näytteet DOC-analyysiä (katso liitettä II.4) tai spesifistä analyysiä varten. Kunkin pullon ilmaventtiiliin liitetään absorptiopullo.

Jos käytetään bariumhydroksidia, jokaiseen 5 l:n testipulloon liitetään sarjaan kolme absorptiopulloa, joissa kaikissa on 100 ml 0,0125-molaarista bariumhydroksidia. Liuoksessa ei saa olla saostunutta sulfaattia tai karbonaattia, ja liuoksen väkevyys on määritettävä välittömästi ennen liuoksen käyttöä. Jos käytetään natriumhydroksidia, jokaiseen testipulloon liitetään kaksi loukkua. Toisen loukun avulla tarkistetaan, että kaikki hiilidioksidi on imeytynyt ensimmäiseen loukkuun. Imeytyspulloina käytetään pullotyyppiä, jossa on seerumipullon suljin, Jokaiseen pulloon lisätään 200 ml 0,05-molaarista natriumhydroksidia. Tämä määrä riittää absorboimaan kaiken hiilidioksidin, joka syntyy testattavan kemikaalin hajoamistuotteena. Natriumhydroksidiliuos sisältää aina — myös vastavalmistettuna — pienen määrän karbonaattia, joka kompensoidaan vähentämällä taustanäytteen karbonaatin määrää.

IV.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili abioottinen vertailunäyte

Pullo 7: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

IV.2.6 **Testin suorittaminen**

Testi aloitetaan johtamalla suspensioiden läpi hiilidioksidittomia ilmakuplia virtausnopeudella 30–100 ml/ minuutti. Hiilidioksidiabsorbentista otetaan säännöllisin välein näytteitä suspensioiden hiilidioksidipitoisuuden analyysiä varten. Ensimmäisen kymmenen päivän jakson näytteenottoväliksi suositellaan kahta tai kolmea päivää. Tämän jälkeen näytteitä otetaan joka viides päivä 28. päivään asti 10-päiväisen jakson löytämiseksi.

▼B

Päivänä 28 otetaan näytteet mahdollista DOC-analyysiä tai spesifistä analyysiä varten, mitataan suspensioiden pH ja lisätään jokaiseen pulloon 1 ml väkevää suolahappoa. Tämän jälkeen hiilidioksidi poistetaan testisuspensioista yön yli jatkuvalla pullojen ilmastuksella, Viimeinen hiilidioksidianalyysi tehdään 29. päivänä.

Hiilidioksidianalyysipäivinä pulloa lähinnä oleva bariumhydroksidi-imeytin irrotetaan pullosta ja hydroksidiliuos titrataan 0,05-molaarisella suolahapolla. Indikaattorina käytetään fenoliftaleiinia. Sarjan jäljellä olevat imeyttimet siirretään lähemmäksi testipulloa, ja sarjan loppuun lisätään uusi, 100 ml tuoretta 0,0125-molaarista bariumhydroksidia sisältävä imeytin. Titrauksia tehdään tarvittaessa (jos esimerkiksi ensimmäiseen loukkuun kertyy paljon sakkaa, titraus on tehtävä ennen kuin sakkaa alkaa kertyä toiseen loukkuun) — kuitenkin vähintään viikoittain. Jos absorbenttina käytetään natriumhydroksidia, ruiskuun imetään pieni määrä natriumhydroksidiliuosta (tarvittava määrä vaihtelee käytettävän hiilianalysaattorin mukaan) lähinnä testipulloa olevasta imeyttimestä. Jos muodostunut hiilidioksidi halutaan analysoida heti, näyte ruiskutetaan hiilianalysaattorin epäorgaaniseen hiileen.

Toisen loukun sisältö analysoidaan vain testin lopussa, jotta hiilidioksidin mahdollisen läpipääsyn aiheuttama virhe voitaisiin korjata.

IV.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

IV.3.1 **Tulosten käsittely**

Imeyttimeen jäänyt hiilidioksidimäärä lasketaan titrauksen jälkeen seuraavan suureyhtälön avulla:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

jossa

V = imeyttimen 100 ml:n sisällön titraukseen käytetty suolahappo (ml)

C_B = bariumhydroksidiliuoksen väkevyys (M)

C_A = suolahappohuoksen väkevyys (M).

Jos C_B = 0,0125 M, C_A = 0,05 M ja 100 ml:n puhtaan bariumhydroksidiliuoksen titraustulokseksi saadaan 50 ml, hiilidioksidin paino voidaan laskea seuraavasti:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrattu} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Tässä tapauksessa titraukseen käytetty suolahappotilavuus voidaan muuntaa hiilidioksidin painoksi käyttämällä kerrointa 1,1.

Titrausarvojen avulla lasketaan pelkän siirrosaineen ja siirrosaineen ja testattavan kemikaalin seoksen muodostaman hiilidioksidin painot. Näiden painojen ero vastaa pelkän testattavan kemikaalin muodostaman hiilidioksidin painoa.

Jos esimerkiksi pelkän siirrosaineen titrauksesta saadaan tulokseksi 48 ml ja siirrosaineen sekä testattavan kemikaalin seoksen titrauksesta 45 ml, määrät ovat seuraavat:

Siirrosaineen CO_2 = 1,1 x (50 - 48) = 2,2 mg.

▼B

Siirrosaineen ja testattavan kemikaalin seoksen CO_2 = 1,1 x (50 - 45) = 5,5 mg.

Täten testattavan kemikaalin muodostama CO_2 = 3,3 mg.

Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön avulla:

$$\text{hajoaminen } (\%) = \frac{\text{muodostunut } CO_2 \text{ (mg)} \times 100}{ThCO_2 \times \text{lisätty määrä testattavaa kemikaalia (mg)}},$$

tai

$$\text{hajoaminen } (\%) = \frac{\text{muodostunut } CO_2 \text{ (mg)} \times 100}{\text{lisätty TOC} - \text{määrä} \times 3{,}67}$$

jossa 3,67 on hiili-hiilidioksidimuunnoskerroin.

Minkä tahansa aikavälin jälkeinen prosentuaalinen hajoaminen saadaan kumuloimalla kunkin päivän laskettujen $ThCO_2$-arvojen prosenttiluvut mittaushetkeen asti.

Natriumhydroksidiabsorbenteille muodostetun hiilidioksidin määrä voidaan laskea milligrammoina epäorgaanista hiiltä (IC) kertomalla absorbentin IC-pitoisuus absorbentin tilavuudella.

Prosentuaalinen hajoaminen voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThCO_2 - \% = \frac{\text{testipullon mg IC} - \text{vertailunäytten mg IC}}{\text{testattavan kemikaalin mukana lisätty mg TOC}} \times 100$$

DOC-poistumat voidaan haluttaessa laskea kohdan I.7 mukaan. Tulokset kirjataan tietolomakkeelle yhdessä muiden tulosten kanssa.

IV.3.2 **Tulosten hyväksyttävyys**

Testin alussa epäorgaanisessa liuoksessa olevan kemikaalisuspension IC-pitoisuus saa olla enintään 5 % TC-arvosta, ja testin lopussa siirrostuksen taustahuoksen hiilidioksidin kokonaismuodoslus saa yleensä olla enintään 40 mg/l. Jos tulokseksi saadaan 70 mg CO_2/l ylittäviä arvoja, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti.

Katso myös kohtaa I.5.2.

IV.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

IV.4 TIETOLOMAKE

Ohessa on esimerkki tietolomakkeesta.

HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUMISKOE

1. **LABORATORIO**

2. **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3. **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

▼B

Liuoksen alkupitoisuus, t_0: mg/l kemikaalina

Pulloon lisätty kokonaismäärä hiiltä (C): mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittely (jos esikäsittely on tehty):

Reaktioseoksen pitoisuus suspendoitunutta kuiva-ainetta: mg/l

5. **HIILIDIOKSIDIN MUODOSTUS JA HAJOAVUUS**

Menetelmä: $Ba(OH)_2$/NaOH/muu

Aika (päivä)	Testiliuoksen muodostunut CO_2 (mg)		Taustanäytteen muodostunut CO_2 (mg)		Kumulatiivinen muodostunut CO_2 (testiliuos vähennettynä taustaliuoksen keskiarvolla)		$ThCO_2$ kumulatiivinen $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	keskiarvo	3 / 4	keskiarvo	1	2	1	2	keskiarvo
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6. **HIILIANALYYSI** (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Aika (päivä)	Taustanäyte mg/l	Testattava kemikaali mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) tai inkubaation lopussa

▼B

$$\text{DOC} - \text{poistuma } (\%) = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOOTTINEN HAJOAMINEN** (valinnainen)

$$\text{Abioottinen hajoaminen } (\%) = \frac{\text{Steriilin pullon } CO_2\text{muodostus 28. päivän jälkeen (mg)}}{ThCO_2(\text{mg})} \times 100$$

OSA V **MANOMETRINEN RESPIROMETRIAKOE** (menetelmä C.4-D)

V.1 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Mitattua tilavuutta siirrostettua epäorgaanista liuosta, jossa on tunnettu pitoisuus testattavaa kemikaalia (100 mg kemikaalia/l testattavaa ainetta — ThOD-pitoisuus vähintään 50–100 mg/l) ainoana nimellisenä orgaanisena hiililähteenä, ravistetaan suljetussa pullossa vakiolämpötilassa (vaihteluväli enintään ± 1 °C) enintään 28 päivän ajan. Hapenkulutus määritetään joko mittaamalla (elektrolyyttisesti muodostettu) happimäärä, joka tarvitaan pitämään respirometripullon kaasun tilavuus vakiona, tai mittaamalla laitteen tilavuuden tai paineen muutos (tai molempien yhdistelmä). Muodostunut hiilidioksidi imeytetään kaliumhydroksidiliuokseen tai muuhun sopivaan absorbenttiin. Testattavan kemikaalin hapenkulutus (korjattuna pelkän siirrosaineen hapenkulutuksella, joka mitataan rinnakkaisen taustanäytteen avulla) ilmaistaan ThOD- tai COD-prosenttiarvona. Haluttaessa voidaan laskea myös primaarinen biohajonta inkubaation alussa ja lopussa tehtävän spesifisen analyysin tuloksien avulla tai määrittää lopullinen biohajonta DOC-analyysin avulla.

V.2 MENETELMÄKUVAUS

V.2.1 **Laite**

a) tarkoitukseen sopiva respirometri,

b) lämpötilan säätöjärjestelmä (enintään ± 1 °C:n vaihteluväli),

c) kalvosuodatin (valinnainen),

d) hiilisuodatin (valinnainen).

V.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

10 ml a-liuosta sekoitetaan 800 ml:aan laimennusvettä, lisätään 1 ml b-, c- ja d-liuosta sekä laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

V.2.3 **Siirrosaineen valmistelu ja esikäsittely**

Siirrosaineen lähteinä voidaan käyttää aktiivilietettä, jätevettä, pintavettä, maata tai näiden sekoitusta.

Katso kohtia I.6.4, I.6.4.1,1.6.4.2 ja I.6.5.

V.2.4 **Pullojen valmistelu**

Valmistetaan erilliset erät testi- ja kontrolliliuosta liuottamalla testattavaa ainetta ja vertailuainetta epäorgaaniseen liuokseen (100 mg kemikaalia/l — vähintään 50–100 mg ThOD/1) kantaliuoksia käyttäen.

▼B

ThOD-arvo lasketaan käyttäen oletuksena ammoniumsuolojen muodostusta, ellei odotettavissa ole nitrifikaatiota, missä tapauksessa laskelmien on perustuttava nitraattien muodostukseen (katso liitettä II.2).

Määritetään pH-arvot ja säädetään ne tarvittaessa

arvoon 7,4 ± 0,2. Huonosti liukenevat aineet lisätään myöhemmin (katso jäljempänä).

Testattavan kemikaalin myrkyllisyysmäärityksissä epäorgaaniseen liuokseen on valmistettava erillinen liuos, jossa on testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia samoina pitoisuuksina kuin yksittäisissä liuoksissa.

Jos tarvitaan hapen fysikaalis-kemiallisen kulutuksen mittauksia, valmistetaan liuos, jossa on testattavaa kemikaalia pitoisuutena, joka vastaa arvoa 100 mg ThOD/l. Liuos steriloidaan lisäämällä siihen sopivaa myrkyllistä ainetta (katso kohtaa I.6.6).

Lisätään tarvittavat tilavuudet testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia vähintään kahteen pullosarjaan. Tarvittaessa lisätään erillisiin pulloihin pelkkää epäorgaanista liuosta (siirrostarkistusta varten), testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin seosliuosta sekä steriiliä liuosta.

Jos testattava kemikaali on huonosti liukenevaa, se voidaan lisätä tässä vaiheessa tunnettuna painomääränä tai sitä voidaan käsitellä liitteessä III kuvatulla tavalla. Hiilidioksidi-imeyttimiin lisätään kaliumhydroksidia, kalkkisoodapellettejä tai muuta absorbenttia.

V.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Pullot 1 ja 2: Testisuspensio

Pullot 3 ja 4: Siirrosaineen taustanäyte

Pullo 5: Menetelmän vertailunäyte

Seuraavia pulloja on käytettävä tarpeen mukaan, ja niiden käyttö on muutenkin suositeltavaa:

Pullo 6: Steriili vertailunäyte

Pullo 7: Myrkyllisyystarkistus

Katso myös kohtaa I.6.7.

V.2.6 **Testin suorittaminen**

Kun pullojen lämpötila on oikea, niihin siirrostetaan valmistettua aktiivilietettä tai muuta siirrosainetta testiohjelman mukaan. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus saa olla enintään 30 mg/l. Pullot pannaan ravistuslaitteeseen, joka käynnistetään. Pullojen ilmatiiviyden tarkastuksen jälkeen aloitetaan hapenkulutuksen mittaukset. Ohjelmanmukaisten mittausten lisäksi ei yleensä tarvita muuta valvontaa kuin päivittäisiä lämpötilan ja ravistustoiminnon tarkastuksia,

Hapenkulutus lasketaan säännöllisten ja tiheiden mittausten tulosten perusteella laitevalmistajan ohjeiden mukaan. Inkubaation lopussa (yleensä 28 päivän kuluttua) mitataan pulloissa olevien liuosten pH-arvot, mikä on erityisen tärkeää, jos hapenkulutusarvot ovat pieniä tai suurempia kuin $ThOD_{NH4}$ (typpeä sisältävät yhdisteet).

▼B

Tarvittaessa kokeen alussa ja lopussa otetaan respirometripulloista näytteet DOC:n tai spesifisen kemikaalin analyysiä varten (katso liitettä II.4). Kokeen alussa tehtävän näytteenoton yhteydessä on varmistettava, että pulloon jäljelle jäävä testisuspension tilavuus on tunnettu. Kun happea kuluttava yhdiste sisältää typpeä, nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien suureneminen 28 päivän aikana määritetään nitrifikaation vaatima hapenkulutus huomioon ottaen (katso liitettä V).

V.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

V.3.1 **Tulosten käsittely**

Testattavan kemikaalin hapenkulutus (mg) tunnetun ajan kuluessa (korjattuna siirrostetun taustanäytteen hapenkulutuksella) jaetaan testattavan kemikaalin käytetyllä painolla. Tulokseksi saadaan BOD-arvo ilmaistuna hapen painona testattavan kemikaalin painoa kohti:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{testattavan kemikaalin } O_2 - \text{kulutus (mg)} - \text{taustanäytten } O_2 - \text{kulutus (mg)})}{(\text{pullossa olevan testattavan kemikaalin määrä (mg)})}$$

= mg O2 mg:aa testattavaa kemikaalia kohti

Prosentuaalinen biohajoavuus voidaan laskea näin:

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikaalia})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2\text{kemikaalia})} \times 100$$

tai näin:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikaalia})}{\text{COD}(\text{mg } O_2\text{kemikaalia})} \times 100$$

Huomautus: Molemmat menetelmät eivät välttämättä anna tulokseksi samaa arvoa. Jälkimmäisen menetelmän käyttöä suositellaan.

Kun testattava aine sisältää typpeä, käytetään joko NH_4:n tai NO_3:n perusteella laskettua ThOD-arvoa sen mukaan, mitä nitrifikaation esiintymisen suhteen on odotettavissa (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Jos tehdään myös orgaanisen hiilen tai spesifisen kemikaalin määritykset, prosentuaalinen hajoaminen lasketaan kohdassa I.7 kuvatun menetelmän mukaan.

Tulokset kirjataan oheisiin tietolomakkeisiin.

V.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Siirrostuksen taustanäytteen hapenkulutus on yleensä 20–30 mg O_2/l. Arvo saa olla 28 päivän kuluessa enintään 60 mg/l. Jos arvo on tätä suurempi, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Jos pH-arvo on alueen 6–8,5 ulkopuolella ja testattavan kemikaalin hapenkulutus on alle 60 %, testattavan kemikaalin pitoisuutta on pienennettävä ja testi on toistettava.

Katso myös kohtaa I.5.2.

▼B

V.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

V.4 **TIETOLOMAKE**

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

MANOMETRINEN RESPIROMETRIAKOE

1. **LABORATORIO**

2. **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3. **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l

Liuoksen alkupitoisuus, C_o: mg/l

Testipullon tilavuus (V): ml

ThOD tai COD: mg O_2 / mg testattavaa ainetta (NH_4, NO_3)

4. **SIIRROSAINE**

Lähde:

Käsittelyt:

Esikäsittelyt:

Seoksen suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus: mg/l

5. **HAPENKULUTUS: BIOHAJOAVUUS**

		Aika (päivää)											
		0		7		14			21			28	
O_2-kulutus (mg), testattava kemikaali	1												
	2												
	a, keskiarvo												
O_2-kulutus (mg), taustanäyte	3												
	4												
	b, keskiarvo												
Korjattu BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD mg:aa testattavaa kemikaalia kohti	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Aika (päivää)											
		0		7		14			21			28	
Hajoaminen (%) $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Keskiarvo (*)												

V = testipullon sisällön tilavuus
(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää.

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6. **NITRIFIKAATIOKORJAUS** (katso liitettä V)

Päivä		0	28	Erotus
(i)	Nitraattipitoisuus (mg N/litra)			(N)
(ii)	Happiekvivalentti (4,57 x N x V (mg)	—	—	
(iii)	Nitriittipitoisuus (mg N/litra)			(N)
(iv)	Happiekvivalentti (3,43 x N x V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Kokonaishappiekvivalentti	—	—	

7. **HIILIANALYYSI** (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Aika (päivä)	Taustanäyte (mg/l)	Testattava kemikaali (mg/l)
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) tai inkubaation lopussa

$$\text{Prosentuaalinen DOC} - \text{poistuma} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPESIFINEN KEMIKAALI** (valinnainen)

S_b = fysikaalis-kemiallisen (steriilin) vertailunäytteen pitoisuus 28 päivän kuluttua

S_a = siirrostettujen pullojen pitoisuus 28 päivän kuluttua

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOOTTINEN HAJOAVUUS** (valinnainen)

a = steriilien pullojen hapenkulutus (mg) 28 päivän kuluttua

$$\text{hapenkulutus mg : aa testattavaa kemikaalia kohti} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(Katso jaksoja 1 ja 3.)

$$\text{Prosentuaalinen abioottinen hajoavuus} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

hapenkulutus mg:aa testattavaa kemikaalia kohti =

OSA VI **SULJETUN PULLON MENETELMÄ** (menetelmä C.4-E)

VI.1 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testattavan kemikaalin ja epäorgaanisen liuoksen seokseen (2–5 mg kemikaalia/l) siirrostetaan suhteellisen pieni määrä sekapopulaatiosta otettuja mikroeliöitä. Näin saatua seosta pidetään täysissä, suljetuissa pulloissa pimeässä ja vakiolämpötilassa. Hajoamista seurataan analysoimalla liuennutta happea 28 päivän ajan. Testattavan kemikaalin hapenkulutus vähennettynä siirrostetun taustanäytteen hapenkulutuksella ilmaistaan ThOD- tai COD-prosenttilukuna.

VI.2 MENETELMÄKUVAUS

VI.2.1 **Laite**

a) Lasitulpalla varustettuja BOD-pulloja (vetoisuudeltaan esimerkiksi 250–300 ml).

b) Vesihaude tai inkubaattori, jossa pulloja voidaan pitää vakiolämpötilassa (vaihteluväli enintään ± 1 °C) ja pimeässä.

c) Suuria lasipulloja (2–5 l) epäorgaanisen liuoksen valmistusta ja BOD-pullojen täyttöä varten.

d) Happielektrodi ja happimittari tai Winkler-titrauksen edellyttämät varusteet ja reagenssit.

VI.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Kantaliuoksen valmistus kuvataan kohdassa I.6.2.

Sekoitetaan a-, b-, c- ja d-liuosta 1 ml kutakin ja laimennetaan liuos yhden litran tilavuuteen.

VI.2.3 **Siirrosaineen valmistelu**

Siirrosaine saadaan yleensä pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän laitoksen tai laboratoriolaitoksen sekundaarisesta jätevedestä. Myös pintavettä voidaan käyttää. Yleensä käytetään 0,05–5 ml suodosta epäorgaanisen liuoksen litraa kohti. Tarvittaessa määrätystä päästövedestä saadun siirrosaineen optimaalinen testitilavuus on määritettävä kokeellisesti (katso kohtia I.6.4.2 ja I.6.5).

VI.2.4 **Pullojen valmistelu**

Epäorgaanista liuosta ilmastetaan voimakkaasti 20 minuutin ajan. Jokaiseen testisarjaan on käytettävä samasta erästä otettua epäorgaanista liuosta. Epäorgaaninen liuos on yleensä käyttövalmis, kun sitä on pidetty testilämpötilassa 20 tunnin ajan. Tarkistuksena määritetään liuenneen hapen pitoisuus, jonka arvo saa olla enintään 9 mg/l liuoksen lämpötilan ollessa 20 °C. Ilmalla kyllästetyn liuoksen kaikki siirrot ja täytöt on tehtävä kuplia välttäen, esimerkiksi sifonien avulla.

▼B

Valmistellaan rinnakkaiset ryhmät BOD-pulloja, joiden avulla voidaan toteuttaa rinnakkaisia koesarjoja testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin määritystä varten. BOD-pulloja on valmisteltava sellainen määrä (siirrosaineen taustanäytepullot mukaan lukien), että voidaan tehdä vähintään kaksinkertaiset hapenkulutuksen mittaukset halutuin välein (esimerkiksi 0, 7, 14, 21 ja 28 päivän kuluttua). Joissakin tapauksissa suurempi määrä pulloja on tarpeen 10-päiväisen jakson löytämiseksi.

Ilmalla kyllästettyä epäorgaanista liuosta kaadetaan suuriin pulloihin. Pullot täytetään kolmannekseen asti. Sitten eri pulloihin lisätään riittävä määrä testattavan kemikaalin ja vertailukemikaalin kantaliuosta, niin että kemikaalien lopullinen pitoisuus on enintään 10 mg/l. Erillisessä suuressa pullossa olevaan taustanäytteeseen ei lisätä kemikaaleja.

Siirrosaineen aktiviteetin varmistamiseksi BOD-pullojen liuenneen hapen pitoisuutta ei saa päästää alle arvon 0,5 mg/l, mikä rajoittaa testattavan kemikaalin pitoisuuden arvoon 2 mg/l. Jos yhdiste on huonosti liukenevaa tai jos sillä on pieni ThOD-arvo, voidaan käyttää pitoisuutta 5–10 mg/l. Joissakin tapauksissa on suositeltavaa ajaa rinnakkaisia testisarjoja kahta eri pitoisuutta (esimerkiksi arvoja 2 mg/l ja 5 mg/l) käyttäen. ThOD-arvo lasketaan yleensä ensisijaisesti ammoniumsuolojen muodostuksesta, ellei odotettavissa ole nitrifikaatiota, missä tapauksessa laskelmien on perustuttava nitraattien muodostukseen ($ThOD_{NO3}$, katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Jos on tarpeen määrittää testattavan kemikaalin myrkyllisyys (jos esimerkiksi aiempien kokeiden tuloksena on saatu pieni biohajoavuusarvo), myrkyllisyysmääritystä varten on valmisteltava erillinen pullosarja.

Erilliseen suureen pulloon lisätään ilmastettua epäorgaanista liuosta (suunnilleen kolmannes pullon tilavuudesta), testattavaa kemikaalia ja vertailukemikaalia, niin että lopulliset pitoisuudet ovat samat kuin muissa suurissa pulloissa.

Suurissa pulloissa olevat liuokset siirrostetaan sekundaarisella jätevedellä (0,5–5 ml/l) tai muulla siirrosaineella (esimerkiksi jokivedellä, katso kohtaa I.6.4.2). Lopuksi pullojen sisältö laimennetaan epäorgaanisella liuoksella täyteen tilavuuteen. Riittävä sekoittuminen varmistetaan käyttämällä pullon pohjaan asti ulottuvaa letkua.

VI.2.5 **Tyypillisen kokeen pullomäärä**

Tyyppillisessä ajossa käytetään seuraavia pulloja:

— vähintään 10:tä pulloa, joissa on testattavaa kemikaalia ja siirrosainetta (testisuspensio),

— vähintään 10:tä pulloa, jossa on pelkkää siirrosainetta (siirrosaineen taustanäyte),

— vähintään 10:tä pulloa, jossa on vertailukemikaalia ja siirrosainetta (menetelmän tarkistusnäyte).

▼B

— Tarvittaessa käytetään lisäksi 6:ta pulloa, joissa on testattavaa kemikaalia, vertailukemikaalia ja siirrosainetta (myrkyllisyystarkistus). 10-päiväisen jakson löytämisen varmistamiseksi tarvitaan kuitenkin kaksinkertainen pullomäärä.

VI.2.6 Testin suorittaminen

Kutakin valmisteltua liuosta annostellaan heti vastaaviin BOD-pulloryhmiin letkulla, joka ulottuu suuren pullon alimpaan neljännekseen (ei pohjaan). BOD-pullot täytetään kokonaan. Ilmakuplat poistetaan koputtamalla pulloja kevyesti. Nollahetkipullojen liuenneen hapen määritys tehdään heti Winkler- tai elektrodimenetelmällä. Pullojen sisältö voidaan säästää myöhemmin tehtävää Winkler-analyysia varten lisäämällä pulloihin mangaani(II)sulfaattia ja natriumhydroksidia (ensimmäistä Winkler-reagenssia). Huolella suljettuja pulloja, joissa happi on sidottuna ruskeaan mangaani(III)oksidihydraattiin, säilytetään pimeässä 10–20 °C:ssa enintään 24 tuntia ennen Winkler-menetelmän seuraavien vaiheiden aloittamista. Loput rinnakkaispullot suljetaan varmistaen, ettei pulloihin jää ilmakuplia, minkä jälkeen pulloja inkuboidaan pimeässä 20 °C:ssa. Jokaista pullosarjaa kohti on käytettävä kattavaa rinnakkaissarjaa, joka sisältää siirrostettua taustanäytettä. Jokaisesta sarjasta on poimittava koko 28 päivän inkubaatiojakson ajan säännöllisin välein (vähintään kerran viikossa) vähintään kaksi pulloa liuenneen hapen analyysiä varten.

Viikoittaisten näytteiden avulla pitäisi voida arvioida prosentuaalinen poistuma 14-päiväisen jakson aikana, ja 3–4 päivän välein tapahtuvan näytteenoton avulla pitäisi voida määrittää 10-päiväinen jakso, mikä edellyttää noin kaksinkertaisen pullomäärän käyttöä.

Jos testattava aine sisältää typpeä, nitrifikaation aiheuttama hapenkulutus on otettava huomioon. Korjaus tehdään määrittämällä ensin liuenneen hapen pitoisuus O_2-elektrodilla, minkä jälkeen BOD-pullosta otetaan näyte nitriitti- ja nitraattianalyysia varten. Hapenkulutus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuden kasvun perusteella (katso liitettä V).

VI.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

V.3.1 **Tulosten käsittely**

Ensin lasketaan kunkin jakson jälkeinen BOD-arvo vähentämällä siirrosaineen taustanäytteen hapenpoistuma (mg O_2/l) testattavan aineen hapenpoistumasta. Näin korjattu poistuma jaetaan testattavan kemikaalin pitoisuudella (mg/l), jolloin saadaan spesifinen BOD-arvo ilmaistuna hapen painona (mg) testattavan kemikaalin painoa (mg) kohti. Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan jakamalla spesifinen BOD-arvo spesifisellä liitteen II.2 mukaan lasketulla ThOD-arvolla tai liitteessä II.3 esitettävän analyysin avulla määritetyllä COD-arvolla seuraavasti:

$$\mathrm{BOD} = \frac{(\text{testattavan kemikaalin } O_2 - \text{kulutus (mg)} - \text{taustanäytten } O_2 - \text{kulutus (mg)})}{(\text{pullossa olevan testattavan kemikaalin määrä (mg)})}$$

▼B

= mg O_2 mg:aa testattavaa kemikaalia kohti

$$\text{Prosentuaalinen hajoavuus} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikaalia)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg kemikaalia)}} \times 100$$

tai

$$\text{Prosentuaalinen hajoavuus} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikaalia)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg kemikaalia)}} \times 100$$

On otettava huomioon, että molemmat menetelmät eivät välttämättä anna tulokseksi samaa arvoa. Ensin mainitun menetelmän käyttöä suositellaan.

Jos testattava aine sisältää typpeä, on käytettävä NH_4:n tai NO_3:n perusteella laskettua ThOD-arvoa sen mukaan, mitä nitrifikaation suhteen on odotettavissa (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

VI.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Kun 28 päivää on kulunut, siirrostuksen taustanäytteen hapenpoistuma ei saa ylittää arvoa 1,5 mg liuennutta happea litraa kohti. Jos arvo on suurempi, koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Testipullojen hapen jäännöspitotsuus ei saa missään vaiheessa alittaa arvoa 0,5 mg/l. Näin pienet happipitoisuudet ovat hyväksyttäviä vain siinä tapauksessa, että liuenneen hapen määritysmenetelmä on riittävän tarkka mittaamaan tällaisia pitoisuuksia.

Katso myös kohtaa I.5.2.

VI.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa 1.8.

VI.4 TIETOLOMAKE

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

SULJETUN PULLON MENETELMÄ

1. **LABORATORIO**

2. **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

3. **TESTATTAVA AINE**

   Nimi:

   Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l

   Liuoksen alkupitoisuus: mg/l

   ThOD tai COD: mg O_2 / mg testattavaa ainetta

4. **SIIRROSAINE**

   Lähde:

   Käsittelyt:

▼B

Esikäsittelyt:

Pitoisuus testiseoksessa: mg/l

5. **DO-MÄÄRITYS**

Menetelmä: Winkler/elektrodi

Pulloanalyysit

Inkubaatioaika (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Taustanäyte (ilman kemikaalia)	1	C_1				
	2	C_2				
Keskiarvo	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testattava kemikaali	1	a_1				
	2	a_2				
Keskiarvo	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Huomautus: Vertailukemikaalien ja myrkyllisyysvertailunäytteiden osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6. **NITRIFIKAATIOKORJAUS** (katso liitettä V)

Inkubaatioaika (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Nitraattipitoisuus (mg N/l)				
(ii)	Nitraattipitoisuuden muutos (mg N/l)	—			
(iii)	Happiekvivalentti (mg/l)	—			
(iv)	Nitriittipitoisuus (mg N/l)				
(v)	Nitriittipitoisuuden muutos (mg N/l)	—			
(vi)	Happiekvivalentti (mg/l)	—			
(ii + vi)	Kokonaishappiekvivalentti (mg/l)	—			

7. **DO-VÄHENNYS: PROSENTUAALINEN HAJOAMINEN**

	Vähennys päivän n jälkeen (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
PULLO 1: $(m_{to} - m_{tx})$ $(m_{bo} - m_{bx})$				
PULLO 2: $(m_{to}$ $rm_{tx})$ $(m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Vähennys päivän n jälkeen (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
PULLO 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{testipitoisuus} \times \text{kemikaalin ThOD}}$				
PULLO 2: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{testipitoisuus} \times \text{kemikaalin ThOD}}$				
$\%\ D \text{ keskiarvo } (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Jos D_1 ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää.

m_{t0} = testipullon arvo hetkellä 0

m_{tx} = testipullon arvo hetkellä x

m_{b0} = taustanäytteen keskiarvo hetkellä 0

m_{bx} = taustanäytteen keskiarvo hetkellä x

Käytetään myös osan 6, kohtien iii ja vi mukaista nitrifikaatiokorjausta.

8. **TAUSTANÄYTTEEN DO-VÄHENNYKSET**

Taustanäytteen hapenkulutus on (m_{b0}-m_{b28}) mg/l. Taustanäytteen hapenkulutus on tärkeä tekijä kokeen hyväksyttävyyden kannalta. Hapenkulutus ei saa ylittää arvoa 1,5 mg/l.

OSA VII **MITI-KOE** (menetelmä C.4-F)

VII. 1 MENETELMÄN PERIAATE

Testattavaa kemikaalia lisätään epäorgaaniseen liuokseen, jota siirrostetaan erikoisviljelmästä otetuilla, adaptoimattomilla mikroeliöillä. Liuosta tai suspensiota hämmennetään ja sen hapenkulutusta mitataan automaattisella laitteella 28 päivän ajan pimennetyssä ja suljetussa respirometrissä lämpötilassa 25 ± 1 °C. Muodostunut hiilidioksidi imeytetään kalkkisoodaan. Biohajoavuus ilmaistaan prosentuaalisena hapenkulutuksena (taustanäytteen kulutuksella korjattuna) teoreettisesta hapenkulutuksesta (ThOD). Prosentuaalinen primaarinen biohajoavuus lasketaan spesifisen, inkubaation alussa ja lopussa tehtävän kemiallisen analyysin perusteella. Lisäksi voidaan tehdä DOC-analyysi.

VII.2 MENETELMÄKUVAUS

VII.2.1 **Laite**

a) Automaattinen elektrolyyttinen BOD-mittari tai respirometri, jossa on 6 kpl 300 ml:n pulloja ja kupit CO_2-absorbenttia varten

▼B

b) Huone, jossa on vakiolämpötila, tai vesihaude, jonka lämpötila voidaan pitää arvossa 25 °C (suurin sallittu vaihteluväli ± 1 °C)

c) Kalvosuodatinlaite (valinnainen)

d) Hiilianalysaattori (valinnainen).

VII.2.2 **Epäorgaanisen liuoksen valmistus**

Valmistetaan seuraavat kantaliuokset käyttäen analyyttisen puhtaita reagensseja ja vettä (I.6.1):

a) Monokaliumdivetyortofosfaattia, KH_2PO_4 8,50 g

Dikaliummonovetyortofosfaattia, K_2HPO_4 21,75 g

Dinatriummonovetyortofosfaattidodekahydraattia, $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ 44,60 g

Ammoniumkloridia, NH_4Cl 1,70 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

Liuoksen pH-arvon on oltava 7,2.

b) Magnesiumsulfaattiheptahydraattia, $MgSO_4\ 7\ H_2O$ 22,50 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

c) Kalsiumkloridia, $CaCl_2$ 27,50 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

d) Rauta(III)kloridiheksahydraattia, $FeCl_3 \times 6H_2O$ 0,25 g

Liuotetaan veteen ja laimennetaan litran tilavuuteen.

Otetaan 3 ml kutakin liuosta a, b, c ja d ja laimennetaan litran tilavuuteen.

VII.2.3 **Siirrosaineen valmistelu**

Kerätään tuoreita näytteitä vähintään kymmenestä paikasta, pääosin alueilta, joilla käytetään ja päästetään useita eri kemikaaleja. Kerätään esimerkiksi kuntien ja teollisuuslaitosten jätevesilaitoksista, joista, järvistä ja muista sopivista paikoista 1 l:n näytteitä (esimerkiksi lietettä, pintamaata ja vettä), jotka sekoitetaan huolellisesti. Kelluva aines poistetaan. Kun seos on laskeutunut, pintalietteen pH säädetään natriumhydroksidilla tai fosforihapolla arvoon 7 ± 1.

Sopiva tilavuus suodatettua pintalietettä lisätään aktiivilieteastiaan ja nestettä ilmastetaan noin 23,5 tunnin ajan. Kolmekymmentä minuuttia ilmastuksen päättymisen jälkeen suunnilleen kolmasosa pintalietteestä kaadetaan pois ja laskeutuneeseen aineeseen lisätään poiskaadettua liuosta vastaava määrä liuosta, jonka pH-arvo on 7 ja joka sisältää 0,1 % glukoosia, 0,1 % peptonia ja 0,1 % monokaliumortofosfaattia. Tämän jälkeen ilmastus käynnistetään uudelleen. Menettely toistetaan kerran päivässä. Lietejärjestelmän käytössä on noudatettava huolellisuutta: päästövesien on oltava kirkkaita, lämpötila on pidettävä arvossa 25 ± 2 °C, pH-arvon on oltava 7 ± 1, lietteen on laskeuduttava hyvin, ilmastuksen on oltava riittävää liuoksen jatkuvan aerobisuuden varmistamiseksi, lietteessä on oltava yksisoluisia eliöitä ja lietteen aktiivisuutta on testattava vertailuaineeseen verrattuna vähintään joka kolmas kuukausi. Lietettä ei saa käyttää siirrosaineena, ennen kuin se on ollut järjestelmässä vähintään kuukauden. Neljä kuukautta vanhempaa lietettä ei saa käyttää. Tämän jälkeen näytteitä on otettava vähintään 10 paikasta säännöllisin väliajoin (kerran kolmessa kuukaudessa).

▼B

Jotta tuoreen ja vanhan lietteen aktiivisuus voitaisiin pitää samalla tasolla, käytössä olevan aktiivilietteen suodatettua pintalietettä sekoitetaan samaan tilavuuteen vastavalmistettua sekoitetta, jonka osat ovat peräisin 10:stä eri paikasta. Tämän jälkeen seosta viljellään edellä kuvatulla tavalla. Lietettä otetaan siirrosaineeksi 18–24 tuntia yksikön syötön jälkeen.

VII.2.4 **Pullojen valmistelu**

Valmistellaan seuraavat kuusi pulloa:

Pullo 1: testattavaa kemikaalia laimennusvedessä (100 mg/l)

Pullot 2, 3 ja 4: testattavaa kemikaalia epäorgaanisessa liuoksessa (100 mg/l)

Pullo 5: vertailukemikaalia (esimerkiksi aniliinia) epäorgaanisessa liuoksessa (100 mg/l)

Pullo 6: pelkkää epäorgaanista liuosta.

Huonosti liukenevia testattavia kemikaaleja lisätään suoraan painon tai tilavuuden mukaan, tai niitä käsitellään liitteessä II kuvattavalla tavalla (liuottimia tai emulgaattoreita ei kuitenkaan saa käyttää). Imeytinkuppeihin lisätään CO_2-absorbenttia. Pullojen 2, 3 ja 4 pH säädetään arvoon 7,0.

VI1.2.5 **Testin suorittaminen**

Pulloihin 2, 3 ja 4 (testisuspensiot), 5 (aktiviteettikontrolli) ja 6 (siirrostuksen taustanäyte) lisätään pieni tilavuus siirrosainetta, niin että suspendoituneen kuiva-aineen lopullinen pitoisuus on 30 mg/l. Pulloon 1 ei lisätä siirrosainetta. Pullot asetetaan sekoituslaitteeseen, pullojen ilmatiiviys tarkistetaan, sekoittimet käynnistetään ja hapenkulutuksen mittaus aloitetaan pimeässä. Lämpötila, sekoituslaite ja hapenkulutuksen kulometrinen rekisteröintilaite on tarkistettava päivittäin. Pullojen sisällön mahdolliset värimuutokset on merkittävä muistiin. Kuuden pullon hapenkulutus luetaan suoraan esimerkiksi BOD-käyriä tuottavasta kuusikärkisestä piirturista. Kun inkubaatio on päättynyt (yleensä 28 päivän kuluttua), pullojen sisällön pH-arvot mitataan. Sitten määritetään jäljelle jääneen testattavan kemikaalin ja mahdollisen välituotteen pitoisuus sekä (jos kyseessä on vesiliukoinen aine) DOC-pitoisuus (katso liitettä II.4). Haihtuvien kemikaalien kohdalla on noudatettava erityistä huolellisuutta. Jos nitrifikaatiota on odotettavissa, nitriitti- ja nitraattipitoisuus määritetään mahdollisuuksien mukaan.

VII.3 TIEDOT JA RAPORTOINTI

VII.3.1 **Tulosten käsittely**

Testattavan kemikaalin hapenkulutus (mg) määrätyn ajan kuluttua, korjattuna siirrostuksen taustanäytteen kulutuksella, jaetaan testattavan kemikaalin painolla. Tuloksena saadaan BOD-arvo ilmaistu hapen painona kemikaalin painoa kohti (mg/mg), seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\text{BOD} = \frac{\text{testattavan kemikaalin } O_2 - \text{kulutus (mg)} - \text{taustanäytten } O_2 - \text{kulutus (mg)}}{\text{testattavan kemikaalin paino (mg)}}$$

= mg O_2/mg testattavaa kemikaalia

▼B

Prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan:

$$\text{Prosentuaalinen biohajoavuus} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg kemikaalia)}} \times 100$$

Seosten osalta ThOD lasketaan yksinkertaisten yhdisteiden tapaan alkuaineanalyysin perusteella. Käytettävä ThOD-arvo ($ThOD_{NH4}$ tai $ThOD_{NO3}$) valitaan sen mukaan, esiintyykö nitrifikaatiota vai ei (katso liitettä II.2). Jos nitrifikaatio on vain osittaista, nitrifikaation hapenkulutuksen korjaus lasketaan nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutoksen perusteella (katso liitettä V).

Prosentuaalinen primaarinen biohajoavuus lasketaan spesifisen lähtökemikaalin poistuman perusteella (katso osaa I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Jos pullossa 1 on on havaittu testattavan kemikaalin häviötä fysikaalis-kemiallisen poistuman mittauksen yhteydessä, häviö on raportoitava. Tällöin prosentuaalisen biohajoavuuden laskennassa käytetään pullon 1 testattavan kemikaalin pitoisuutta (S_b) 28 päivän kuluttua.

Jos DOC-määrityksiä (valinnainen toimi) tehdään, lopullinen prosentuaalinen biohajoavuus lasketaan seuraavan suureyhtälön mukaan (katso kohtaa I.7.1):

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

Jos pullossa 1 on havaittu DOC-häviötä fysikaalis-kemiallisen poistuman mittauksen yhteydessä, prosentuaalisen biohajoavuuden laskennassa käytetään tämän pullon DOC-pitoisuutta.

Tulokset kirjataan oheisiin tietolomakkeisiin.

VII.3.2 **Tulosten hyväksyminen**

Siirrostuksen taustanäytteen hapenkulutus on yleensä 20-30 mg O_2/l. Arvo saa olla 28 päivän kuluessa enintään 60 mg/l. Jos arvo on tätä suurempi, tietoja ja koetekniikoita on tarkasteltava erityisen kriittisesti. Jos pH-arvo on alueen 6–8,5 ulkopuolella ja testattavan kemikaalin hapenkulutus on alle 60 %, testattavan kemikaalin pitoisuutta on pienennettävä ja testi on toistettava.

Katso myös kohtaa I.5.2.

Jos aniliinin hapenkulutuksen perusteella laskettu prosentuaalinen hajoaminen ei ylitä 7 päivän kuluessa arvoa 40 % ja 14 päivän kuluessa arvoa 65 %, koe hylätään.

VII.3.3 **Raportointi**

Katso kohtaa I.8.

VII.4 TIETOLOMAKE

Jäljempänä on esimerkki tietolomakkeesta.

MITI (I) -KOE

1. **LABORATORIO**

2. **KOKEEN ALKUPÄIVÄMÄÄRÄ**

▼B

3. **TESTATTAVA AINE**

Nimi:

Kantaliuoksen pitoisuus: mg/l kemikaalina

Liuoksen alkupitoisuus, C_o: mg/l kemikaalina

Seoksen tilavuus, V: ml

ThOD: mg O_2/l

4. **SIIRROSAINE**

Lietteen näytteenottopaikat:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Aktiivilietteen suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus, kun aktiivilietettä on akklimatisoitu synteettisellä jätevedellä = … mg/l

Aktiivilietteen tilavuus lopullisen seoksen tilavuutta (litraa) kohti: = … ml

Lietteen pitoisuus lopullisessa seoksessa = … mg/l

5. **HAPENKULUTUS: BIOHAJOAVUUS**

Käytetyn respirometrin tyyppi:

			Aika (päivää)				
			0	7	14	21	28
O_2-kulutus (mg), testattava kemikaali	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2-kulutus (mg), taustanäyte	b						
Korjattu O_2-kulutus (mg)	(a_1-b) (a_2-b) (a_3-b)						
BOD testattavan kemikaalin painoa (mg) kohti	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Pullo 1					
		Pullo 2					
		Pullo 3					
Prosentuaalinen hajoavuus $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		keski-arvo (*)					

(*) Jos toistoarvojen ero on suuri, toistoarvojen keskiarvoa ei pidä käyttää.

▼B

Huomautus: Vertailukemikaalien osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

6. **HIILIANALYYSI** (valinnainen)

Hiilianalysaattori:

Pullo	DOC				DOC-poistuma (%)	Keskiarvo
	Mitattu arvo		Korjattu arvo			
Vesi + testattava aine	a				—	—
Liete + testattava aine	b_1		b_1-c			
Liete + testattava aine	b_2		b_2-c			
Liete + testattava aine	b_3		b_3-c			
Taustanäyte	c		—		—	—

$$\text{Prosentuaalinen DOC} - \text{poistuma} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPESIFISEN KEMIKAALIN ANALYYTTISET TIEDOT**

	Testattavan kemikaalin jäännösmäärä kokeen lopussa	Prosentuaalinen hajoaminen
Veteen sekoitettu taustanäyte	S_b	
Siirrostettu näyte	s_{a1}	
	s_{a2}	
	s_{a3}	

$$\text{Prosentuaalinen hajoaminen} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Pullojen a_1, a_2 ja a_3 prosentuaalinen hajoaminen lasketaan vastaavalla tavalla.

8. **HUOMAUTUKSET**

Jos käytettävissä on käyrä, johon on piirretty BOD-arvot ajan funktiona, se on liitettävä raporttiin.

▼B

LIITE I

LYHENTEITÄ JA MÄÄRITELMIÄ

DO: ”Dissolved oxygen” (mg/l) -Vesinäytteeseen liuenneen hapen pitoisuus.

BOD: ”Biochemical oxygen demand” (g) — Happimäärä, jonka pieneliöt kuluttavat testattavan yhdisteen metaboloinnin yhteydessä. BOD ilmaistaan myös hapenkulutuksena (g) testattavan aineen painoa (g) kohti (katso menetelmää C.5).

COD: ”Chemical oxygen demand” (g) — Hapenkulutus, kun testattavaa yhdistettä hapetetaan kuumalla, happamalla dikromaatilla. Suure, joka ilmaisee hapetuskelpoisen aineksen määrän yhdisteessä. COD ilmaistaan myös hapenkulutuksena (g) testattavan aineen massaa (g) kohti (katso menetelmää C.6).

DOC: ”Dissolved organic carbon” — Liuoksessa oleva orgaaninen hiili tai orgaaninen hiili, joka läpäisee 0,45 μm:n suodattimen tai jää pinnalle, kun liuosta on sentrifugoitu nopeudella 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) 15 minuutin ajan.

ThOD: ”Theoretical oxygen demand” (mg) — Happimäärä, joka tarvitaan kemikaalin täydelliseen hapettamiseen. Lasketaan molekyylikaavan avulla (katso liitettä II.2). ThOD ilmaistaan hapenkulutuksena (mg) testattavan aineen massaa kohti (mg).

$ThCO_2$: ”Theoretical carbon dioxide” (mg) — Hiilidioksidimäärä, joka lasketaan saatavan testattavan aineen tunnetusta tai mitatusta, epäorgaaniseen muotoon muunnetusta hiilestä. $ThCO_2$ ilmaistaan myös muodostuneen hiilidioksidin painona (mg) testattavan aineen massaa (mg) kohti.

TOC: ”Total organic carbon” — Näytteen orgaanisen hiilen summa liuoksesta ja supensiosta mitattuna.

IC: ”Inorganic carbon” — Epäorgaaninen hiili.

TC: ”Total carbon” — Näytteen orgaanisen ja epäorgaanisen hiilen summa.

Primaarinen biohajoaminen

Biologisen aktiviteetin aiheuttama aineen kemiallisen rakenteen muuttuminen, jonka seurauksena aine menettää spesifisen ominaisuutensa.

Lopullinen (aerobinen) biohajoaminen

Hajoamisen taso, joka saavutetaan, kun eliöt ovat hyödyntäneet testattavan aineen täysin. Tämän prosessin tuloksena syntyy hiilidioksidia, vettä, epäorgaanisia suoloja ja uutta mikrobista solukkoa (biomassaa).

Helposti biohajoava

Tietyt lopullisen biohajoamisen seulontatestit läpäisseiden kemikaalien yleisluokitus. Kyseiset testit ovat niin tiukkoja, että tällaisten aineiden voidaan katsoa olevan nopeasti ja täydellisesti biohajoavia vedessä ja aerobisissa olosuhteissa.

▼B

Itsestään biohajoava

Kemikaali, jonka tiedetään varmojen todisteiden perusteella olevan primäärisesti tai lopullisesti biohajoava kaikissa tunnetuissa biohajoavuustesteissä.

Käsiteltävyys

Yhdisteiden poistettavuus jätevedestä sen biologisen käsittelyn yhteydessä ilman käsittelyprosessien normaalille toiminnalle koituvia häiriöitä. Helposti biohajoavat yhdisteet ovat yleensä käsiteltäviä, mutta kaikki itsestään biohajoavat yhdisteet eivät. Myös abioottisia prosesseja tapahtuu.

Latenssiaika

Aika, joka kuluu vaimennuskokeessa / die-away –kokeessa siirroshetkestä vähintään 10 %:n hajoamistason saavuttamiseen. Latenssiaika on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Hajoamisaika

Hajoamisaika on latenssiajan päättymistä seuraava, 90 %:n hajoamistason saavuttamiseen kuluva ajanjakso.

10-päiväinen jakso

10 %:n hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää.

▼B

LIITE II

SOPIVIEN YHTEENVETOPARAMETRIEN LASKENTA JA MÄÄRITYS

Joissakin menetelmissä tarvitaan määrättyjä yhteenvetoparametreja. Näiden arvojen laskeminen kuvataan jäljempänä. Parametrien käyttö kuvataan yksittäisten menetelmien yhteydessä.

1. **Hiilimäärä**

Hiilimäärä lasketaan tunnetusta alkuainekokoonpanosta tai määritetään testattavan aineen alkuaineanalyysin avulla.

2. **Teoreettinen hapenkulutus (ThOD)**

ThOD-arvo voidaan laskea alkuainekokoonpanosta tai määrittää alkuaineanalyysin avulla. Jos alkuainekokoonpano on esimerkiksi:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

eikä nitrifikaatiota tapahdu, ThOD-arvo voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

Jos tapahtuu nitrifikaatiota, ThOD-arvo voidaan laskea seuraavan suureyhtälön avulla:

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kemiallinen hapenkulutus (COD)**

Kemiallinen hapenkulutus (COD) määritetään menetelmän C.6 mukaan.

4. **Liuennut orgaaninen hiili (DOC)**

Määritelmän mukaan liuennut orgaaninen hiili (DOC) on kemikaalin tai seoksen veteen liuennut aines, joka läpäisee 0,45 μm:n suodattimen.

Testiastioista otetaan näytteet, jotka suodatetaan heti kalvosuodatinlaitteessa. Suodoksen ensimmäinen 20 ml:n osuus (jos käytetään pieniä suodattimia, määrä voi olla pienempi) hylätään. Hiilianalyysiä varten käytetään 10–20 ml (tai pienempi määrä, jos näyte annetaan ruiskulla; määrä vaihtelee hiilianalysaattorin mukaan). DOC-pitoisuus määritetään orgaanisella hiilianalysaattorilla, jonka tarkkuuden on oltava riittävä sellaisten pitoisuuksien mittaamiseen, jotka ovat enintään 10 % testin alussa vallinneesta DOC-pitoisuudesta.

Jos suodatettuja näytteitä ei pystytä analysoimaan samana päivänä, niitä voidaan säilyttää 2–4 °C:n lämpötilassa enintään 48 tuntia. Jos säilytysaika on tätä pitempi, näytteitä on säilytettävä - 18 °C:ssa tai tätä alhaisemmassa lämpötilassa.

Huomautuksia:

Hydrofiilisyyden parantamiseksi kalvosuodattimet on usein kyllästetty pinta-aktiivisilla aineilla. Tämän vuoksi suodattimessa voi olla useita milligrammoja liukoista orgaanista hiiltä, mikä voi häiritä biohajoavuusmäärityksiä. Pinta-aktiiviset aineet ja muut liukoiset orgaaniset yhdisteet poistetaan keittämällä suodattimia ionisoimattomassa vedessä tunnin ajan. Käsittely toistetaan kolme kertaa. Keittämisen jälkeen suodattimia voidaan säilyttää vedessä viikon ajan. Jos käytetään kertakäyttösuodattimia, jokainen erä on tarkastettava liukenevan orgaanisen hiilen suhteen.

▼B

Joidenkin kalvosuodatintyyppien kohdalla testattavaa kemikaalia voi kiinnittyä suodattimeen adsorption kautta. Siksi on suositeltavaa varmistaa, että testattava kemikaali ei kiinnity käytettävään suodattimeen.

TOC:n ja DOC:n osuudet näytteessä voidaan määrittää *sentrifugoimalla* (4 000 g: 40 000 ms^{-2}, 15 minuuttia) suodatuksen asemesta. Sentrifugoinnin tuloksiin ei voi luottaa, jos alkuperäinen DOC-pitoisuus on pienempi kuin 10 mg/l, koska tällöin kaikki bakteerit eivät välttämättä poistu tai bakteeriplasman orgaaninen hiili liukenee uudelleen.

VIITTEET

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs — und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13(1), 169.

▼B

Liite III

HUONOSTI LIUKENEVIEN AINEIDEN BIOHAJOAVUUDEN ARVIOINTI

Huonosti liukenevien aineiden biohajoavuustesteissä on otettava huomioon eräitä erityisseikkoja, jotka kuvataan jäljempänä.

Homogeenisten nesteiden kohdalla ei yleensä ole näytteenotto-ongelmia. Kiinteät aineet sen sijaan on suositeltavaa homogenisoida sopivalla tavalla. Kun tarvitaan muutaman milligramman suuruinen, edustava näyte paljon epäpuhtauksia sisältävästä kemikaaliseoksesta tai aineesta, on noudatettava erityistä tarkkuutta.

Testin aikana voidaan käyttää erilaisia hämmennysmenetelmiä. Hämmennyksen on oltava riittävää pitämään kemikaali dispergoituneena, mutta ei niin voimakasta, että syntyy ylikuumenemista, vaahdonmuodostusta tai tarpeettoman suuria leikkaavia voimia.

Stabiili dispersio voidaan tuottaa myös emulgaattorin avulla. Testiolosuhteissa emulgaattori ei saa olla bakteereille myrkyllinen tai biohajoava, eikä se saa aiheuttaa vaahdonmuodostusta.

Liuottimia koskevat vaatimukset ovat samat kuin emulgaattoreiden kohdalla.

Kiinteitä kantoaineita ei ole suositeltavaa käyttää kiinteiden aineiden testauksessa. Ne voivat kuitenkin sopia öljymäisten aineiden testaukseen.

Kun käytetään apuaineita (emulgaattoreita, liuottimia tai kantoaineita), testiin on sisällytettävä apuainetta sisältävä taustanäyte.

Huonosti liukenevien aineiden biohajoavuusmäärityksissä voidaan käyttää mitä tahansa kolmesta edellä kuvatusta respirometriatestistä (CO_2-, BOD- tai MITI-menetelmää).

VIITTEET

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

Liite 4

BIOHAJOAVUUDEN ARVIOINTI, KUN EPÄILLÄÄN, ETTÄ TESTATTAVA KEMIKAALI ON SIIRROSAINEELLE MYRKYLLINEN

Jos biohajoavuustesti osoittaa, että kemikaali ei ole biohajoava, jäljempänä kuvattavan menetelmän avulla voidaan tarvittaessa määrittää, johtuuko tämä inhibitiosta vai testattavan kemikaalin inerttiydestä (Reynolds et al., 1987).

Myrkyllisyys- ja biohajoavuustesteissä on käytettävä samaa tai samankaltaista siirrosainetta.

Kun kemikaalin biohajoavuutta testataan, kemikaalin myrkyllisyyttä voidaan arvioida käyttämällä aktiivilietteen hengityksenestotestiä (direktiivi 88/302/ETY), BOD-määritystä tai kasvunestomenetelmää yhdessä tai erikseen.

Jos testattavan aineen myrkyllisyyden aiheuttamaa inhibitiota on vältettävä, ehdotetaan, että testattavan aineen pitoisuus pidetään biohajoavuustesteissä enintään kymmenesosana myrkyllisyystestin tuloksena saadusta EC_{50}-arvosta (tai pienempänä kuin EC_{20}-arvo). Yhdisteet, joiden EC_{50}-arvo on suurempi kuin 300 mg/l, eivät todennäköisesti aiheuta myrkyllisyysongelmia hyvää biohajoavuutta testattaessa.

Jos aineen EC_{50}-arvo on pienempi kuin 20 mg/l, testissä on odotettavissa ongelmia. Tällöin testattavaa ainetta on käytettävä pieninä pitoisuuksina, joten suljetun pullon testimenetelmää tai ^{14}C-merkittyjä aineita suositellaan. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää siirrosaineen akklimatisointia, joka mahdollistaa testattavan aineen annostelun suurempina pitoisuuksina kuin edellä mainittuja menetelmiä käytettäessä (tällöin hyvää biohajoavuutta ei kuitenkaan voida määrittää).

VIITTEET

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

Liite V

NITRIFIKAATION AIHEUTTAMAN HAPENKULUTUKSEN HÄIRIÖN KORJAUS

Kun typpeä sisältämättömän aineen biohajoavuutta arvioidaan hapenkulutuksen avulla, nitrifikaation aiheuttama virhe on marginaalinen (enintään 5 %) siitä huolimatta, että liuoksen ammoniakin typpi hapettuu epäsäännöllisesti testattavaa ainetta ja taustanäytettä sisältävissä astioissa. Jos testattava aine sisältää typpeä, nitrifikaation aiheuttamat virheet voivat olla suuria.

Jos nitrifikaatiota on tapahtunut, mutta vain osittain, reaktioseoksen havaittua hapenkulutusta voidaan korjata sen happimäärän osalta, joka tarvitaan ammoniakin hapettamiseen nitriitiksi ja nitraatiksi. Tämä edellyttää sitä, että inkubaation aikana syntyvät nitriitti- ja nitraattipitoisuuksien muutokset määritetään seuraavien suureyhtälöiden avulla:

Yhtälöstä 1 nähdään, että ammoniumkloridin (NH_4Cl:n) typpisisällön (28 g) hapettamiseen nitriitiksi tarvitaan 96 g happea, eli kerroin on 3,43 (96/28).

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Summayhtälö on seuraava

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Yhtälöstä 3 nähdään samoin, että 28 g:n typpimäärän hapettamiseen nitraatiksi tarvitaan 128 g happea, eli kerroin on 4,57 (128/28).

Koska reaktiot tapahtuvat *peräkkäin* ja erilaisten bakteerien vaikutuksesta, nitriittipitoisuus voi vaihdella. Jos se on pieni, nitraattipitoisuus on vastaavasti suurempi. Tällöin nitraatin muodostukseen kuluva happimäärä on 4,57 kerrottuna nitraattipitoisuuden kasvulla ja nitriitinmuodostukseen kuluva happimäärä on 3,43 kerrottuna nitriittipitoisuuden kasvulla. Jos nitriittipitoisuus on pienentynyt, hapenkulutus on - 3,43 kerrottuna pitoisuuden pienenemisellä.

Tästä seuraa, että

nitraatinmuodostuksen kuluttama happimäärä = 4,57 x nitriittipitoisuuden kasvu (4)

ja

nitriitinmuodostuksen kuluttama happimäärä = 3,43 x nitriittipitoisuuden kasvu (5)

ja

nitriittipitoisuuden pienenemisen myötä hävinnyt happimäärä = - 3,43 x nitraattipitoisuuden pieneneminen, (6)

joten

nitrifikaation aiheuttama hapenkulutus = ± 3,43 x nitriittipitoisuuden muutos + 4,57 x nitraattipitoisuuden kasvu, (7)

mistä seuraa, että

hiilen hapettumiseen kuluva happimäärä = havaittu yhteiskulutus — nitrifikaatioon kuluva happimäärä. (8)

Jos vain hapettuneen typen kokonaismäärä määritetään, voidaan olettaa, että nitrifikaation edellyttämä hapenkulutus on suunnilleen 4,57 x hapettuneen typen kasvu.

Tämän jälkeen hiilen hapettumisen edellyttämää, korjattua happimäärää verrataan ThOD NH_3 -arvoon (katso liitettä II).

▼B

C.5 HAJOAMINEN — BIOKEMIALLINEN HAPENKULUTUS

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tällä menetelmällä mitataan kiinteiden tai nestemäisten orgaanisten aineiden biokemiallista hapenkulutusta (BOD).

Testin tiedot koskevat vesiliukoisia aineita, mutta testillä voidaan — ainakin periaatteessa — testata myös haihtuvia ja huonosti veteen liukenevia aineita.

Menetelmää voidaan soveltaa vain sellaisiin orgaanisiin aineisiin, jotka eivät estä bakteerien toimintaa testipitoisuutta käytettäessä. Jos testattava aine ei liukene testipitoisuutta käytettäessä, aineen riittävä dispersio voidaan varmistaa erikoismenetelmien (esimerkiksi ultraäänidispersion) avulla.

Jos tulokseksi saadaan pieniä arvoja, tulosten tulkinnassa ja testipitoisuuksien valinnassa voidaan käyttää kemikaalien myrkyllisyystietoja.

1.2 YKSIKÖT JA MÄÄRITELMÄT

Määritelmän mukaan BOD on liuenneen hapen massa, joka tarvitaan testattavan aineen annetun liuostilavuuden biokemialliseen hapettamiseen annetuissa olosuhteissa.

Tulokset ilmaistaan BOD-massana (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

1.3 VERTAILUAINEET

Sopivan vertailuaineen käyttöä siirrosaineen aktiviteetin tarkistamiseksi suositellaan.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnettuun määrään ainetta, joka on liuotettu tai dispergoitu hyvin ilmastettuun, sopivaan liuokseen, siirrostetaan mikroeliöitä, ja siirrostettua liuosta inkuboidaan pimeässä ja vakiolämpötilassa.

BOD-arvo määritetään liuenneen hapen alku- ja loppupitoisuuden perusteella. Testin kesto on 5–28 päivää.

Rinnan testiliuoksen kanssa on käytettävä taustaliuosta, jossa ei ole testattavaa ainetta.

1.5 LAATUKRITEERIT

BOD-määritystä ei hyväksytä aineen biohajoavuuden määrityksenä. BOD-määritystä voidaan käyttää vain seulontatestinä.

1.6 MENETELMÄKUVAUS

Aineesta valmistetaan alustava liuos tai dispersio, jonka BOD-pitoisuus on sopiva testimenetelmää varten. Liuoksen tai dispersion BOD-arvo määritetään sopivan kansallisen tai kansainvälisen standardisoidun menetelmän avulla.

▼B

2. **TIEDOT JA ARVIOINTI**

Alustavan liuoksen BOD-arvo lasketaan valitun menetelmän mukaan, ja tulos muunnetaan BOD-massaksi (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

3. **RAPORTOINTI**

Käytetty menetelmä ilmoitetaan.

Ilmoitettavan biokemiallisen hapenkulutuksen arvon on oltava vähintään kolmen hyväksyttävän mittauksen keskiarvo.

Kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, on ilmoitettava. Tämä koskee erityisesti epäpuhtauksia, aineen fysikaalista olomuotoa, myrkyllisyyttä ja muita aineen ominaisuuksia, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin.

Jos apuainetta on käytetty biologisen nitrifikaation estämiseksi, tämä on raportoitava.

4. VIITTEET

Seuraavassa on esimerkkejä standardisoiduista menetelmistä:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6 **HAJOAMINEN — KEMIALLINEN HAPENKULUTUS**

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Menetelmällä mitataan kiinteiden ja nestemäisten aineiden kemiallista hapenkulutusta (COD) valvotuissa laboratorio-olosuhteissa haluttua standardisoitua menettelyä noudattaen.

Testattavan aineen kemiallisen kaavan tunteminen (onko aine halogeenisuola, orgaanisen aineen ferrisuola, orgaaninen klooriyhdiste tms.) helpottaa testin suorittamista ja tulosten tulkintaa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Kemiallinen hapenkulutus on aineen hapetettavuuden mitta. Aineen kemiallinen hapenkulutus ilmaistaan hapetusaineen kulutusta vastaavana happimääränä, kun ainetta hapetetaan valvotuissa laboratorio-olosuhteissa.

Kemiallinen hapenkulutus ilmaistaan COD-massana (g) testattavan aineen massaa (g) kohti.

1.3 VERTAILUAINEET

Uutta ainetta tutkittaessa ei aina tarvitse käyttää vertailuaineita. Vertailuaineita käytetään lähinnä menetelmän toimivuuden ajoittaiseen tarkistamiseen ja verrattaessa tuloksia muiden menetelmien avulla saatuihin tuloksiin.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnettua määrää veteen liuotettua tai dispergoitua ainetta hapetetaan kaliumdikromaatilla väkevässä rikkihapossa vastavirtaperiaatteen mukaan kahden tunnin ajan. Katalysaattorina käytetään hopeasulfaattia. Dikromaattijäännös määritetään standardisoidulla ferriammoniumsulfaatilla titraamalla.

Jos testattava aine sisältää klooria, liuokseen lisätään elohopeasulfaattia (*) kloridin aiheuttaman häiriön vähentämiseksi.

1.5 LAATUKRITEERIT

Koska COD-arvon määritysmenetelmä on tulkinnanvarainen,

COD-arvo on ”hapetettavuusindikaattori” ja sellaisenaan käytännöllinen tapa mitata orgaanista ainetta.

Jotkin rengasyhdisteet ja monet haihtuvat aineet (esimerkiksi lyhytketjuiset rasvahapot) eivät hapetu tässä testissä täysin.

1.6 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Valmistetaan aineen alustava liuos tai dispersio siten, että tuloksena saatava COD-arvo on 250–600 mg/l.

(*) Elohopeasuoloja sisältävät liuokset on käytön jälkeen käsiteltävä siten, ettei ympäristöön pääse elohopeaa.

▼B

Huomautuksia:

Jos aine on huonosti liukenevaa tai dispergoitumatonta, testilaitteeseen voidaan panna veteen sekoitettuna hienoksi jauhettua tai nestemäistä ainetta, joka vastaa määrältään noin 5 mg:aa COD:tä.

Kemiallinen hapenkulutus (COD) voidaan usein — etenkin huonosti liukenevien aineiden kohdalla — määrittää käyttäen menetelmän muunnosta, joka perustuu paineentasaajalla varustettuun suljettuun järjestelmään (H. Kelkenberg, 1975). Muunnoksen avulla voidaan usein tehdä menestyksekkäästi kvantitatiivinen määritys aineista (esimerkiksi etikkahaposta), joiden määrittäminen perinteisellä menetelmällä on vaikeaa. Menetelmää ei kuitenkaan voida soveltaa pyridiiniin. Kaliumdikromaattipitoisuuden (katso viitettä 1) nostaminen arvoon 0,25 N (0,0416 M) mahdollistaa testattavan aineen suorapunnituksen 5–10 mg:n annoksena, mikä on tärkeää huonosti veteen liukenevien aineiden COD-määrityksessä (katso viitettä 2).

Muussa tapauksessa COD-arvo määritetään sopivan kansallisen tai kansainvälisen standardisoidun menetelmän avulla.

2. **TIEDOT JA ARVIOINTI**

Testipullojen sisällön COD lasketaan valitun normalisoidun menetelmän mukaan ja muunnetaan COD-massaksi (g) testatun aineen massaa (g) kohti.

3. **RAPORTOINTI**

Raportissa on oltava maininta käytetystä vertailumenetelmästä.

Ilmoitetun kemiallisen hapenkulutuksen arvon on oltava vähintään kolmen mittauksen keskiarvo. Kaikki tiedot ja huomautukset, joilla on merkitystä tulosten tulkinnan kannalta, on ilmoitettava. Tämä koskee erityisesti epäpuhtauksia, aineen fysikaalista olomuotoa, myrkyllisyyttä tai aineen muita tunnettuja ominaisuuksia, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin.

Jos kloridin häiritsevä vaikutus on pyritty minimoimaan elohopeasulfaatilla, tämä on raportoitava.

4. **VIITTEET**

1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphcre, 1984, vol. 13, 169.

Seuraavassa on esimerkkejä normalisoiduista menetelmistä.

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NFN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. **HAJOAMINEN — ABIOOTTINEN HAJOAMINEN: HYDROLYYSI PH:N FUNKTIONA**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro TG 111 (2004).

1.1 JOHDANTO

Kemikaalit voivat päästä pintavesiin esimerkiksi suoraan laskettuina, lentosumutuksen yhteydessä, valumana sekä viemäröinnin, jätteiden käsittelyn, teollisuuden, kotitalouden tai maanviljelyn päästöinä ja ilmakehän laskeumina. Ne voivat sen jälkeen hajota vesissä kemiallisten (esim. hydrolyysi ja hapettuminen), valokemiallisten ja/tai mikrobiprosessien kautta. Tässä testiohjeessa kuvataan laboratoriotestimenetelmä, jolla voidaan arvioida kemikaalien abioottinen hydrolyyttinen hajoaminen vesiympäristössä pH-arvoilla, jotka siellä tavallisesti vallitsevat (pH 4–9). Menetelmä perustuu jo olemassa oleviin testiohjeisiin (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Kokeissa määritetään i) testiaineen hydrolyysinopeus pH:n funktiona ja ii) hydrolyysituotteet, joille organismit voivat altistua, sekä niiden muodostumis- ja hajoamisnopeudet. Tällaisia tutkimuksia voivat edellyttää kemikaalit, jotka annostellaan suoraan veteen tai jotka päätyvät ympäristöön edellä mainittujen muiden reittien kautta.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Katso liite 2.

1.3 MENETELMÄN SOVELTAMISALA

Testi soveltuu kemiallisille aineille (merkityille tai merkitsemättömille), joille on olemassa analyysimenetelmä, jota voidaan soveltaa riittävällä tarkkuudella ja herkkyydellä. Tässä kuvattua menetelmää voidaan soveltaa lievästi haihtuviin ja haihtumattomiin yhdisteisiin, jotka ovat riittävän vesiliukoisia. Menetelmää ei voida soveltaa kemikaaleihin, jotka haihtuvat helposti vedestä (esim. savuavat aineet tai orgaaniset liuottimet) ja jotka eivät siis säily liuoksessa tässä kuvatuissa testiolosuhteissa. Testiä voi olla vaikea toteuttaa aineilla, joiden vesiliukoisuus on hyvin vähäinen (8).

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiaine lisätään steriileihin vesipohjaisiin puskuriliuoksiin, joilla on eri pH-arvot (pH 4, 7 ja 9). Liuoksia inkuboidaan sitten pimeässä valvotuissa laboratorio-olosuhteissa (vakiolämpötiloissa). Puskuriliuoksissa oleva testiaine ja hydrolyysituotteet analysoidaan sopivin väliajoin. Kun testiaine on merkitty jollain merkkiaineella (esim. ^{14}C), massatase voidaan määrittää helpommin.

Testimenetelmä on suunniteltu monivaiheiseksi liitteessä 1 kuvatulla tavalla. Kukin vaihe riippuu edellisen vaiheen tuloksista.

▼B

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Hydrolyysinopeuden mittaamiseen voidaan käyttää merkittyä tai merkitsemätöntä testiainetta. Merkittyä testiainetta suositellaan yleensä hydrolyysireittien tutkimiseen ja massataseen määrittämiseen. On kuitenkin tapauksia, joissa merkkiaineen käyttö ei ole ehdottoman välttämätöntä. ^{14}C on suositeltava leima, mutta muitakin isotooppeja, kuten ^{13}C, ^{15}N tai ^{3}H, voidaan käyttää. Leiman pitäisi mahdollisuuksien mukaan sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa. Jos testiainemolekyyli sisältää esimerkiksi yhden renkaan, tämä rengas täytyy merkitä. Jos testiaine sisältää kaksi tai useampia renkaita, saatetaan tarvita erillinen testi kunkin merkityn renkaan reitin arvioimiseksi ja tarvittavan tiedon saamiseksi hydrolyysituotteiden muodostumisesta. Testiaineen puhtausasteen tulisi olla vähintään 95 %.

Ennen hydrolyysitestin tekemistä testiaineesta on oltava saatavilla seuraavat tiedot:

(a) vesiliukoisuus [testimenetelmä A.6];

(b) liukoisuus orgaanisiin liuottimiin;

(c) höyrynpaine [testimenetelmä A.4] ja/tai Henryn lain vakio;

(d) n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin [testimenetelmä A. 8];

(e) dissosiaatiovakio (pK_a) [OECD:n testiohje 112] (9);

(f) suoran ja epäsuoran valokemiallisen muuntumisen nopeus vedessä (valoherkän aineen ollessa kyseessä).

Käytettävissä on oltava analyysimenetelmät testiaineen kvantifioimiseksi sekä tarvittaessa hydrolyysituotteiden tunnistamiseksi ja kvantifioimiseksi vesiliuoksista (katso myös kohta 1.7.2).

1.6 VERTAILUAINEET

Mikäli mahdollista, hydrolyysituotteiden tunnistukseen ja kvantifiointiin on käytettävä vertailuaineita. Menetelminä käytetään spektroskopiaa ja kromatografiaa tai muita menetelmiä, joiden herkkyys on sopiva.

1.7 LAATUVAATIMUKSET

1.7.1 **Saanto**

Vähintään kahden puskuriliuoksen tai niiden uutteiden analysointi heti testiaineen lisäämisen jälkeen antaa alustavia tietoja analyysimenetelmän toistettavuudesta ja testiaineen lisäämismenetelmän tasaisuudesta. Saanto testin myöhemmissä vaiheissa määritetään vastaavan massataseen mukaan (kun käytetään merkittyä ainetta). Saantojen tulisi olla 90–110 % sekä merkittyä että merkitsemätöntä ainetta käytettäessä (7). Jos tätä on teknisesti vaikea saavuttaa, merkitsemättömien aineiden osalta hyväksytään 70 prosentin saanto, mutta tämä on perusteltava.

▼B

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Testiaineen ja hydrolyysituotteiden myöhempään kvantifiointiin käytettävän analyysimenetelmän tai -menetelmien toistettavuus voidaan tarkistaa kaksoismäärittämällä samat puskuriliuokset (tai niiden uutteet) sen jälkeen, kun on muodostunut riittävästi hydrolyysituotteita kvantifioitavaksi.

Analyysimenetelmän on oltava riittävän herkkä, jotta sen avulla voidaan kvantifioida testiaineen pitoisuudet, jotka ovat 10 % alkuperäisestä pitoisuudesta tai tätä vähemmän. Tarvittaessa analyysimenetelmien pitäisi olla myös riittävän herkkiä, jotta niiden avulla voidaan (milloin tahansa tutkimuksen aikana) kvantifioida hydrolyysituotteet, jotka ovat 10 prosenttia tai enemmän annostellusta testiaineesta, ja kvantifioinnin on oltava mahdollista pitoisuuksissa, jotka ovat 25 % suurimmasta pitoisuudesta tai tätä vähemmän.

1.7.3 **Hydrolyysin kineettisten mittaustietojen luottamusvälit**

Luottamusvälit on laskettava ja esitettävä kaikille regressiokertoimille, nopeusvakioille, puoliintumisajoille ja mahdollisille muille kineettisille parametreille (esim. DT50).

1.8 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Laitteet**

Testi on suoritettava lasiastioissa (esimerkiksi koeputkissa tai pulloissa), tarvittaessa pimeässä ja steriileissä olosuhteissa, paitsi jos esitiedot (kuten n-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin) osoittavat, että testiaine saattaa kiinnittyä lasiin. Tällöin voidaan harkita jonkin muun materiaalin, esimerkiksi teflonin, käyttöä. Jos testiaineen tiedetään kiinnittyvän lasiin, ongelmaa voidaan helpottaa myös yhdellä tai useammilla seuraavista tavoista:

— Määritetään testiastiaan kiinnittyneen testiaineen ja hydrolyysituotteiden massa.

— Käytetään ultraäänihaudetta.

— Pestään kaikki lasitavarat liuottimella kunkin näytteenottokerran jälkeen.

— Käytetään kaupallisia valmisteita.

— Lisätään testiaine järjestelmään lisäliuottimen avulla; tällöin lisäliuottimen on oltava aine, joka ei hydrolysoi testiainetta.

Yleensä vaatimuksena on, että eri testiliuosten inkubointiin käytetään lämpötilakontrolloituja vesihauderavistimia tai termostaattisesti ohjattuja inkubaattoreita.

Testissä tarvitaan tavanomaisia laboratoriolaitteita, erityisesti seuraavia:

— pH-mittari,

▼B

— analyyttiset laitteet, kuten GC-, HPLC- ja TLC-laitteet, mukaan luettuina radioaktiivisten tai muiden kuin radioaktiivisten merkkiaineiden osoittamiseen soveltuvat järjestelmät tai käänteinen isotooppilaimennusmenetelmä,

— tunnistukseen käytettävät laitteet (esimerkiksi MS-, GC-MS-, HPLC-MS-spektrometri tai NMR-laite),

— nestetuikelaskin,

— erotussuppilot neste-neste-uuttoa varten,

— liuosten ja uutteiden konsentrointivälineet (esimerkiksi pyörähaihdutin),

— lämpötilakontrolloitu laite (esim. vesihaude).

Esimerkiksi seuraavia kemiallisia reagensseja tarvitaan:

— orgaaniset liuottimet (analyysilaatu), kuten heksaani tai dikloorimetaani,

— tuikeneste,

— puskuriliuokset (tiedot kohdassa 1.8.3).

Kaikki hydrolyysitesteissä käytettävät lasiastiat, vesi (reagenssilaatu) ja puskuriliuokset on steriloitava.

1.8.2 **Testiaineen annostelu**

Testiaine annostellaan vesiliuoksena eri puskuriliuoksiin (katso liite 3). Jos riittävä liukeneminen sitä edellyttää, testiaineen annostelussa voidaan käyttää pieniä määriä veteen sekoittuvia liuottimia (esimerkiksi asetonitriiliä, asetonia tai etanolia), mutta niiden määrä ei saa yleensä olla enempää kuin 1 tilavuusprosentti. Mikäli liuottimia aiotaan käyttää suurempina pitoisuuksina (esim. kun on kyse huonoliukoisista testiaineista), tämä sallitaan vain, jos voidaan osoittaa, että liuottimella ei ole vaikutusta testiaineiden hydrolyysiin.

Kaupallisten valmisteiden käyttö testissä ei ole yleensä suositeltavaa, koska ei voida sulkea pois sitä mahdollisuutta, että valmisteen ainesosat voivat vaikuttaa hydrolyysiprosessiin. Mikäli on kuitenkin kyse huonosti vesiliukoisista aineista tai lasiin kiinnittyvistä aineista (katso kohta 1.8.1), kaupallisten valmisteiden käyttö voi olla sopiva vaihtoehto.

Testiainetta saisi käyttää vain yhdessä pitoisuudessa, joka ei saisi olla yli 0,01 M tai yli puolet kyllästymispitoisuudesta (katso liite 1).

▼B

1.8.3 **Puskuriliuokset**

Hydrolyysitesti olisi toteutettava pH-arvoilla 4, 7 ja 9. Tätä varten puskuriliuokset olisi valmistettava käyttäen reagenssilaadun kemikaaleja ja vettä. Joitain sopivia puskurijärjestelmiä esitellään liitteessä 3. On huomattava, että puskurijärjestelmä voi vaikuttaa hydrolyysin nopeuteen. Jos tällainen vaikutus havaitaan, olisi käytettävä jotain muuta puskurijärjestelmää1 ([1]).

Kunkin puskuriliuoksen pH olisi tarkistettava kalibroidulla pH-mittarilla vähintään pH-yksikön kymmenesosan tarkkuudella ja vaaditussa lämpötilassa.

1.8.4 **Koeolosuhteet**

1.8.4.1 *Testilämpötila*

Hydrolyysikokeet on suoritettava vakioiduissa lämpötiloissa. Ekstrapolointitarkoituksia varten on tärkeää, että lämpötilaa ylläpidetään vähintään tarkkuudella 0,5 °C.

Alustava testi (vaihe 1) olisi suoritettava lämpötilassa 50 °C, jos testiaineen hydrolyyttinen käyttäytyminen on tuntematon. Seuraavan vaiheen kineettiset testit olisi suoritettava vähintään kolmessa lämpötilassa (mukaan lukien 50 °C:ssa suoritettava testi), ellei vaiheen 1 testissä todettu, että testiaine on hydrolyyttisesti stabiili. Suositeltava lämpötila-alue on 10–70 °C (mielellään siten, että ainakin yksi käytetty lämpötila on alle 25 °C). Tämä lämpötila-alue kattaa raportointilämpötilan 25 °C ja useimmat kentällä vallitsevat lämpötilat.

1.8.4.2 *Valo ja happi*

Kaikki hydrolyysitestit on suoritettava käyttäen sopivaa menetelmää, jolla vältetään fotolyyttiset vaikutukset. Happi pitäisi pyrkiä poistamaan kaikin sopivin tavoin (esim. poreiluttamalla heliumia, typpeä tai argonia viiden minuutin ajan ennen liuoksen valmistamista).

1.8.4.3 *Testin kesto*

Alustavan testin kesto on viisi päivää, ja myöhempien vaiheiden testejä tulisi jatkaa, kunnes 90 % testiaineesta on hydrolysoitunut, tai 30 päivän ajan sen mukaan, kumpi on varhaisempi.

1.8.5 **Testin suorittaminen**

1.8.5.1 *Alustava testi (vaihe 1)*

Alustava testi suoritetaan lämpötilassa 50 ± 0,5 °C ja pH-arvoilla 4,0, 7,0 ja 9,0. Jos viiden päivän jälkeen havaittu hydrolyysi on vähemmän kuin 10 % ($t^{0,5}$25 °C > 1 vuosi), testiaine katsotaan hydrolyyttisesti stabiiliksi ja lisätestausta ei yleensä tarvita. Jos aineen tiedetään olevan epästabiili sellaisissa ympäristön lämpötiloissa ([2]), joissa aine esiintyy, alustavaa testiä ei vaadita. Analyysimenetelmän on oltava riittävän tarkka ja herkkä, jotta sillä voidaan havaita 10 prosentin vähennys alkuperäisestä pitoisuudesta.

([1]) Mabey ja Mill suosittelevat boraatti- tai asetaattipuskurin käyttöä fosfaattipuskurin sijaan (11).

([2]) Tällainen tieto voi olla peräisin muista lähteistä, kuten rakenteellisesti samankaltaisten yhdisteiden hydrolyysitiedoista (kirjallisuudesta) tai muista alustavista semikvantitatiivisista hydrolyysitesteistä, joissa testiainetta on testattu aiemmassa kehitysvaiheessa.

▼B

1.8.5.2 *Epästabiilien aineiden hydrolyysi (vaihe 2)*

Seuraavan vaiheen testi suoritetaan niillä pH-arvoilla, joilla testiaine todettiin epästabiiliksi alustavassa testissä. Testiaineen puskuriliuosten lämpötila säädetään valittuihin lämpötiloihin termostaatin avulla. Ensimmäisen kertaluvun reaktioiden testaamiseksi kukin reaktioliuos analysoidaan sellaisin aikavälein, että saadaan ainakin kuusi datapistettä, yleensä alueella, joka vastaa 10–90 prosentin hydrolyysiä. Yksittäiset rinnakkaiset testinäytteet (vähintään kaksi rinnakkaista näytettä erillisissä reaktioastioissa) otetaan ja niiden sisältö analysoidaan kussakin vähintään kuudesta näytteenottoajankohdasta (ts. vähintään kaksitoista kaksoismääritettyä datapistettä). Ei riitä, että käytetään yhtä ainoaa näytettä, josta otetaan yhtä suuret määrät testiliuosta kunakin näytteenottoajankohtana, koska tämä ei mahdollista vaihtelukertoimen määritystä ja voi johtaa ongelmiin testiliuoksen kontaminoitumisen vuoksi. Tämän vaiheen lopussa (ts. kun hydrolyysi on 90-prosenttinen tai 30 päivän jälkeen) on suoritettava testi steriiliyden vahvistamiseksi. Jos hajoamista ei havaita, steriiliystestiä ei katsota tarpeelliseksi.

1.8.5.3 *Hydrolyysituotteiden tunnistaminen (vaihe 3)*

Hydrolyysituotteet ja ainakin sellaiset, jotka edustavat > 10 %:a annostellusta määrästä, on tunnistettava sopivilla analyysimenetelmillä.

1.8.5.4 *Vapaaehtoiset lisätestit*

Hydrolyyttisesti epästabiili testiaine voi edellyttää lisätestejä myös muilla pH-arvoilla kuin 4, 7 ja 9. Esimerkiksi fysiologisia tarkoituksia varten voidaan tarvita happamampien olosuhteiden testi (esim. pH 1,2), jossa käytetään yhtä ainoaa fysiologisesti relevanttia lämpötilaa (37 ^{o}C).

2. **TULOKSET**

Testiaineen ja hydrolyysituotteiden määrät annetaan prosentteina annostellusta lähtöpitoisuudesta ja tarvittaessa yksikkönä mg/l kunkin näytteenottovälin osalta ja kunkin pH-arvon ja testilämpötilan osalta. Lisäksi massatase pitäisi antaa prosentteina annostellusta lähtöpitoisuudesta, jos on käytetty leimattua testiainetta.

Testiaineen pitoisuuksista ajan funktiona olisi annettava graafinen esitys logaritmiasteikolla. Mahdolliset hydrolyysituotteet ja ainakin sellaiset, jotka edustavat ≥ 10 %:a annostellusta määrästä, on tunnistettava ja niiden pitoisuuksia koskevat tiedot esitettävä samalla tavalla graafisesti logaritmiasteikolla kuin alkutuotteen osalta siten, että niiden muodostumis- ja hajoamisnopeudet voidaan määrittää.

▼B

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Puoliintumisajat tai DT_{50}-arvot on määriteltävä tarkemmin sopivalla kinetiikkamalliin perustuvalla laskutavalla. Puoliintumisaikojen arvot ja/tai DT_{50}-arvot (mukaan luettuina luottamusvälit) on ilmoitettava kunkin pH-arvon ja lämpötilan osalta. Samalla on ilmoitettava käytetty malli, kinetiikan kertaluku ja determinaatiokerroin (r^2). Tarvittaessa laskelmat on tehtävä myös hydrolyysituotteista.

Suoritettaessa nopeustutkimuksia eri lämpötiloissa pseudo-ensimmäisen kertaluvun hydrolyysireaktion nopeusvakiot ($k_{obs} = k_{hav}$) pitäisi esittää lämpötilan funktiona. Laskemisen täytyisi pohjautua sekä hydrolyysityypeittäin (happokatalysoitu, neutraali tai emäskatalysoitu) eriteltyihin havaittuihin nopeusvakioihin (vastaavasti k_H, $k_{neutraali}$ tai k_{OH}) että Arrheniuksen yhtälöön:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

jossa A_i ja B_i ovat regressiovakioita parhaiten sopivien suorien vastaavasta leikkauskohdasta ja kulmakertoimesta. Vakiot on saatu lineaarisella regressiolla kuvaajasta ln (k_i) vs. 1/T. Soveltamalla Arrheniuksen yhtälöä hapon katalysoimaan, neutraaliin tai emäksen katalysoimaan hydrolyysiin voidaan pseudo-ensimmäisen kertaluvun hydrolyysin nopeusvakiot ja siten myös puoliintumisajat laskea muille lämpötiloille, joille ei ole mahdollista toteuttaa suoraa, kokeellista nopeusvakion määrittämistä (10).

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Useimpien hydrolyysireaktioiden reaktionopeus on lähellä ensimmäisen kertaluvun reaktion nopeutta, joten puoliintumisajat riippuvat pitoisuudesta (katso yhtälö 4 liitteessä 2). Tämä merkitsee sitä, että välillä 10^{-2}-10^{-3} määritetyt laboratoriotulokset ovat siirrettävissä ympäristöolosuhteisiin ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey ja Mill (11) mainitsevat useita esimerkkejä puhtaassa vedessä ja luonnonvesissä mitattujen hydrolyysinopeuksien hyvästä keskinäisestä vastaavuudesta useiden kemikaalien osalta, edellyttäen että sekä pH että lämpötila oli mitattu.

3. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysikokemialliset ominaisuudet (katso kohta 1.5),

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineella leimatun kemikaalin leiman puhtaus ja molaarinen aktiivisuus tapauksen mukaan.

▼B

— Puskuriliuokset:

— valmistusajankohdat ja –tiedot,

— käytetyt puskurit ja vedet,

— puskuriliuosten molaarisuus ja pH.

Testiolosuhteet:

— testien suorituspäivämäärät,

— testiaineen annosteltu määrä,

— testiaineen annostelutapa ja annostelussa käytetyt liuottimet (tyyppi ja määrä),

— testiaineen sisältävien puskuriliuosten inkuboinnissa käytetty volyymi,

— kuvaus käytetystä inkubointijärjestelmästä,

— pH ja lämpötila testin aikana,

— näytteenottoajankohdat,

— erotusmenetelmä(t),

— menetelmät testiaineen ja hydrolyysituotteiden kvantifioimiseksi ja tunnistamiseksi puskuriliuoksista,

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys,

— saannot (kohdassa 1.7.1 annetaan validissa testissä saavutettavat prosenttiarvot),

— rinnakkaisnäytteiden mittaustulokset ja keskiarvot taulukkomuodossa,

— massatase testien aikana ja niiden lopuksi (kun käytetään merkkiainetta),

— alustavan testin tulokset,

— tulosten pohdinta ja tulkinta,

— kaikki alkuperäiset mittaustulokset ja luvut.

Seuraavat tiedot tarvitaan vain, kun määritetään hydrolyysinopeus:

— graafiset esitykset testiaineiden ja tarvittaessa hydrolyysituotteiden pitoisuuksista ajan funktiona ja kussakin pH-arvossa ja lämpötilassa,

— Arrheniuksen yhtälöstä saadut tulokset lämpötilalle 20 °C/25 °C, mukana pH, nopeusvakio [h^{-1} tai $päivä^{-1}$], puoliintumisaika tai DT_{50}, lämpötilat [°C] (mukaan luettuina luottamusvälit) sekä korrelaatiokertoimet (r^2) tai vastaavat tiedot,

— ehdotettu hydrolyysireitti.

▼B

4. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltensvon Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

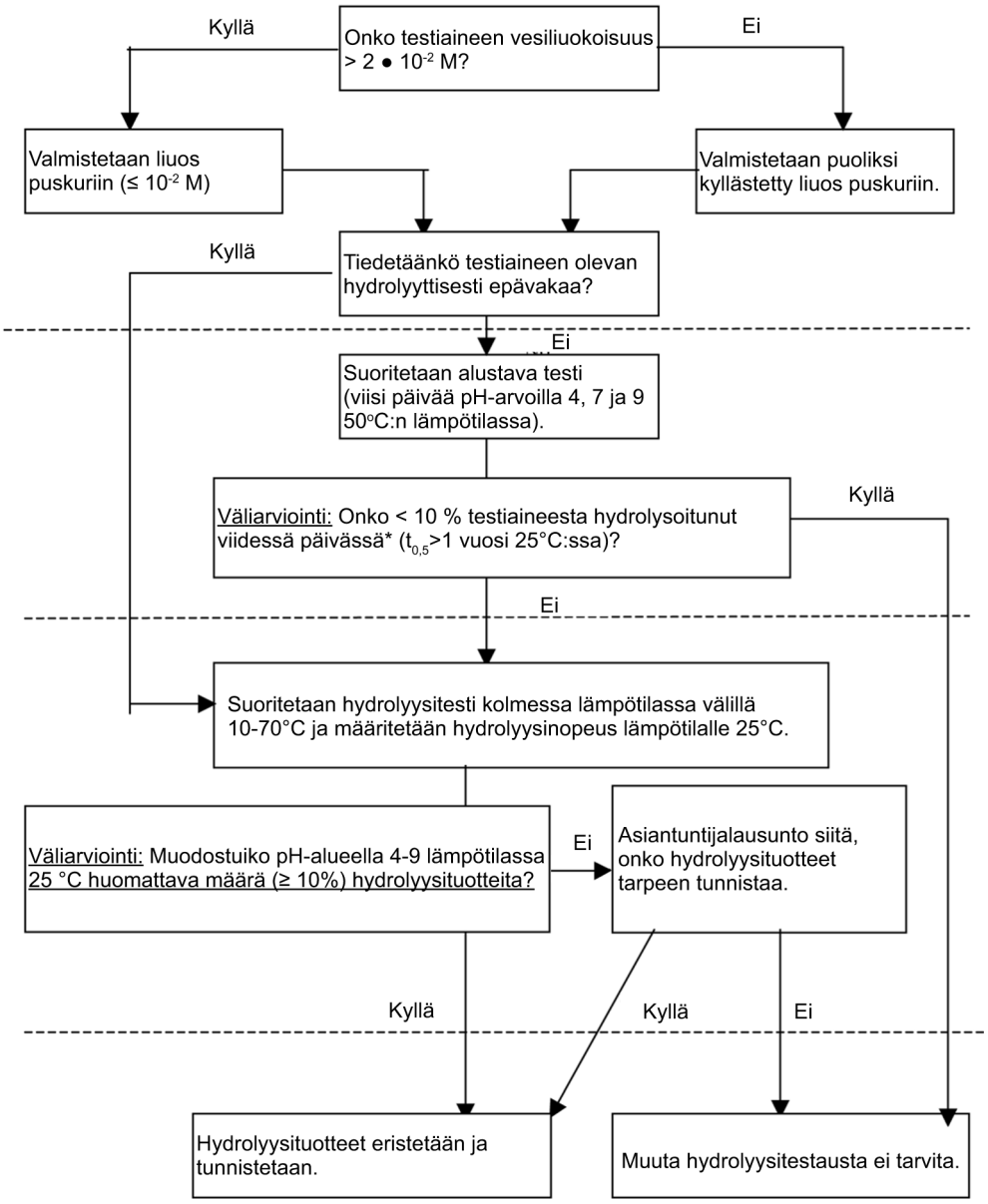
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383–415.

▼B

Liite 1

Vaiheittainen hydrolyysitestimalli



* Jos 10 % testiaineesta hydrolysoituu 50 °C:ssa, vastaa se noin 30 päivän puoliintumisaikaa, mikä vastaa noin arvoa 1 vuosi 25°C:ssa.

▼B

Liite 2

Määritelmät ja yksiköt

Kaikissa tapauksissa on käytettävä **kansainvälisen SI-standardin mukaisia yksikköjä.**

Testiaine: mikä tahansa aine, joko lähtöaine tai merkitykselliset hajoamistuotteet.

Muuntumistuotteet: kaikki aineet, jotka syntyvät testiaineen bioottisista tai abioottisista muuntumisreaktioista.

Hydrolyysituotteet: kaikki aineet, jotka syntyvät testiaineen hydrolyyttisistä muuntumisreaktioista.

Hydrolyysi: testiaineen RX reaktio veden kanssa sillä lopputuloksella, että ryhmä X vaihtuu OH:n kanssa reaktiokeskuksessa.

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Tässä yksinkertaistetussa prosessissa nopeus, jolla RX:n pitoisuus vähenee, on seuraavien kaavojen mukainen:

nopeus = $k\ [H_2O]\ [RX]$ toisen kertaluvun reaktio

tai

nopeus = $k\ [RX]$ ensimmäisen kertaluvun reaktio

riippuen reaktionopeutta määräävästä vaiheesta. Koska vettä on paljon enemmän kuin testiainetta, tämäntyyppinen reaktio kuvataan yleensä pseudo-ensimmäisen kertaluvun reaktiona, jossa havaittu nopeusvakio on

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

ja reaktionopeus voidaan määrittää lausekkeesta (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

jossa

t = aika

ja C_o, C_t = RX:n pitoisuudet ajankohdissa 0 ja t.

Tämän vakion yksiköiden dimensio on $(\text{aika})^{-1}$, ja reaktion puoliintumisaika (aika, jossa 50 % RX:stä on reagoinut) on

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Puoliintumisaika: ($t_{0,5}$) on aika, joka kuluu testiaineen 50-prosenttiseen hydrolyysiin tapauksissa, joissa hajoaminen voidaan kuvata ensimmäisen kertaluvun kinetiikan avulla; se ei riipu pitoisuudesta.

(*) Jos mittaustulosten esitys logaritmisessa asteikossa ajan funktiona ei osoita lineaarista funktiota (joka vastaa ensimmäisen kertaluvun reaktionopeutta), yhtälöä [3] ei voida käyttää testiyhdisteen hydrolyysivakion määrittämiseen.

▼B

DT_{50} (häviämisaika 50): aika, jonka kuluessa testiaineen pitoisuus vähenee 50 %:lla; se eroaa puoliintumisajasta $t_{0,5}$, kun reaktio ei ole ensimmäisen kertaluvun kinetiikan reaktio.

k:n arvioiminen eri lämpötiloissa

Kun nopeusvakiot tiedetään kahdessa lämpötilassa, nopeusvakiot voidaan laskea muiden lämpötilojen osalta käyttämällä Arrheniuksen yhtälöä:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ orln } k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Kun ln k esitetään graafisesti 1/T:n funktiona, saadaan suora viiva, jonka kulmakerroin on -E/R.

Tällöin:

k = eri lämpötiloissa mitattu nopeusvakio

E = aktivaatioenergia [kJ/mol]

T = absoluuttinen lämpötila [K]

R = kaasuvakio [8,314 J/mol.K]

Aktivaatioenergia lasketaan regressioanalyysillä tai seuraavalla yhtälöllä:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

Tällöin: $T_2 > T_1$.

▼B

Liite 3

Puskurijärjestelmät

A. **CLARK JA LUBS:**

Clarkin ja Lubsin puskuriseokset (*)

Koostumus	pH
0,2 N HC1 JA 0,2 N KC1 20 °C:ssa	
47,5 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,0
32,25 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,2
20,75 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,4
13,15 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,6
8,3 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	1,8
5,3 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	2,0
3,35 ml. HC1 + 25 ml. KC1 laimennettuna 100 ml:aan	2,2
0,1 M kaliumbiftalaatti + 0,1 N HC1 20 °C:ssa	
46,70 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	2,2
39,60 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	2,4
32,95 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	2,6
26,42 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	2,8
20,32 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,0
14,70 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,2
9,90 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,4
5,97 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,6
2,63 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	3,8
0,1 M kaliumbiftalaatti + 0,1 N NaOH 20 °C:ssa	
0,40 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,0
3,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,2
7,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,4
12,15 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,6
17,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	4,8

(*) Näissä taulukoissa ilmoitetut pH-arvot on laskettu potentiaalimittausten perusteella käyttäen Sörensenin vakioyhtälöitä (1909). Vastaavat pH-arvot ovat 0,04 yksikköä suuremmat kuin taulukossa olevat arvot.

▼B

Koostumus	pH
23,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,0
29,95 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,2
35,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,4
39,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,6
43,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	5,8
45,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. biftalaattia 100 ml:aan	6,0
0,1 M monokaliumfosfaatti + 0,1 N NaOH 20 °C:ssa	
5,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,0
8,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,2
12,60 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,4
17,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,6
23,45 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	6,8
29,63 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,0
35,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,2
39,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,4
42,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,6
45,20 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	7,8
46,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. fosfaattia 100 ml:aan	8,0
0,1 M H3B03 0,1 M KC1:ssa + 0,1 N NaOH 20 °C:ssa	
2,61 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	7,8
3,97 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,0
5,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,2
8,50 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,4
12,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,6
16,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	8,8
21,30 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,0
26,70 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,2

▼B

32,00 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,4
36,85 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,6
40,80 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	9,8
43,90 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. boorihappoa 100 ml:aan	10,0

B. **KOLTHOFF JA VLEESCHHOUWER:**

Kolthoffin ja Vleeschhouwerin sitraattipuskurit

Koostumus	pH
0,1 M monokaliumsitraatti ja 0,1 N HC1 18 °C:ssa (*)	
49,7 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	2,2
43,4 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	2,4
36,8 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	2,6
30,2 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	2,8
23,6 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,0
17,2 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,2
10,7 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,4
4,2 ml. 0,1 N HC1 + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,6
0,1 M monokaliumsitraatti ja 0,1 N NaOH 18 °C:ssa (*)	
2,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	3,8
9,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,0
16,3 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,2
23,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,4
31,5 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,6
39,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	4,8
46,7 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,0
54,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,2
61,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,4
68,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,6
74,4 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	5,8
81,2 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml. sitraattia 100 ml:aan	6,0

(*) Lisätään pieni tymolikide tai muuta samantyyppistä ainetta homesienien kasvun estämiseksi.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Sörensenin boraattiseokset

Koostumus		Sörensen 18 °C	Walbum, pH		
ml. Borax	ml. HC1/NaO H		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borax + + 0,1 N HC1					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borax + + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Sörensenin fosfaattiseokset

Koostumus	pH
0,0667 M monokaliumfosfaatti + 0,0667 M dinatriumfosfaatti 20 °C:ssa	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH2PO4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH2PO4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8 MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MADOILLA

KEINOMAATESTI

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Tässä laboratoriokokeessa testattavaa ainetta lisätään keinotekoiseen maahan, jossa matoja pidetään 14 vuorokautta. Tämän ajan kuluttua (ja valinnaisesti 7 vuorokauden kuluttua) aineen tappava vaikutus matoihin tutkitaan. Tällä testillä voidaan suhteellisen lyhyen ajan kuluessa seuloa ravinnon yhteydessä saatujen tai ihon kautta imeytyneiden kemikaalien vaikutukset matoihin.

1.2 MÄÄRITELMÄ JA YKSIKKÖ

LC_{50}: Aineen pitoisuus, jonka arvioidaan tappavan 50 % koe-eläimistä koeajan kuluessa.

1.3 VERTAILUAINE

Vertailuainetta käytetään ajoittain osoittamaan, että testin herkkyys ei ole merkittävästi muuttunut.

Vertailuaineena suositellaan käytettäväksi analyysilaatuista kloriasetamidia.

1.4 TESTIN PERIAATE

Koska mullan koostumus vaihtelee, tässä testissä käytetään tarkoin määritettyä keinotekoista savimaata. *Eisenia foetida* -lajin (ks. lisäyksen huomautus) täysikasvuisia matoja kasvatetaan koostumukseltaan tunnetussa keinotekoisessa savimaassa, johon on lisätty testattavaa ainetta erisuuruisina pitoisuuksina. Astioiden sisältö levitetään tarjottimelle 14 vuorokauden (ja valinnaisesti 7 vuorokauden) kuluttua testin alkamisesta ja elossaolevien matojen määrä lasketaan kutakin pitoisuutta kohden.

1.5 LAATUKRITEERIT

Testi on suunniteltu siten, että se on mahdollisimman helppo toistaa suhteessa käytettyyn substraattiin ja organismiin. Kontrollien kuolleisuus saa olla korkeintaan 10 % testin lopussa, muussa tapauksessa testi hylätään.

1.6 TESTIN KUVAUS

1.6.1 *Materiaalit*

1.6.1.1 Testissä käytettävä substraatti

Testin perussubstraattina käytetään määrätyn laatuista keinotekoista maata.

a) Perussubstraatti (prosentit tarkoittavat kuivapainoa):

— 10 % rahkasuoturvetta (pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä ja hienoksi jauhettuna),

▼B

— 20 % kaoliniittisavea, jossa kaoliniitin osuuden olisi oltava yli 50 %,

— noin 69 % teollista kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, jossa yli 50 % 0,05–0,2 mm:n hiukkasia). Ellei aine ole kyllin vesiliukoista, kutakin koeastiaa kohden varataan 10 g, johon testattava aine myöhemmin sekoitetaan.

— noin 1 % jauhettua, kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$), jolla pH-arvoksi säädetään 6,0 ± 0,5.

b) Testissä käytettävä substraatti:

Testissä käytettävä substraatti sisältää perussubstraattia, testattavaa ainetta ja ionisoimatonta vettä.

Vesipitoisuus on noin 25–42 % perussubstraatin kuivapainosta. Substraatin vesipitoisuus määritetään kuivaamalla näyte vakiopainoon 105 °C:n lämmössä. Päävaatimuksena on, että keinomaata on kostutettava siten, ettei siihen jää seisovaa vettä. Testattava aine on sekoitettava tasaisesti substraattiin. Testattavan aineen ja substraatin yhdistämistapa on ilmoitettava.

c) Kontrollisubstraatti:

Kontrollisubstraatti sisältää perussubstraattia ja vettä. Lisäaineita käytettäessä valmistetaan toinen kontrollisubstraatti, joka sisältää saman määrän lisäainetta.

1.6.1.2 K o e a s t i a t

Noin litran vetoisiin lasiastioihin (jotka peitetään muovikannella, lautasella tai rei'itetyllä muovikalvolla) laitetaan märkää koe- tai kontrollisubstraattia 500 g:n kuivapainoa vastaava määrä.

1.6.2 *Koeolosuhteet*

Astiat laitetaan ilmastoituun kammioon, jossa on 20 ± 2 °C:n lämpötila ja jatkuva valaistus. Valon voimakkuuden on oltava 400–800 luxia.

Koeaika on 14 vuorokautta, mutta kuolleisuus voidaan määrittää myös seitsemän vuorokauden kuluttua testin aloittamisesta.

1.6.3 *Testin suorittaminen*

T e s t i s s ä k ä y t e t t ä v ä t p i t o i s u u d e t

Testattavan aineen pitoisuudet ilmoitetaan aineen painona suhteessa perussubstraatin kuivapainoon (mg/kg).

R a j a - a n n o s t e s t i

Raja-annostestillä voidaan määrittää pitoisuusrajat, jotka aiheuttavat 0–100 % kuolleisuuden. Näiden rajojen perusteella määrätään varsinaisessa testissä käytettävät pitoisuudet.

▼B

Seuraavat pitoisuudet on testattava: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg testattavaa ainetta/kg testissä käytettyä substraattia (kuivapaino).

Mikäli varsinainen testi tehdään täydellisenä, kunkin pitoisuuden ja yhden alustamattoman kontrollin testaaminen 10 madon erällä saattaa olla riittävän tarkka raja-annostesti.

Varsinainen testi

Raja-annostestin tulosten perusteella määritetään vähintään viisi pitoisuutta geometrisenä sarjana, joka kattaa 0–100 % kuolleisuuden, ja jonka erottava vakiotekijä on korkeintaan 1,8.

Tätä pitoisuussarjaa käyttävillä testeillä olisi voitava arvioida LC_{50}-arvo ja sen luotettavuusrajat mahdollisimman tarkasti.

Varsinaisessa testissä käytetään vähintään neljää testiryhmää kullakin annostasolla sekä neljää altistamatonta kontrolliryhmää, joissa on kussakin 10 matoa. Tuloksia ilmoitettaessa näistä rinnakkaisryhmistä ilmoitetaan keskiarvot ja keskipoikkeamat.

Kun kaksi peräkkäistä pitoisuutta, joiden erottava tekijä on 1,8, antavat ainoastaan 0 % ja 100 % kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät osoittamaan LC_{50}-välin.

Testissä käytettävän perussubstraatin ja testattavan aineen seos

Testissä käytettävä substraatti on valmistettava, jos mahdollista, ilman muita lisäaineita kuin vettä, ionisoimattomaan veteen tai muuhun liuottimeen emulgoitu tai dispergoitu testattava aine sekoitetaan perussubstraattiin tai suihkutetaan tasaisesti sen pintaan hienolla kromatografisella tai vastaavalla sumuttimella juuri ennen testin alkua.

Jos aine ei liukene veteen, se voidaan liuottaa mahdollisimman pieneen määrään jotakin orgaanista liuotinta (esimerkiksi heksaamiin, asetoniin tai kloroformiin).

Vain herkästi haihtuvia liuottimia voidaan käyttää testattavan aineen liuottamiseen, dispergoimiseen tai emulgoimiseen. Testissä käytettävä substraatti on tuuletettava ennen käyttöä. Haihtuneen veden määrä on korvattava. Kontrollin on sisällettävä sama määrä apuainetta.

Ellei testattavaa ainetta voida liuottaa, dispergoida tai emulgoida orgaanisiin liuottimiin, 10 g hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa ja kuivapainoltaan 500 grammaan keinomaata tarvittava määrä testattavaa ainetta yhdistetään ja sekoitetaan 490 grammaan (kuivapaino) testissä käytettävää substraattia.

Kutakin koe-erää varten laitetaan lasiastiaan 500 gramman kuivapainoa vastaava määrä märkää koesubstraattia ja asetetaan 10 matoa koesubstraatin pinnalle. Matoja on tätä ennen sopeutettu 24 tuntia samanlaiseen märkään perussubstraattiin, jonka jälkeen ne on pesty nopeasti ja liika vesi imeytetty suodatinpaperiin.

▼B

Astiat peitetään rei'itetyillä muovikansilla, lautasilla tai kalvolla kuivumisen estämiseksi ja pidetään koeolosuhteissa 14 vuorokautta.

Määritykset suoritetaan 14 vuorokauden (ja valinnaisesti 7 vuorokauden) kuluttua testin alkamisesta. Substraatti levitetään lasia tai ruostumatonta terästä olevalle levylle. Madot tutkitaan ja elossa olevien matojen määrä lasketaan. Mato katsotaan kuolleeksi, ellei se reagoi keveään mekaaniseen etupään ärsytykseen.

Jos tutkimus tehdään 7 vuorokauden kuluttua, sama substraatti laitetaan takaisin astiaan ja elossa olevat madot sen pinnalle.

1.6.4 *Koeorganismit*

Koeorganismeina käytetään täysikasvuisia *Eisenia foetida* -matoja (ks. lisäyksen huomautus) (vähintään kahden kuukauden ikäisiä matoja, joilla on clitellum-paksunnos), joiden märkäpaino on 300–600 mg. (Kasvatus — ks. lisäys.)

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY JA ARVIOINTI

Ilmoitetaan testatun aineen pitoisuudet ja matojen kuolleisuusprosentti kutakin pitoisuutta kohden.

Mikäli LC_{50}-arvo ja luotettavuusrajat (p = 0,05) pystytään määrittämään tulosten perusteella, määritys on tehtävä jotakin standardimenetelmää käyttäen (Litchfield ja Wilcoxon, 1949 tai vastaava menetelmä). LC_{50} ilmoitetaan milligrammoina testattavaa ainetta testissä käytettyä substraattikilogrammaa (kuivapaino) kohden.

Jos pitoisuuskäyrän kaltevuus on liian jyrkkä LC_{50}-arvon laskemiseksi, graafinen arvio tästä arvosta riittää.

Kun kaksi peräkkäistä pitoisuutta, joiden erottava tekijä on 1,8, antavat ainoastaan 0 % ja 100 % kuolleisuuden, nämä kaksi arvoa riittävät osoittamaan LC_{50}-välin.

3. RAPORTOINTI

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— vakuutus, että koe on suoritettu edellä olevien laatuvaatimusten mukaisesti,

— tehty testi (raja-annostesti ja/tai varsinainen testi),

— tarkka selostus koeolosuhteista tai vakuutus, että testi on suoritettu menetelmän mukaisesti; poikkeamat on ilmoitettava,

— tarkka selostus siitä, millä tavoin testattava aine sekoitettiin testissä käytettyyn substraattiin,

— tiedot koeorganismeista, (laji, ikä, keskipaino ja painorajat, elin- ja kasvatusolosuhteet, hankintapaikka),

▼B

— LC_{50}-arvon määritysmenetelmä,

— testitulokset ja kaikki käytetyt tiedot,

— selostus koe-organismeissa havaituista oireista tai käyttäytymismuutoksista,

— kontrollien kuolleisuus,

— LC_{50} tai korkein testattu pitoisuus, joka ei aiheuttanut kuolleisuutta ja alin testattu pitoisuus, joka aiheutti 100 % kuolleisuuden 14 vuorokauden (sekä valinnaisesti 7 vuorokauden) kuluttua testin alkamisesta,

— pitoisuus/vastekäyrä,

— vertailuaineella joko tästä testistä tai aikaisemmista laaduntarkkailukokeista saadut tulokset.

4. **LÄHDELUETTELO**

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

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

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

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

5) Euroopan yhteisöjen komissio, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* Report EUR 8714 EN, 1983.

6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag ”Toxizitätstest am Regenworm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden” in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Lisäys

Matojen lisääminen ja kasvatus ennen testausta

Matoja lisättäessä 30–50 täysikasvuista matoa pannaan tuoretta substraattia sisältävään lisääntymislaatikkoon 14 vuorokauden ajaksi. Niitä voidaan käyttää lisääntymiseen useita kertoja. Munista syntyneitä matoja käytetään kokeisiin niiden tultua täysikasvuisiksi (määritellyissä olosuhteissa parin kolmen kuukauden kuluttua).

Kasvatus- ja lisääntymisolosuhteet

Ilmastoitu kammio:	20 ± 2 °C:n lämpötila ja jatkuva valaistus (valon voimakkuus 400-800 luxia).
Lisäyslaatikot:	matalia 10–20 litran vetoisia astioita.
Substraatti:	*Eisenia foetida* -matoja voidaan kasvattaa eläinten lannassa. Suositeltava lisäysalusta on sekoitus, jossa on 50 % turvetta ja 50 % hevosen tai lehmän lantaa. Elatusalustan pH-arvon on oltava 6–7 (säädetään kalsiumkarbonaatilla) ja sen ionijohtavuuden alhainen (alle 6 mm hos tai 0,5 % suolapitoisuus). Substraatin on oltava kosteaa, mutta ei märkää. Edellä esitetyn lisäksi voidaan käyttää muitakin menettelytapoja.

Huom. Eisenia foetidaa on kahta rotua, jotka eräät taksonomit ovat erottaneet eri lajeiksi (Bouche, 1972). Ne ovat morfologisesti samanlaisia, mutta toisen, *Eisenia foetida foetidan*, jaokkeissa on tyypillinen poikittainen raidoitus tai juovaisuus kun taas toiselta, vaihtelevan punaväriseltä *Eisenia foetida andreilta*, raidoitus puuttuu. *Eisenia foetida andrei* on suositeltavin koelaji. Muitakin lajeja voidaan käyttää, tarvittavien menetelmien ollessa käytössä

▼B

C.9 **BIOLOGINEN HAJOAMINEN**

ZAHN-WELLENS-TESTI

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Tämän menetelmän tarkoituksena on määrittää vesiliukoisten haihtumattomien orgaanisten aineiden mahdollinen lopullinen biologinen hajoaminen, kun ne altistetaan suurehkoille mikro-organismipitoisuuksille staattisessa testissä.

Kiinteiden aineiden suspensioissa voi tapahtua fysikaalis-kemiallista adsorpiota, ja tämä on otettava huomioon tuloksia tulkittaessa (ks. 3.2).

Tutkittavista aineista käytetään 50–400 mg/l DOC-arvoja tai 100–1 000 mg/l COD-arvoja vastaavaa pitoisuutta (DOC= dissolved organic carbon, liuennut orgaaninen hiili; COD= chemical oxygen demand, kemiallinen hapenkulutus). Näiden suurehkojen pitoisuuksien etuna on analyyttinen luotettavuus. Yhdisteet, joilla on myrkyllisiä ominaisuuksia, voivat hidastaa hajoamistapahtumaa tai estää sen.

Tässä menetelmässä testattavan aineen lopullisen biologisen hajoamisen määrittämiseen käytetään liuenneen orgaanisen hiilen määrää tai kemiallista hapenkulutusta.

Samanaikaisesti käytetyllä ominaisella analyysimenetelmällä voidaan määrittää aineen biologinen primaarihajoaminen (alkuperäisen kemiallisen rakenteen häviäminen).

Tällä menetelmällä voidaan tutkia vain sellaisia orgaanisia aineita, jotka testissä käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

— ne ovat vesiliukoisia koeolosuhteissa,

— niiden höyrynpaine on mitätön koeolosuhteissa,

— ne eivät estä bakteeritoimintaa,

— ne adsorboituvat käytetyssä testissä vain rajoitetusti,

— ne eivät poistu testiliuoksesta vaahtoamisen vuoksi.

Tiedot testattavan materiaalin pääaineosien suhteellisista osuuksista auttavat tulosten tulkinnassa, varsinkin jos tulokset ovat alhaisia tai marginaalisia.

Tiedot aineen myrkyllisyydestä mikro-organismeille auttavat alhaisten tulosten tulkinnassa ja oikeiden pitoisuuksien valinnassa.

▼B

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Testin lopussa saavutettu hajoamisaste ilmoitetaan muodossa ”Biologinen hajoaminen Zahn-Wellens-testissä”

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

jossa

D_T = biologinen hajoaminen (%) ajan hetkellä T,

C_A = testattavan seoksen DOC (tai COD)-arvot mitattuna kolmen tunnin kuluttua testin alkamisesta (mg/l), (DOC = dissolved organic carbon, liuennut orgaaninen hiili; COD = chemical oxygen demand, kemiallinen hapenkulutus),

C_T = testattavan seoksen DOC- tai COD-arvot näytteenottohetkellä (mg/l),

C_B = nollakokeen DOC- tai COD-arvot näytteenottoaikana (mg/l),

CBA = nollakokeen DOC- tai COD-arvot mitattuna kolmen tunnin kuluttua testin alkamisesta (mg/l).

Hajoamisaste pyöristetään lähimpään kokonaiseen prosenttiin.

Hajoamisprosentti ilmoitetaan testattavasta aineesta poistuneen liuenneen orgaanisen hiilen (tai kemiallisen hapenkulutuksen) poistumaprosenttina.

Kolmen tunnin kuluttua määritetyn arvon ja lasketun tai mieluimmin määritetyn alkuarvon ero voi antaa hyödyllistä tietoa aineen poistumasta (ks. 3.2, tulosten tulkinta).

1.3 VERTAILUAINEET

Uusia aineita tutkittaessa vertailuaineista saattaa joissakin tapauksissa olla hyötyä. Sopivia vertailuaineita ei kuitenkaan voida vielä suositella.

1.4 TESTIN PERIAATE

Laitetaan aktiivilietettä, mineraaliravinteita ja testattavaa ainetta ainoana hiilen lähteenä sisältävää vesiliuosta 1–4 litran vetoiseen, sekoittajalla ja ilmastajalla varustettuun lasiastiaan. Seosta sekoitetaan ja ilmastetaan 20–25 °C:n lämpötilassa hajavalossa tai pimeässä enintään 28 päivää. Hajoamistapahtumaa seurataan määrittämällä DOC- (tai COD-)arvot suodatetusta liuoksesta päivittäin tai jotakin muuta määräaikaa noudattaen. Kukin määräajoin mitattu DOC- (tai COD-) poistuma suhteessa kolme tuntia testin alkamisen jälkeen suoritettuun määritykseen ilmoitetaan biologisena hajoamisprosenttina ja se osoittaa senhetkisen hajoamisasteen. Tulos esitetään graafisesti suhteessa aikaan, jolloin saadaan biologinen hajoamiskäyrä.

Alkuperäisen molekyylipitoisuuden biologisesta hajoamisesta johtuvat muutokset voidaan mitata käyttämällä jotakin analyyttistä menetelmää (biologinen primaarihajoaminen).

▼B

1.5 LAATUVAATIMUKSET

Tämän testin toistettavuus on todettu tyydyttäväksi rengasreaktion avulla.

Menetelmän herkkyys määräytyy suurelta osin nollatestin vaihtelevuuden ja jossakin määrin liuenneen orgaanisen hiilen määritystarkkuuden sekä liuoksen sisältämän testattavan aineen pitoisuuden mukaan.

1.6 TESTIN KUVAUS

1.6.1 *Testin valmistelu*

1.6.1.1 Reagenssit

Testissä käytetty vesi: juomavettä, jonka orgaaninen hiilipitoisuus on < 5 mg/l. Kalsium- ja magnesiumionien yhteispitoisuus saa olla enintään 2,7 mmol/1, muussa tapauksessa on suoritettava tarvittava laimennus ionisoimattomalla tai tislatulla vedellä.

Rikkihappo, analyyttinen laatu (A. R.):	50 g/l
Natriumhydroksidiliuos, A. R.:	40 g/l
Mineraaliravinneliuos: liuotetaan litraan ionisoimatonta vettä:	
ammoniumkloridia, NH_4Cl, A. R.:	38,5 g,
natriumdivetyfosfaattia, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A. R.:	33,4 g,
kaliumdivetyfosfaattia, KH_2PO_4, A. R.:	8,5 g,
dikaliummonovetyfosfaattia K_2HPO_4, A. R.:	21,75 g.

Seos toimii sekä ravinteena että puskurijärjestelmänä.

1.6.1.2 Laitteet

Lasiastioita, joiden vetoisuus on 1–4 litraa (esimerkiksi sylinterimäisiä astioita).

Sähkösekoittaja, jossa on varrellinen lasi- tai metallisekoitin (sekoittimen on pyörittävä 5–10 cm astian pohjan yläpuolella). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää magneettisekoitinta, jossa sauvan pituus on 7–10 cm.

Lasiputki, jonka sisähalkaisija on 2-4 mm, ilmastusta varten. Putken pään on oltava noin 1 cm astian pohjasta.

Sentrifugi (noin 3 550 g).

pH-mittari.

Liuenneen hapen mittari.

Paperisuodattimia.

▼B

Kalvosuodatinlaite.

Kalvosuodattimia, huokoskoko 0,45 μm. Kalvosuodattimia voidaan käyttää, jos on varmistuttu siitä, että ne eivät vapauta hiiltä eivätkä absorboi testattavaa ainetta suodatusvaiheessa.

Analyysilaitteet orgaanisen hiilen pitoisuuden ja kemiallisen hapen tarpeen määritystä varten.

1.6.1.3 Inokulaaton valmistus

Biologisesta käsittelylaitoksesta peräisin oleva aktiiviliete pestään sentrifugoimalla (toistuvasti) tai antamalla sen laskeutua testissä käytettävässä vedessä (edellä).

Aktiivilietteen on oltava laadultaan soveltuvaa. Tällaista lietettä on saatavilla hyvin toimivasta jätevesien käsittelylaitoksesta. Jotta lietteessä olisi mahdollisimman monta bakteerilajia tai -kantaa, saattaa olla tarpeen sekoittaa useasta lähteestä otettuja inokulaatteja (esimerkiksi eri jätteenkäsittelylaitokset, maaperä, jokivedet jne.). Seos käsitellään edellä selostetulla tavalla.

Aktiivilietteen tehokkuuden tarkistus — ks. ’toimivuuskontrolli’ jäljempänä.

1.6.1.4 Koeliuosten valmistus

Koeastiaan pannaan 500 ml testissä käytettävää vettä, 2,5 ml/l mineraaliravinneliuosta ja aktiivilietettä niin paljon, että sen määrä lopullisessa seoksessa vastaa 0,2 - 1,0 g/l kuiva-ainetta. Testattavasta aineesta valmistettua varastoliuosta lisätään niin paljon, että lopullisen seoksen DOC-pitoisuus on 50–400 mg/l. Vastaavat COD-arvot ovat 100–1 000 mg/l. Testissä käytettävää vettä lisätään niin paljon, että liuoksen kokonaismääräksi saadaan 1–4 litraa. Kokonaismäärä riippuu siitä, kuinka monta näytettä otetaan DOC- tai COD-määrityksiä varten ja paljonko seosta tarvitaan analyyseihin.

Yleensä kaksi litraa on riittävä määrä. Testiin sisältyy vähintään yksi kontrolliastia (nollakoe), joka sisältää ainoastaan aktiivilietettä ja mineraaliravinneliuosta ja testissä käytettyä vettä niin paljon, että sen kokonaismäärä on sama kuin koeastioissa oleva.

1.6.2 *Testin suorittaminen*

Koeastioita sekoitetaan magneetti- tai potkurisekoittajalla hajavalossa tai pimeässä huoneessa 20–25 °C:n lämpötilassa. Ilmastus tehdään paineilmalla, joka puhdistetaan tarvittaessa pesupullon ja vanusuodattimen avulla. On pidettävä huolta siitä, ettei liete laskeudu eikä happipitoisuus putoa alle 2 mg/l.

pH-arvo on tarkistettava määräajoin (esimerkiksi päivittäin) ja pH-arvoksi säädettävä tarvittaessa 7–8.

▼B

Haihtunut nestemäärä korvataan ennen kutakin näytteenottoa lisäämällä tarvittava määrä ionisoimatonta tai tislattua vettä. Suositeltavaa on merkitä nesteen taso astian kylkeen ennen testin aloittamista. Uusi merkintä tehdään kunkin näytteenoton jälkeen (ilmastamatta ja sekoittamatta). Ensimmäiset näytteet otetaan aina kolmen tunnin kuluttua testin alkamisesta, jotta voidaan todeta, adsorboituuko testattava aine aktiivilietteeseen.

Testattavan aineen häviämistä seurataan DOC- tai COD-määrityksin, jotka tehdään päivittäin tai muuten säännöllisin väliajoin. Koeastiasta ja nollakoeastiasta otetut näytteet suodatetaan huolellisesti pestyn paperisuodattimen läpi. Ensimmäiset 5 ml testattavan aineen suodosta heitetään pois. Vaikeasti suodatettavat lietteet voidaan poistaa suodatusta edeltävällä 10 minuutin sentrifugoinnilla. DOC- ja COD-määritykset tehdään vähintään kahtena kappaleena. Testin kesto on enintään 28 päivää.

Huom. Sameina pysyvät näytteet suodatetaan kalvosuodattimella. Kalvosuodattimet eivät saa päästää eivätkä adsorboida mitään orgaanista ainetta.

Aktiivilietteen toimivuuskontrolli

Kuhunkin koesarjaan on sisällytettävä tunnettua ainetta sisältävä koeastia aktiivilietteen toiminnan testaamista varten. Dietyleeniglykoli on osoittautunut tähän tarkoitukseen sopivaksi.

Adaptaatio

Kun analyysejä tehdään suhteellisen lyhyin väliajoin (esim. päivittäin), adaptaatio voidaan selvästi todeta hajoamiskäyrältä (ks. kuva 2). Sen vuoksi testiä ei saa aloittaa juuri ennen viikonloppua.

Jos adaptaatio tapahtuu koeajan lopulla, koetta voidaan jatkaa, kunnes hajoaminen loppuu.

Huom. Jos adaptoituneesta lietteestä tarvitaan laajempia tietoja, samaa aktiivilietettä testataan uudelleen saman koemateriaalin kanssa seuraavasti:

Sekoitus ja ilmastus lopetetaan ja aktiivilietteen annetaan laskeutua. Kelluva neste poistetaan, testissä käytettyä vettä lisätään, kunnes kokonaismäärä on kaksi litraa, sekoitetaan 15 minuuttia ja annetaan laskeutua uudelleen. Kun kelluva neste on jälleen poistettu, testi uusitaan jäljellä olevalla lietteellä samaa materiaalia käyttäen 1.6.1.4 ja 1.6.2 kohtien mukaisesti. Aktiiviliete voidaan myös erottaa sentrifugoimalla selkeyttämisen sijasta.

Adaptoinutta lietettä voidaan sekoittaa tuoreeseen lietteeseen siten, että kuivapainopitoisuus on 0,2–1 g/l.

▼B

Analyysit

Näytteet suodatetaan yleensä huolellisesti pestyllä paperisuodattimella (pesuun käytetään ionisoimatonta vettä).

Sameiksi jäävät näytteet suodatetaan kalvosuodattimella (0,45 μm).

Näytteiden suodoksista (ensimmäiset 5 ml kaadetaan pois) määritetään TOC-mittauslaitteen avulla DOC- ja/tai COD-pitoisuudet kahtena kappaleena. Ellei suodosta analysoida samana päivänä, se on säilytettävä jääkaapissa seuraavaan päivään. Pidempää säilytysaikaa ei suositella.

COD-pitoisuus määritetään näytesuodoksista COD-analyysilaitteilla allaolevassa lähdeviitteessä (2) esitetyllä tavalla.

2. **TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI**

DOC- ja/tai COD-pitoisuudet määritetään näytteistä vähintään kahtena kappaleena edelläolevan 1.6.2 kohdan mukaisesti. Aikana T tapahtunut hajoaminen lasketaan 1.2 kohdassa annetun kaavan (ja määritelmien) mukaisesti.

Hajoamisaste pyöristetään lähimpään kokonaiseen prosenttiin. Testin lopussa saavutettu hajoamisaste ilmoitetaan muodossa ”Biologinen hajoaminen Zahn-Wellens-testissä”.

Huomautus: Jos täydellinen hajoaminen tapahtuu ennen testin loppua ja tämä tulos varmistetaan uudella analyysillä seuraavana päivänä, koe voidaan lopettaa.

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat kohdat:

— aineen alkupitoisuus,

— kaikki muut testattua ainetta, vertailuainetta ja nollakoetta koskevat tiedot ja tutkimustulokset,

— pitoisuus kolmen tunnin kuluttua,

— hajoamiskäyrä ja selostus,

— koeorganismien hankintapaikka ja -aika, adaptaatioaste, käytetyt pitoisuudet jne.,

— testausmenetelmään tehtyjen muutosten tieteelliset perustelut.

3.2 TULOSTEN TULKINTA

DOC- (COD)-poistuma, joka tapahtuu asteittain päivien tai viikkojen kuluessa, osoittaa testattavan aineen biologisen hajoamisen.

▼B

Fysikaalis-kemiallisella adsorptiolla voi kuitenkin eräissä tapauksissa olla tietty vaikutus, joka ilmenee testin alussa ensimmäisten kolmen tunnin aikana tapahtuvana täydellisenä tai osittaisena poistumana ja kontrolli- ja koeliuosten kelluvien nesteiden eron pysymisenä odottamattoman pienenä.

Lisätutkimuksia tarvitaan, jos biologinen hajoaminen (tai osittainen biologinen hajoaminen) ja adsorptio halutaan erottaa toisistaan.

Tämä voidaan tehdä usealla tavalla, mutta luotettavin tapa on käyttää kelluvaa nestettä tai lietettä inokulaattina perussarjan testissä (mieluimmin respirometritestissä).

Testattavia aineita, joiden DOC- (COD)-poistuma ilman adsorptiota on tässä testissä korkea, voidaan pitää biologisesti hajoavina. Osittainen poistuma ilman adsorptiota osoittaa, että kemikaali hajoaa biologisesti ainakin jossakin määrin. Alhainen tai nollapoistuma saattaa johtua testattavan aineen mikro-organismeihin kohdistuvasta inhibitiosta, joka voi myös ilmetä lietteen liukenemisena ja häviämisenä, jolloin kelluva neste on sameaa. Koe on uusittava käyttämällä testattavasta aineesta alhaisempaa pitoisuutta.

Suurempi herkkyys saadaan käyttämällä yhdistekohtaista analyysimenetelmää tai ^{14}C:llä merkittyä testattavaa ainetta. Mikäli testattava yhdiste on merkitty ^{14}C:llä, $^{14}CO_2$:n toteaminen osoittaa, että biologista hajoamista on tapahtunut.

Kun tulokset ilmoitetaan ensisijaisena hajoamisena, alkuperäisen testattavan aineen reagoimattomuuteen johtanut kemiallinen rakennemuutos tulisi mahdollisuuksien mukaan selvittää.

Analyysimenetelmän kelpoisuus on ilmoitettava samoin kuin nollakokeen elatusaineesta saatu vaste.

4. **LÄHDELUETTELO**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, Official Journal of the European Communities, No L 251, 19.9.1984.

▼B

Lisäys

ARVIOINTIESIMERKKI

Orgaaninen yhdiste:	4-Etoksibentsoehappo
Teoreettinen testipitoisuus:	600 mg/l
Teoreettinen DOC:	390 mg/l
Inokulaatti:	Jätteenpuhdistuslaitoksen nimi
Pitoisuus:	1 gramma kuivamateriaalia/litra
Adaptaatioaste:	ei adaptoitunut
Analyysi:	DOC-määritys
Näytteen koko:	3 ml
Kontrollialue:	Dietyleeniglykoli
Yhdisteen myrkyllisyys:	Ei myrkyllisiä vaikutuksia alle 1 000 mg/l Käytetty testi: Fermentaatioputkitesti

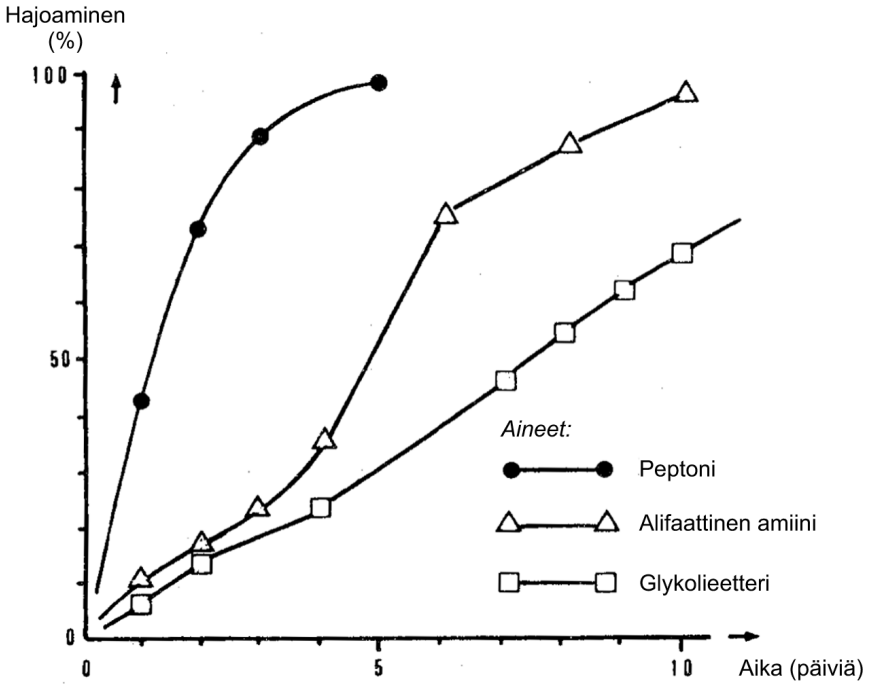
Ajat	Kontrolliaine				Testattava aine		
	DOC ([1]) mg/l	DOC ([1]) mg/l	netto DOC mg/l	Hajoaminen %	DOC ([1]) mg/l	netto DOC mg/l	Hajoaminen %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 tuntia	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 päivä	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 päivää	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 päivää	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 päivää	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 päivää	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 päivää	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 päivää	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 päivää	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Kolminkertaisten määritysten keskiarvo.

▼B

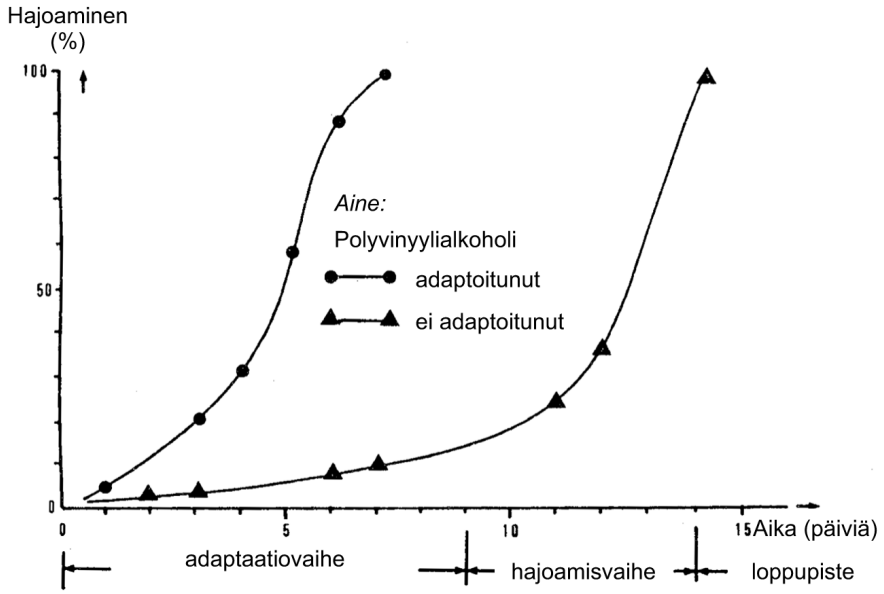
Kuva 1

Esimerkkejä biologisista hajoamiskäyristä



Kuva 1

Esimerkkejä lietten adaptaatiosta



▼M4

C.10 **SIMULAATIOTUTKIMUS: AEROBINEN VIEMÄRILIETTEEN KÄSITTELY: C.10-A: AKTIIVILIETEYKSIKÖT – C.10-B: BIOKALVOT**

C.10-A: Aktiivilieteyksiköt

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 303 (2001). 1950-luvulla havaittiin, että uudet pinta-aktiiviset aineet aiheuttivat liiallista vaahtoutumista jätevedenpuhdistamoissa ja joissa. Aerobinen käsittely ei poistanut niitä kokonaan, ja ne rajoittivat joissakin tapauksissa muun orgaanisen aineksen poistoa. Tästä syystä käynnistettiin useita tutkimuksia siitä, miten pinta-aktiiviset aineet voidaan poistaa jätevesistä ja miten jäteveden puhdistus tehoaa teollisuuden tuottamiin uusiin kemikaaleihin. Tähän tarkoitukseen käytettiin malliyksiköitä, jotka edustivat kahta aerobisen biologisen jäteveden puhdistuksen päätyyppiä (aktiivilietettä ja biosuodatusta eli tihkusuodatusta). Olisi ollut epäkäytännöllistä ja hyvin kallista jakaa jokaista uutta kemikaalia ja seurata kaikkia suuria jätevedenpuhdistamoja edes paikallisesti.

ALUSTAVAT HUOMIOT

Aktiivilieteyksiköt

2. Simuloitujen aktiivilieteyksikköjen kooksi on ilmoitettu 300–2 000 ml. Osa jäljitteli tarkasti täyden mittakaavan puhdistamoja, ja niissä oli lietteen selkeytyssäiliö, josta selkeytetty liete pumpattiin takaisin ilmastusaltaaseen, kun taas toisissa ei ollut lainkaan selkeytystiloja. Tästä esimerkkinä Swisher (1). Laitteen koko on kompromissi: toisaalta sen on oltava riittävän iso, jotta se on mekaanisesti toimiva eikä näytteiden tarvittava tilavuus häiritse sen toimintaa, mutta toisaalta ei saa olla niin iso, että se vaatii liian suuren tilan tai liikaa materiaaleja.

3. Kaksi laitetyyppiä, joita on käytetty laajasti tyydyttävin tuloksin, ovat Husmannin yksiköt (2), joita käytettiin pinta-aktiivisten aineiden tutkimuksissa, ja huokoiset astiat (3)(4). Nämä on kuvattu tässä testimenetelmässä. Myös muita laitteita, kuten Eckenfelderin (5), on käytetty onnistuneesti. Koska tämän simulaatiotutkimuksen toteuttaminen on melko kallista ja työlästä, rinnalla tutkittiin yksinkertaisempia ja halvempia seulontatestejä, jotka on kuvattu tämän liitteen luvun C.4 kohdassa A-F (6). Kokemus monista pinta-aktiivisista aineista ja muista kemikaaleista on osoittanut, että ne, jotka läpäisivät seulontatestit (helposti biohajoavat), hajosivat myös simulaatiotutkimuksessa. Osa aineista, jotka eivät läpäisseet seulontatestejä, läpäisi luontaisen biohajoavuuden testit (tämän liitteen luvut C.12 (7) ja C.19 (8)), mutta vain osa jälkimmäisistä hajosi simulaatiotutkimuksessa, kun taas ne kemikaalit, jotka eivät läpäisseet luontaisen biohajoavuuden testejä, eivät hajonneet simulaatiotutkimuksissa (9)(10)(11).

4. Simulaatiotutkimukset, joissa käytetään yhtä testiolosuhteiden joukkoa, ovat riittäviä joihinkin tarkoituksiin. Tulokset ilmaistaan testikemikaalin tai liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) poistumaprosentteina. Tällainen testi kuvataan tässä testimenetelmässä. Tässä tekstissä on useita eri muunnelmia toisin kuin tämän luvun edellisessä versiossa, jossa kuvattiin vain yhdentyyppinen laite, jolla käsiteltiin synteettistä jätevettä yhdistettyinä yksikköinä käyttämällä suhteellisen yksinkertaista lietteen poistumatapaa. Tekstissä kuvataan

▼M4

vaihtoehtoisia laitetyyppejä, toimintatapoja sekä jäteveden ja lietteen poistumatapoja. Tämä teksti seuraa tarkasti ISO 11733 -standardin (12) tekstiä, joka on tarkistettu huolellisesti, joskaan testimenetelmää ei ole validoitu laboratorioiden välisessä tutkimuksessa.

5. Muissa tarkoituksissa testikemikaalin pitoisuus poistovirrassa on tiedettävä tarkemmin, ja kattavampi menetelmä on tarpeen. Esimerkiksi lietteen poistumanopeutta on kontrolloitava tarkasti joka päivä ja koko testin keston ajan, ja yksiköitä on käytettävä eri poistumanopeuksilla. Jos halutaan käyttää täysin kattavaa menetelmää, testit on tehtävä kahdessa tai kolmessa eri lämpötilassa. Birch (13)(14) kuvaa tällaisen menetelmän, josta on yhteenveto lisäyksessä 6. Nykytietojen perusteella ei kuitenkaan voida päätellä, mitä kineettisiä malleja voidaan soveltaa kemikaalien biologiseen hajoamiseen jäteveden puhdistuksessa ja yleensä vesiympäristössä. Monodin kineettinen malli, joka on annettu esimerkkinä lisäyksessä 6, soveltuu ainoastaan kemikaaleihin, joiden pitoisuus on vähintään 1 mg/l, mutta joidenkin mielestä tätäkään ei ole vielä näytetty toteen. Lisäyksessä 7 on viitattu testeihin, joissa pitoisuudet vastaavat paremmin todellisia pitoisuuksia jätevesissä, mutta nämä testit sekä lisäyksessä 6 luetellut testit on kuvattu vain lisäyksissä, eikä niitä ole annettu erillisinä testimenetelminä.

Suodattimet

6. Simuloidut biosuodattimet ovat jääneet paljon vähemmälle huomiolle, kenties siksi, että ne ovat hankalampia ja isokokoisempia kuin simuloidut aktiivilietelaitokset. Gerike *et al* kehittivät biologisia suodatinyksiköitä ja käyttivät niitä yhdistettyinä yksiköinä (15). Nämä suodattimet olivat suhteellisen suuria (korkeus 2 m, tilavuus 60 l), ja kuhunkin tarvittiin jätevettä jopa 2 l/h. Baumann *et al* (16) simuloivat biologisia suodattimia upottamalla polyesterifleeceliuskoja konsentroituun aktiivilietteeseen puoleksi tunniksi ja kiinnittämällä liuskat sitten 1 m:n putkiin (sisähalkaisija 14 mm). Testikemikaali, joka oli mineraalisuolaliuoksen ainoa C-lähde, syötettiin pystysuuntaiseen putkeen, ja biologinen hajoaminen arvioitiin mittaamalla DOC poistovirrassa ja CO_2 syntyneessä kaasussa.

7. Biosuodattimia on simuloitu toisella tavalla (15). Pyöriviin putkiin, jotka oli kallistettu pieneen vaakasuuntaiseen kulmaan, syötettiin jätevettä (noin 250 ml/h) testikemikaalin kanssa ja ilman testikemikaalia, ja kerätystä poistovirrasta analysoitiin DOC ja/tai spesifinen testikemikaali.

TESTIN PERIAATE

8. Tämän menetelmän tarkoitus on määrittää poistuma ja aerobisten mikro-organismien aiheuttama vesiliukoisten orgaanisten kemikaalien primaarinen ja/tai lopullinen biohajoaminen jatkuvatoimisessa testijärjestelmässä, joka simuloi aktiivilieteprosessia. Helposti biohajoava orgaaninen aine ja orgaaninen testikemikaali ovat mikro-organismien hiilen ja energian lähteet.

9. Kahta jatkuvatoimista testiyksikköä (aktiivilietelaitoksia tai huokoisia astioita) käytetään rinnakkain identtisissä, testin tarkoitukseen soveltuvissa olosuhteissa. Normaalisti hydraulisen retentioajan keskiarvo on 6 h ja lietteen iän keskiarvo (retentioaika) on 6–10 päivää. Lietettä poistetaan kahdella eri menetelmällä. Lisättävän testikemikaalin pitoisuus on tavallisesti 10–20 mg/l liuennutta orgaanista hiiltä (DOC), ja sitä lisätään vain toisen yksikön tuloveteen (orgaaninen aine). Toista yksikköä käytetään kontrolliyksikkönä, jolla määritetään orgaanisen aineen biologinen hajoaminen.

▼M4

10. Poistovedestä otetaan usein näytteitä, joista määritetään mieluiten DOC tai sitten kemiallinen hapenkulutus (COD) ja testikemikaalin pitoisuus (tarvittaessa) tekemällä sen yksikön poistoveden ominaisanalyysi, johon testikemikaalia lisätään. Poistoveden DOC- tai COD-pitoisuuden erot testi- ja kontrolliyksiköissä johtuvat oletettavasti testikemikaalista tai sen orgaanisista metaboliiteista. Tätä eroa verrataan tuloveden DOC- tai COD-pitoisuuteen, joka johtuu testikemikaalin lisäämisestä, jotta testikemikaalin poistuma voidaan määrittää.

11. Biologinen hajoaminen voidaan tavallisesti erottaa biosorptiosta tarkastelemalla huolellisesti poistuma-aikakäyrää, ja se voidaan yleensä vahvistaa biohajoamisen testillä käyttämällä akklimatisoitua inokulaattia yksiköstä, johon lisätään testikemikaalia.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

12. Testikemikaalin puhtauden, vesiliukoisuuden sekä haihtuvuus- ja adsorptio-ominaisuuksien on oltava tiedossa, jotta tulokset voidaan tulkita oikein. Haihtuvia ja liukenemattomia kemikaaleja ei tavallisesti voida testata ilman erityisiä varotoimia (katso lisäys 5). Kemiallisen rakenteen tai vähintään empiirisen kaavan on oltava tiedossa, jotta voidaan laskea teoreettiset arvot ja/tai tarkistaa mitatut parametriarvot, kuten teoreettinen hapenkulutus (ThOD), liuennut orgaaninen hiili (DOC) ja kemiallinen hapenkulutus (COD).

13. Tieto testikemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille (katso lisäys 4) voi olla hyödyllinen soveltuvia testipitoisuuksia valittaessa ja olennainen matalien biohajoavuusarvojen oikean tulkinnan kannalta.

KYNNYSARVOT

14. Tämän pinta-aktiivisten aineiden primaarisen biologisen hajoamisen simulaatiotutkimuksen (toteamiskokeen) alkuperäisessä sovelluksessa spesifisen kemikaalin poistuman on oltava vähintään 80 prosenttia, jotta pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida. Jos 80 prosentin arvoa ei saavuteta, tätä simulaatiotutkimusta (toteamiskoetta) voidaan soveltaa ja pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida vain, jos yli 90 prosenttia spesifisestä kemikaalista poistuu. Yleensä ei ole epäselvää, läpäisevätkö kemikaalit testin, ja saatua poistumaprosenttia voidaan käyttää laskettaessa todennäköistä pitoisuutta ympäristössä, jota käytetään kemikaalin vaarallisuuden arvioinnissa. Tulokset noudattavat yleensä kaikki tai ei mitään -periaatetta. Useissa puhtaiden kemikaalien tutkimuksissa DOC:n poistumaprosentti oli yli 90 prosenttia yli kolmessa neljäsosassa tapauksista ja yli 80 prosenttia yli 90 prosentissa kemikaaleista, joissa ilmeni merkittävää biohajoavuutta.

15. Suhteellisen harvaa kemikaalia (esim. pinta-aktiivista ainetta) esiintyy jätevedessä tässä testissä käytettyinä pitoisuuksina (noin 10 mg C/l). Osa kemikaaleista saattaa olla inhiboivia näinä pitoisuuksina, kun taas toisten kemikaalien poistumiskinetiikka saattaa olla erilainen, kun pitoisuus on pieni. Hajoamista voidaan arvioida tarkemmin käyttämällä muunneltuja menetelmiä ja realistisen pieniä testikemikaalin pitoisuuksia, ja kerättyjen tietojen perusteella voidaan laskea kineettiset vakiot. Tarvittavia kokeellisia tekniikoita ei ole kuitenkaan vielä validoitu täysin eikä kineettisiä malleja, jotka kuvaavat biohajoamisreaktioita, ole määritetty (katso lisäys 7).

▼M4

VERTAILUKEMIKAALIT

16. Jotta voidaan varmistaa, että kokeellinen menetelmä suoritetaan oikein, testikemikaaleja tutkittaessa on hyvä testata välillä kemikaaleja, joiden käyttäytyminen on tiedossa. Tällaisia kemikaaleja ovat esimerkiksi adipiinihappo, 2-fenyylifenoli, 1-naftoli, difeenihappo ja 1-naftoehappo (9)(10)(11).

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

17. Simulaatiokokeiden tutkimuksista on laadittu paljon vähemmän raportteja kuin biohajoavuuskokeiden tutkimuksista. (Samanaikaisten) rinnakkaisnäytteiden toistettavuus on hyvä (10–15 %), kun testikemikaali on hajonnut vähintään 80-prosenttisesti, mutta vaihteluväli on suurempi, jos kemikaalin hajoavuus on heikompi. Lisäksi joiden rajatapausten osalta on kirjattu hyvinkin erilaisia tuloksia (kuten 10 % ja 90 %) eri ajankohtina 9-viikkoisen testijakson aikana.

18. Kahdella erityyppisellä laitteella saaduissa tuloksissa ei ole havaittu juurikaan eroa, mutta tietyt kemikaalit hajoavat kotitalousjätevedessä kattavammin ja yhtenäisemmin kuin OECD:n synteettisessä jätevedessä.

TESTAUSMENETELMÄN KUVAUS

Laite

Testijärjestelmä

19. Yhden testikemikaalin testijärjestelmään kuuluu testiyksikkö ja kontrolliyksikkö, mutta jos tehdään vain ominaisanalyysit (primaarinen biohajoaminen), tarvitaan pelkästään testiyksikkö. Yhtä kontrolliyksikköä voidaan käyttää useita testiyksikköjä varten huolimatta siitä, käytetäänkö testiyksiköissä samaa vai eri testikemikaaleja. Jos yksiköt yhdistetään (lisäys 3), jokaista testiyksikköä varten on oltava oma kontrolliyksikkö. Testijärjestelmä voi olla simuloitu aktiivilietelaitos, Husmannin yksikkö (lisäys 1, kuva 1) tai huokoinen astia (lisäys 1, kuva 2). Joka tapauksessa tarvitaan riittävän isot säiliöt tulo- ja poistovedelle sekä pumput, joilla annostellaan tulovesi joko testikemikaalin kanssa sekoitettuna tai erikseen.

20. Jokaisessa aktiivilietelaitoksessa on ilmastusastia, jonka tunnettu tilavuus on noin 3 litraa aktiivilietettä, ja erotusastia (toissijainen selkeytin), johon mahtuu noin 1,5 litraa. Tilavuuksia voidaan muuttaa hieman säätämällä erotusastian korkeutta. Astiat voivat olla erikokoisia, jos hydraulinen kuormitus on vastaava. Jos testihuoneen lämpötilaa ei voida pitää halutulla alueella, on suositeltavaa käyttää astioita, joissa on vesivaippa, ja lämpötilasäädeltyä vettä. Aktiiviliete kierrätetään paineilmapumpulla tai annostelupumpulla erottimesta ilmastusastiaan joko jatkuvasti tai säännöllisin väliajoin.

21. Huokoisten astioiden järjestelmään kuuluu huokoinen kartiokulmapohjainen sisäsylinteri, joka on vähän isommassa samanmuotoisessa astiassa, joka on tehty läpäisemättömästä muovista. Huokoiseen astiaan soveltuva materiaali on huokoinen polyeteeni, jonka suurin huokoskoko on 90 μm ja paksuus 2 mm. Liete erottuu käsitellystä orgaanisesta aineesta kulkeutuessaan huokoisen seinämän läpi. Poistovirrat keräytyvät rengasmaiseen tilaan, josta tapahtuu ylivuotoa keräämisastiaan. Selkeytymistä ei tapahdu, joten lietettä ei palauteta. Koko järjestelmä voidaan asentaa lämpösäädeltyyn vesihauteeseen. Huokoiset astiat tukkeutuvat, joten ylivuotoa voi tapahtua alkuvaiheissa. Jos näin käy, vaihda huokoinen sisäkappale. Ota ensin liete lapolla astiasta puhtaaseen ämpäriin ja poista tukkeutunut sisäkappale. Pyyhi läpäisemätön ulkosylinteri,

▼M4

asenna puhdas sisäkappale paikalleen ja pane liete takaisin astiaan. Kaavi tukkeutuneen sisäkappaleen reunoihin tarttunut liete huolellisesti ja siirrä se puhtaaseen astiaan. Puhdista tukkeutuneet astiat ensin hienolla vesisuihkulla, jotta jäljelle jäänyt liete poistuu, ja liota niitä ensin laimennetussa natriumhypokloriittiliuoksessa ja sitten vedessä. Huuhtele astiat lopuksi huolellisesti vedellä.

22. Kummankin järjestelmän ilmastusastioissa tapahtuvaan lietteen ilmastukseen on käytettävä soveltuvaa tekniikkaa, kuten sintrattuja kuutioita ja paineilmaa. Ilma puhdistetaan tarvittaessa kuljettamalla se soveltuvan suodattimen läpi ja pesemällä se. Järjestelmän läpi täytyy kulkea riittävästi ilmaa, jotta aerobiset olosuhteet säilyvät ja lietehiutaleet pysyvät suspendoituneina koko testin ajan.

Suodatinlaite tai sentrifugi

23. Kalvosuodatin, jonka huokoskoko on sopiva (aukon nimellishalkaisija 0,45 μm) ja joka adsorboi liukoisia orgaanisia kemikaaleja ja vapauttaa mahdollisimman vähän orgaanista hiiltä. Jos käytettävät suodattimet vapauttavat orgaanista hiiltä, poista orgaaninen hiili pesemällä suodattimet huolellisesti kuumalla vedellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää sentrifugia, jolla voidaan saavuttaa 40 000 m/s^2:n kiihtyvyys.

Analyysilaitteet

24. Laite, joka tarvitaan seuraavien seikkojen määrittämiseen:

— DOC (liuennut orgaaninen hiili) ja TOC (orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus) tai COD (kemiallinen hapenkulutus)

— spesifinen kemikaali, jos tarpeen

— suspendoitunut kiintoaines, pH, happipitoisuus vedessä

— lämpötila, happamuus ja emäksisyys

— ammonium, nitriitti ja nitraatti, jos testi tehdään nitrifioivissa olosuhteissa.

Vesi

25. Vesijohtovesi, jossa DOC on alle 3 mg/l. Määritä emäksisyys, jos se ei ole tiedossa.

26. Deionisoitu vesi, jossa DOC on alle 2 mg/l.

Orgaaninen aine

27. Orgaanisena aineena voidaan käyttää synteettistä jätevettä, kotitalousjätevettä tai näiden yhdistelmää. On osoitettu (11)(14), että pelkän kotitalousjäteveden käyttö nostaa usein DOC:n poistumaprosenttia ja sallii jopa sellaisten kemikaalien poistumisen ja biologisen hajoamisen, jotka eivät hajoa biologisesti käytettäessä OECD:n synteettistä jätevettä. Lisäksi kotitalousjäteveden jatkuva tai ajoittainen lisääminen stabiloi usein aktiivilietettä, olennaisen tärkeä hyvä selkeytyvyys mukaan lukien. Niinpä kotitalousjäteveden käyttö on suositeltavaa. Mittaa jokaisen uuden orgaanisen aine-erän DOC- tai COD-pitoisuus. Orgaanisen aineen happamuuden tai emäksisyyden täytyy olla tiedossa. Orgaaniseen aineeseen voi olla tarpeen lisätä soveltuvaa puskuria (natriumvetykarbonaattia tai kaliumdivetyfosfaattia), jos happamuus tai emäksisyys on matala, jotta ilmastusastian pH on 7,5 ± 0,5 testin aikana. Lisättävän puskurin määrä ja lisäämisen ajankohta on päätettävä tapauskohtaisesti. Kun seoksia käytetään jatkuvasti tai ajoittaisesti, seoksen DOC-arvo (tai COD-arvo) on pidettävä suurin piirtein samana esimerkiksi laimentamalla seosta vedellä.

▼M4

Synteettinen jätevesi

28. Liuota yhteen litraan vesijohtovettä: 160 mg peptonia, 110 mg lihauutetta, 30 mg ureaa, 28 mg vedetöntä dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4), 7 mg natriumkloridia (NaCl), 4 mg kalsiumkloridihydraattia ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg magnesiumsulfaattiheptahydraattia. Tämä OECD:n synteettinen jätevesi on esimerkki, ja siinä tulovirtauksen DOC-pitoisuuden keskiarvo on noin 100 mg/l. Vaihtoehtoisesti voi käyttää muita koostumuksia, joiden DOC-pitoisuus on suunnilleen sama ja jotka ovat lähempänä oikeaa jätevettä. Jos tarvitaan tulovettä, jonka pitoisuus on pienempi, laimenna synteettistä jätevettä (esimerkiksi 1:1) vesijohtovedellä, jotta pitoisuudeksi saadaan noin 50 mg/l. Nitrifioivat organismit kasvavat hyvin tällaisessa laimeassa tulovedessä, ja laimennus on hyvä tehdä, jos aikomuksena on tutkia nitrifioivien jätevedenpuhdistamojen simulointia. Tätä synteettistä jätevettä voidaan valmistaa tislattuun veteen väkevöidyssä muodossa. Se säilyy viikon noin 1 °C:n lämpötilassa. Laimenna tarvittaessa vesijohtovedellä. (Tämä aine ei ole tyydyttävä, sillä esimerkiksi typpipitoisuus on hyvin korkea ja hiilipitoisuus suhteellisen matala, mutta parempia ehdotuksia ei ole tehty, lukuun ottamatta fosfaatin lisäämistä puskurina ja peptonin lisäämistä).

Kotitalousjätevesi

29. Käytä tuoretta selkeytettyä jätevettä, jota kerätään päivittäin puhdistamosta, johon tulee pääasiassa kotitalousjätevettä. Jätevesi kerätään ennen primaarista sedimentaatiota primaarisen sedimentaatioaltaan ylivuotokanavasta tai aktiivilietelaitoksen syötöstä, eikä siinä saa juurikaan olla karkeita hiukkasia. Jätevettä voidaan käyttää, kun sitä on säilytetty usea päivä (ei kuitenkaan yleensä yli seitsemän päivää) noin 4 °C:n lämpötilassa, jos voidaan todistaa, että DOC (tai COD) ei ole laskenut merkittävästi (alle 20 %) säilytyksen aikana. Jotta järjestelmän häiriöitä voidaan välttää, jokaisen uuden erän DOC (tai COD) on säädettävä ennen käyttöä soveltuvaan vakioarvoon esimerkiksi vesijohtovedellä laimentamalla.

Aktiiviliete

30. Ota aktiivilietettä ymppäystä varten asianmukaisesti toimivan jätevedenpuhdistamon ilmastussäiliöstä tai laboratoriolaitoksesta, johon syötetään pääosin kotitalouksista tulevaa jätevettä.

Testikemikaalin kantaliuokset

31. Jos kemikaalin liukoisuus on riittävä, valmista kantaliuokset, joiden pitoisuus on soveltuva (esim. 1–5 g/l), deionisoituun veteen tai synteettisen jäteveden mineraaleihin. (Liukenemattomat ja haihtuvat kemikaalit, katso lisäys 5.) Määritä kantaliuoksen DOC ja orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) ja toista mittaukset jokaiselle uudelle erälle. Jos DOC- ja TOC-arvon ero on yli 20 prosenttia, tarkista testikemikaalin vesiliukoisuus. Varmista, että saanto on riittävän hyvä (tavallisesti > 90 prosenttia on odotettavissa), vertaamalla nimellisarvoon DOC-arvoa tai testikemikaalin pitoisuutta, joka on mitattu kantaliuoksen ominaisanalyysilla. Varmista etenkin dispersioiden osalta, voidaanko DOC-arvoa käyttää analyyttisenä parametrina vai voidaanko käyttää ainoastaan testikemikaalikohtaista analyysimenetelmää. Näytteet on sentrifugoitava, jos kyseessä on dispersio. Mittaa jokaisen uuden erän DOC, COD tai testikemikaali ominaisanalyysilla.

▼M4

32. Määritä kantaliuoksen pH. Äärimmäiset arvot viittaavat siihen, että kemikaalin lisääminen saattaa vaikuttaa testijärjestelmän aktiivilietteen pH-arvoon. Jos näin käy, neutraloi kantaliuos pienillä määrillä epäorgaanista happoa tai emästä, kunnes pH on 7 ± 0,5, mutta vältä testikemikaalin saostumista.

MENETTELY

33. Menettely kuvataan aktiivilietelaitoksia varten. Sitä on muokattava hieman, jos käytössä on huokoisten astioiden järjestelmä.

Siirrosaineen valmistelu

34. Testijärjestelmään lisätään testin alussa siirrosaineena aktiivilietettä tai siirrosainetta, joka sisältää pienen määrän mikro-organismeja. Pidä siirrosaine ilmastettuna huoneenlämmössä käyttöön asti ja käytä se 24 tunnin kuluessa. Jos käytetään aktiivilietettä, ota aktiivilietenäyte tehokkaan biologisen jätevedenpuhdistamon ilmastussäiliöstä tai laboratoriopuhdistamosta, johon tulee lähinnä kotitalousjätevettä. Jos tarkoituksena on simuloida nitrifioivia olosuhteita, ota lietettä nitrifioivasta jätevedenpuhdistamosta. Määritä suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuus ja väkevöi liete tarvittaessa selkeyttämällä, jotta testijärjestelmään lisättävä tilavuus on mahdollisimman pieni. Varmista, että kuiva-aineen alkupitoisuus on noin 2,5 g/l.

35. Jälkimmäisessä tapauksessa inokulaattina käytetään 2–10 ml/l biologisen jätevedenpuhdistamon poistovettä. Jotta saadaan mahdollisimman monta eri bakteerilajia, voi olla hyvä lisätä eri lähteistä, kuten esimerkiksi pintavedestä, saatuja inokulaatteja. Tällöin aktiiviliete kehittyy ja kasvaa testijärjestelmässä.

Orgaanisen aineen annostelu

36. Varmista, ettei tulo- ja poistoveden säiliössä tai tuloveden säiliöistä tulevissa ja poistoveden säiliöön johtavissa putkissa ole mikrobikasvustoja puhdistamalla ne huolellisesti ennen testiä ja testin aikana. Kokoa testijärjestelmät huoneessa, jonka lämpötilaa säädellään (tavallisesti 20–25 °C) tai käytä testiyksiköitä, joissa on vesivaippa. Valmista riittävä määrä tarvittavaa orgaanista ainetta (kohdat 27–29). Täytä ilmastusastia ja erotin aluksi orgaanisella aineella ja lisää inokulaatti (kohdat 34 ja 35). Aloita ilmastus siten, että liete pysyy suspensiossa ja aerobisessa tilassa, ja aloita tuloveden annostelu ja selkeytetyn lietteen kierrätys. Annostele orgaanista ainetta säiliöistä testi- ja kontrolliyksiköiden ilmastusastioihin (kohdat 20 ja 21) ja kerää poistovedet vastaaviin säiliöihin. Jotta hydraulinen retentioaika on normaali eli 6 h, orgaanista ainetta pumpataan nopeudella 0,5 l/h. Varmista nopeus mittaamalla päivittäin annosteltu orgaaninen aine sen perusteella, paljonko säiliöissä olevan aineen tilavuus on pienentynyt. Toinen annostelutapa on tarpeen, jos halutaan määrittää kemikaalien ajoittaisen vapautumisen tai äkkikuormituksen vaikutuksia.

37. Jos orgaanista ainetta valmistetaan päivää pidemmäksi ajaksi, se on jäähdytettävä noin 4 °C:ssä tai säilytettävä muulla soveltuvalla tavalla, jotta mikrobien kasvu ja biologinen hajoaminen voidaan estää testiyksiköiden ulkopuolella (kohta 29). Jos käytetään synteettistä jätevettä, voidaan valmistaa väkevöitetty kantaliuos (esim. kymmenen kertaa normaalia väkevämpi, kohta 28), jota voidaan säilyttää noin 4 °C:ssa. Tämä kantaliuos voidaan sekoittaa hyvin sopivaan määrään vesijohtovettä ennen käyttöä tai se voidaan pumpata suoraan samalla, kun sopiva määrä vesijohtovettä pumpataan erikseen.

▼M4

Testikemikaalin annostelu

38. Lisää sopiva määrä testikemikaalin kantaliuosta (kohta 31) tuloveden säiliöön tai annostele se suoraan ilmastusastiaan erillisellä pumpulla. Tuloveden testipitoisuuden keskiarvon on normaalisti oltava 10–20 mg/l (DOC), eikä suurin pitoisuus saa olla yli 50 mg/l. Jos testikemikaalin vesiliukoisuus on alhainen tai toksisia vaikutuksia on odotettavissa, laske pitoisuus arvoon 5 mg/l DOC tai jopa sen alle, mutta vain silloin, jos soveltuva ominaisanalyysi on käytettävissä ja sellainen tehdään (dispergoidut testikemikaalit, jotka liukenevat huonosti veteen, voidaan lisätä erityisillä annostelumenetelmillä, katso lisäys 5).

39. Aloita testikemikaalin lisääminen, kun järjestelmän toiminta on vakiintunut ja se poistaa DOC:ta orgaanisesta aineesta tehokkaasti (noin 80 %). Ennen testikemikaalin lisäämistä on tärkeää tarkistaa, että kaikki yksiköt toimivat yhtä tehokkaasti. Jos näin ei ole, yleensä auttaa, kun lietteet sekoitetaan keskenään ja jaetaan uudelleen yhtä suuriin osiin eri yksiköihin. Kun käytössä on aktiivilieteinokulaatti (noin) 2,5 g/l (kuivapaino), testikemikaalia voidaan lisätä testin alusta saakka, sillä suurenevien määrien lisäämisessä suoraan on se etu, että aktiiviliete saattaa adaptoitua testikemikaaliin paremmin. Huolimatta siitä, millä tavalla testikemikaalia lisätään, virtausnopeus ja/tai säiliön tai säiliöiden tilavuudet on suositeltavaa mitata säännöllisin väliajoin.

Aktiivilietteen käsittely

40. Aktiivilietteen kiintoaineksen pitoisuus stabiloituu tavallisesti raja-arvojen sisään testin kuluessa käytetystä inokulaatista huolimatta. Alue on 1–3 g/l (kuivapaino) orgaanisen aineen laadun ja pitoisuuden, käyttöolosuhteiden, mikro-organismien luonteen ja testikemikaalin vaikutuksen mukaan.

41. Määritä suspendoitunut kiintoaines ilmastusastioissa vähintään kerran viikossa ja heitä ylimääräinen liete pois, jotta pitoisuus pysyy alueella 1–3 g/l (kuivapaino), tai kontrolloi, että lietteen iän keskiarvo pysyy vakiona eli yleensä 6–10 päivää. Jos lietteen retentioajaksi valitaan esimerkiksi 8 päivää, poista joka päivä 1/8 aktiivilietteen ilmastusastiassa olevasta tilavuudesta ja hävitä se. Toista sama päivittäin tai käytä automaattista jaksoittaisesti toimivaa pumppua, jos mahdollista. Suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuuden pitäminen vakiona tai tarkoin rajatulla alueella ei pidä vakiona lietteen retentioaikaa (SRT). Se on muuttuja, joka määrittää testikemikaalin pitoisuusarvon poistovedessä.

42. Poista testin aikana vähintään kerran päivässä ilmastusastian ja erotusastian seiniin tarttunut liete, jotta se suspendoituu uudelleen. Estä biokalvon kasvu tarkastamalla ja puhdistamalla kaikki putket ja letkut säännöllisesti. Kierrätä selkeytetty liete erotusastiasta ilmastusastiaan mieluiten jaksoittaisella pumppauksella. Huokoisia astioita käytettäessä kierrätystä ei tehdä, mutta varmista, että puhtaat sisäastiat ovat paikallaan, ennen kuin astian tilavuus nousee merkittävästi (kohta 21).

43. Husmannin yksiköissä lietteen selkeytyminen voi olla heikkoa ja lietettä voi hävitä. Tilanteen voi korjata käyttämällä testi- ja kontrolliyksiköissä rinnakkain yhtä tai useaa seuraavista menetelmistä:

— tuoretta lietettä tai hiutaloittamisainetta (esimerkiksi 2 ml/astia, 50 g/l $FeCl_3$) voidaan lisätä säännöllisin väliajoin, kuten kerran viikossa, mutta varmista, ettei $FeCl_3$ aiheuta testikemikaalin reaktioita tai saostumista

▼M4

— paineilmapumpun tilalle voidaan vaihtaa peristalttinen pumppu, jolloin voidaan käyttää lietteen kierrätysvirtausta, joka vastaa suunnilleen tuloveden virtausta, ja selkeytettyyn lietteeseen voi kehittyä anaerobinen alue (paineilmapumpun geometria rajoittaa palautetun lietteen vähimmäisvirtausnopeuden noin 12-kertaiseksi tulovirtaukseen verrattuna)

— lietettä voidaan pumpata jaksoittaisesti erottimesta ilmastusastiaan (esim. 5 minuutin pumppaus 2,5 tunnin välein, kun kierrätetään 1–1,5 l/h)

— vaahtoamisen aiheuttamaa poistumista voidaan estää käyttämällä myrkytöntä vaahtoutumatonta ainetta (kuten silikoniöljyä), jonka pitoisuus on pienin mahdollinen

— ilmaa voidaan kuljettaa erottimessa olevan lietteen läpi lyhyinä sykäyksinä (esim. 10 sekuntia kerran tunnissa)

— orgaanista ainetta voidaan annostella jaksoittaisesti ilmastusastiaan (esim. 3–10 minuuttia kerran tunnissa).

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

44. Mittaa säännöllisin väliajoin ilmastusastioissa olevan aktiivilietteen liuenneen hapen pitoisuus, lämpötila ja pH-arvo. Varmista, että happea on aina riittävästi (> 2 mg/l) ja että lämpötila pysyy vaaditulla alueella (yleensä 20–25 °C). Pidä pH arvossa 7,5 ± 0,5 annostelemalla ilmastusastiaan tai tuloveteen pieniä määriä epäorgaanista emästä tai happoa tai nostamalla orgaanisen aineen puskurointitehoa (katso kohta 27). Kun nitrifikaatiota tapahtuu, syntyy happoa. Kun 1 mg typpeä hapettuu, syntyvä määrä vastaa noin 7:ää mg CO_3:ta. Mittaustiheys määräytyy mitattavan parametrin ja järjestelmän vakauden mukaan ja voi vaihdella päivästä viikkoon.

45. Mittaa kontrolli- ja testiastioiden tuloveden DOC tai COD. Mittaa testikemikaalin pitoisuus testitulovirrasta ominaisanalyysillä tai arvioi se kantaliuoksen pitoisuuden (kohta 31), käytetyn tilavuuden ja testiyksikköön annostellun lietemäärän perusteella. Testikemikaalin pitoisuuden laskeminen on suositeltavaa, sillä se vähentää pitoisuustietojen vaihtelua.

46. Ota kerätystä poistovedestä soveltuvat näytteet (esim. 24 h:n komposiitit) ja suodata ne sellaisen kalvon läpi, jonka huokoskoko on 0.45 μm, tai sentrifugoi kiihtyvyydellä 40 000 m/s^2 noin 15 minuutin ajan. Sentrifugointia käytetään, jos suodattaminen on hankalaa. Mittaa lopullinen biohajoaminen määrittämällä DOC tai COD vähintään kaksi kertaa sekä tarvittaessa primaarinen biohajoaminen testikemikaalin ominaisanalyysilla.

47. COD-arvon käytöstä voi seurata analyyttisiä ongelmia, jos pitoisuus on pieni, joten on suositeltavaa käyttää tarpeeksi suurta testipitoisuutta (noin 30 mg/l). Jos kemikaali on voimakkaasti adsorboiva, adsorboituneen kemikaalin määrä lietteessä on suositeltavaa mitata testikemikaalikohtaisella analyysimenetelmällä.

48. Näytteenottotiheys määräytyy testin odotetun keston mukaan. Suositeltu tiheys on kolmesti viikossa. Kun yksiköt toimivat tehokkaasti, odota testikemikaalin lisäämisen jälkeen 1–6 viikkoa, jotta tasapainotila saavutetaan. Tasannevaiheessa (kohta 59), joka kestää yleensä 3 viikkoa, on suositeltavaa määrittää vähintään 15 kelvollista arvoa testituloksen arviointia varten. Testi voidaan lopettaa, kun poistumisaste on riittävä (esim. > 90 %) ja käytettävissä ovat nämä 15 arvoa, jotka edustavat joka päivä 3 viikon ajan tehtyjä analyyseja. Yleensä testin ei ole tarkoitus kestää yli 12:ta viikkoa testikemikaalin lisäämisen jälkeen.

▼M4

49. Jos liete nitrifioituu ja jos testikemikaalin vaikutusta nitrifikaatioon halutaan tutkia, analysoi ammonia ja/tai nitriitti ja nitraatti testi- ja kontrolliyksiköiden poistoveden näytteistä vähintään kerran viikossa.

50. Kaikki analyysit on tehtävä mahdollisimman pian. Tämä koskee erityisesti typen määritystä. Jos analysointia on lykättävä, säilytä näytteitä täysissä ja tiiviisti suljetuissa pulloissa pimeässä tilassa, jonka lämpötila on noin 4 °C. Jos näytteitä on säilytettävä yli 48 h, säilytä ne pakastamalla, hapottamalla (esim. 10 ml/l rikkihappoliuosta, jonka pitoisuus on 400 g/l) tai lisäämällä soveltuvaa myrkyllistä ainetta (esim. 20 ml/l elohopea(II)kloridiliuosta, jonka pitoisuus on 10 g/l). Varmista, ettei säilömistapa vaikuta analyysin tuloksiin.

Testiyksiköiden yhdistäminen

51. Jos yksiköt yhdistetään pareiksi (lisäys 3), vaihda päivittäin sama määrä aktiivilietettä (150–1 500 ml, kun ilmastusastiassa on 3 litraa nestettä) testiyksikön ja sen kontrolliyksikön ilmastusastioiden välillä. Jos testikemikaali adsorboituu voimakkaasti lietteeseen, vaihda vain erottimien kelluva neste. Käytä kummassakin tapauksessa korjauskerrointa, kun lasket testituloksia (kohta 55).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

52. Laske testikemikaalin DOC- tai COD-poistumaprosentti jokaisen ajoitetun arvioinnin osalta käyttämällä kaavaa:

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

jossa

D_t = DOC- tai COD-poistumaprosentti aikana t

C_s = testikemikaalista johtuva DOC tai COD tulovedessä, mieluiten kantaliuoksesta arvioituna (mg/l)

E = testipoistovirrasta mitattu DOC- tai COD-arvo aikana t (mg/l)

E_o = kontrollipoistovirrasta mitattu DOC- tai COD-arvo aikana t (mg/l)

53. Orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumisaste kontrolliyksikössä auttaa arvioimaan aktiivilietteen biologista hajoamistoimintaa testin aikana. Laske poistumaprosentti seuraavan kaavan avulla:

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

jossa

D_B = kontrolliyksikön orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumaprosentti aikana t

C_M = DOC tai COD kontrollitulovirran orgaanisessa aineessa (mg/l)

▼M4

Orgaanisen aineen ja testikemikaalin aiheuttaman DOC- tai COD-poistumaprosentin testiyksikössä voi haluttaessa laskea kaavalla:

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

jossa

D_T = testitulovirran DOC- tai COD-poistumaprosentti yhteensä

C_T = testitulovirran DOC tai COD yhteensä tai laskettuna kantaliuoksista (mg/l)

54. Laske testikemikaalin poistuma, jos se on mitattu ominaisanalyysillä jokaisella arviointikerralla, seuraavalla kaavalla:

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

jossa

D_{ST} = testikemikaalin primaarinen poistumaprosentti aikana t

S_i = testikemikaalin mitattu tai arvioitu pitoisuus testitulovirrassa (mg/l)

S_e = testikemikaalin mitattu pitoisuus testipoistovirrassa aikana t (mg/l)

55. Jos yksiköt oli yhdistetty, kompensoi lietteen vaihtamisen aiheuttama testikemikaalin laimentuminen ilmastusastiassa korjauskertoimella (katso lisäys 3). Jos hydraulisen retentioajan keskiarvo oli 6 h ja puolet ilmastusastian aktiivilietetilavuudesta vaihdettiin, määritetyt päivittäiset poistuma-arvot (D_t, kohta 52) on korjattava seuraavalla kaavalla, jotta saadaan testikemikaalin todellinen poistuma-aste, D_{tc}:

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

Testitulosten ilmaiseminen

56. Esitä poistumaprosentti D_t (tai D_{tc}) ja D_{st}, jos käytettävissä, graafisesti ajan funktiona (katso lisäys 2). Testikemikaalin (sellaisenaan tai COD:na) poistumakäyrän muodosta voidaan tehdä joitakin päätelmiä poistumaprosessista.

Adsorptio

57. Jos testikemikaalin DOC-poistuma on korkea testin alusta saakka, testikemikaali poistuu todennäköisesti adsorboitumalla aktiivilietteen kiintoainekseen. Tämän voi todistaa määrittämällä adsorboituneen testikemikaalin ominaisanalyysillä. Adsorboituvien kemikaalien DOC-poistuma ei yleensä pysy korkeana koko testin ajan. Tavallisesti poistumisaste on korkea aluksi ja laskee sitten hiljalleen tasapainoarvoon. Jos adsorboituva testikemikaali aiheutti kuitenkin tavalla tai toisella mikrobipopulaation adaptoitumista, testikemikaalin DOC-poistuma nousee myöhemmin ja saavuttaa korkean tasannearvon.

▼M4

Lag-vaihe

58. Samoin kuin staattisissa seulontatesteissä, monet testikemikaalit vaativat lag-vaiheen eli latenssiajan, ennen kuin biologinen hajoaminen on täydellistä. Lag-vaiheen aikana hajoavat bakteerit sopeutuvat tai adaptoituvat eikä testikemikaalia poistu juuri lainkaan. Sen jälkeen alkaa näiden bakteerien alkukasvu. Tämä vaihe loppuu ja hajoamisvaiheen katsotaan alkavan, kun noin 10 prosenttia testikemikaalin alkuperäisestä määrästä on poistunut (adsorptio huomioiden, jos sitä tapahtuu). Lag-vaihe on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Tasannevaihe

59. Jatkuvassa testissä poistumakäyrän tasannevaihe on vaihe, jossa hajoaminen on maksimaalista. Tasannevaiheen on kestettävä vähintään 3 viikkoa, ja sen aikana on mitattava noin 15 kelvollista arvoa.

Testikemikaalin keskimääräinen poistumisaste

60. Laske testikemikaalin tasannevaiheen poistumisarvojen (D_t) keskiarvo. Kun se pyöristetään lähimpään kokonaislukuun (1 %), saadaan testikemikaalin poistumisaste. On myös suositeltavaa laskea keskiarvon 95 prosentin luottamusväli.

Orgaanisen aineen poistuminen

61. Esitä kontrolliyksikön orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumaprosentti (D_B) graafisesti ajan funktiona. Ilmoita poistumisasteen keskiarvo samoin kuin testikemikaalin osalta (kohta 60).

Viite biologisesta hajoamisesta

62. Jos testikemikaali ei adsorboidu merkittävästi aktiivilietteeseen ja poistumakäyrän muoto vastaa tyypillistä biologisen hajoamisen käyrää, jossa näkyvät lag-, hajoamis- ja tasannevaihe (kohdat 58 ja 59), mitattua poistumaa voidaan pitää biologisesta hajoamisesta johtuvana. Jos poistuminen on aluksi runsasta, simulaatiotutkimuksella ei voida erottaa biologisia ja abioottisia eliminaatioprosesseja. Jos näin käy tai jos biologisesta hajoamisesta on muuten epävarmuutta (esim. haihtumista tapahtuu), analysoi adsorboituneet testikemikaalit tai testaa biologista hajoavuutta tilastotieteellisillä lisätesteillä niiden parametrien perustella, jotka viittaavat selvästi biologisiin prosesseihin. Tällaisia testejä ovat hapen kulutuksen menetelmät (tämän liitteen luvut C.4 D, E ja F (6)), hiilidioksidin tuotannon mittaustesti (tämän liitteen luku C.4 C (6)) ja ISO Headspace -menetelmä (18) käyttämällä simulaatiotutkimuksessa altistunutta inokulaattia. Jos sekä DOC-poistuma että spesifisen kemikaalin poistuma on mitattu, poistumaprosenttien merkittävät erot (ensimmäinen on matalampi kuin jälkimmäinen) viittaavat siihen, että poistovedessä on orgaanisia välituotteita, jotka saattavat hajota heikommin kuin lähtökemikaali.

Testitulosten luotettavuus

63. Inokulaatin tavanomaisesta biohajoamiskäyttäytymisestä saadaan tietoa, jos orgaanisen aineen poistumisaste (kohta 53) kontrolliyksikössä määritetään. Testi on luotettava, jos DOC- tai COD-poistumisaste kontrolliyksikössä tai -yksiköissä on > 80 prosenttia kahden viikon kuluttua eikä epätavallisia havaintoja ole tehty.

▼M4

64. Jos käytettiin helposti biohajoavaa vertailukemikaalia, biologisen hajoavuuden asteen (D_t, kohta 52) pitäisi olla yli 90 prosenttia.

65. Jos testi tehdään nitrifioivissa olosuhteissa, keskimääräisen ammoniumtypen pitoisuuden poistovesissä pitäisi olla < 1 mg/l ja nitriittitypen < 2 mg/l.

66. Jos nämä kriteerit (kohdat 63–65) eivät täyty, toista testi käyttämällä inokulaattia, joka on peräisin toisesta lähteestä, testaa vertailukemikaali ja tarkista kaikki kokeelliset menetelmät.

Testiraportti

67. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä.

Testiolosuhteet:

— testijärjestelmän tyyppi, mahdolliset haihtuvien ja liukenemattomien kemikaalien testausta varten tehdyt muutokset

— orgaanisen aineen tyyppi

— teollisuusjäteveden osuus jätevedestä ja sen ominaisuudet, jos tiedossa

— inokulaatti, ominaisuudet ja näytteenottopaikka tai -paikat, pitoisuus ja mahdollinen esikäsittely

— testikemikaalin kantaliuos: DOC- ja TOC-pitoisuus, valmistustapa, mahdollinen suspensio, käytetty testipitoisuus, syyt jos DOC ei ole alueella 10–20 mg/l, lisäystapa, ensimmäisen lisäyksen päivämäärä, mahdolliset muutokset

— lietteen keskimääräinen ikä ja keskimääräinen hydraulinen retentioaika, lietteen poistumatapa, tilavuuden kasvun estämistavat, lietteen häviäminen jne.

— käytetyt analyyttiset tekniikat

— testilämpötila

— lietteen tilavuuden kasvun ominaisuudet, lietteen tilavuusindeksi (SVI), kiinteiden aineiden osuus liuoksessa (MLSS)

— mahdolliset poikkeamat standardimenetelmistä ja olosuhteet, jotka ovat voineet vaikuttaa tuloksiin.

Testitulokset:

— kaikki mitatut tiedot (DOC, COD, ominaisanalyysit, pH, lämpötila, happipitoisuus, suspendoitunut kiintoaines, N-kemikaalit, mikäli aiheellista)

— kaikki lasketut D_t- (tai D_{tc}-), D_B- ja D_{St}-arvot taulukoituina sekä poistumakäyrät

— lag- ja tasannevaiheen tiedot, testin kesto, testikemikaalin ja kontrolliyksikön orgaanisen aineen poistumisaste sekä tilastotiedot ja lausumat biologisesta hajoavuudesta ja testin luotettavuudesta

— tulosten pohdinta.

▼**M4**

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Swisher RD (1987). 'Surfactant Biodegradation', 2. painos. Marcel Dekker Inc. New York, s. 1085.

2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No. 49: 698–706.

3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.

5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

6) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

7) Tämän liitteen luku C.12 Biologinen hajoaminen – modifioitu SCAS-testi.

8) Tämän liitteen luku C.19 Maa-aineksiin ja viemärilietteeseen sovellettavan adsorptiokertoimen (K_{OC}) määritys korkean suorituskyvyn nestekromatografialla.

9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.

10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.

11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s. 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

12) ISO 11733 (1995; tarkistettu 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium – activated sludge simulation test.

13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.

16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. s. 91–98 ISBN 011 751661 9.

18) ISO 14593 (1998). Water Quality – Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

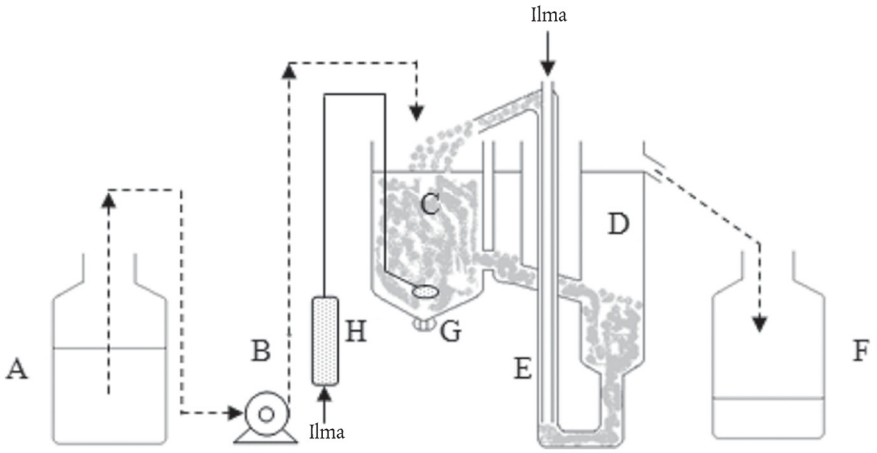
▼**M4**

Lisäys 1

Kuva 1

Biologisen hajoamisen määrityslaitteisto

Husmannin yksikkö



A. Säiliö

B. Annostelupumppu

C. Ilmastuskammio (3 l)

D. Selkeytysastia

E. Paineilmapumppu

F. Keräämisastia

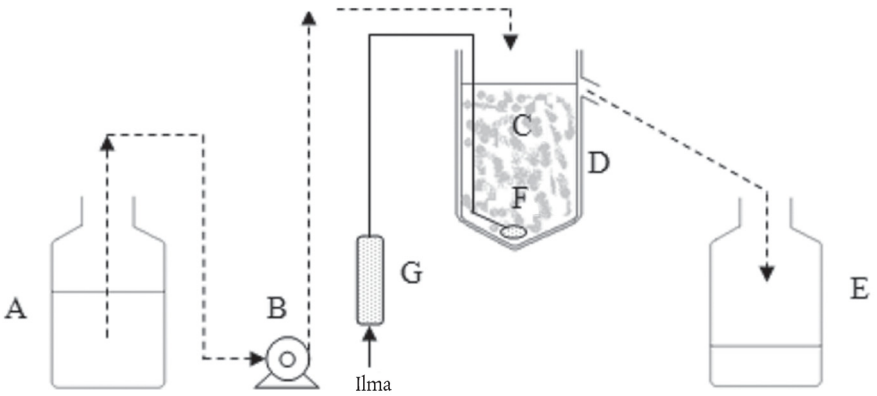
G. Ilmastin

H. Ilmavirtausmittari

Kuva 2

Biologisen hajoamisen määrityslaitteisto

Huokoinen astia



A. Säiliö

B. Annostelupumppu

C. Huokoinen ilmastusastia

D. Ulompi läpäisemätön astia

E. Keräämisastia

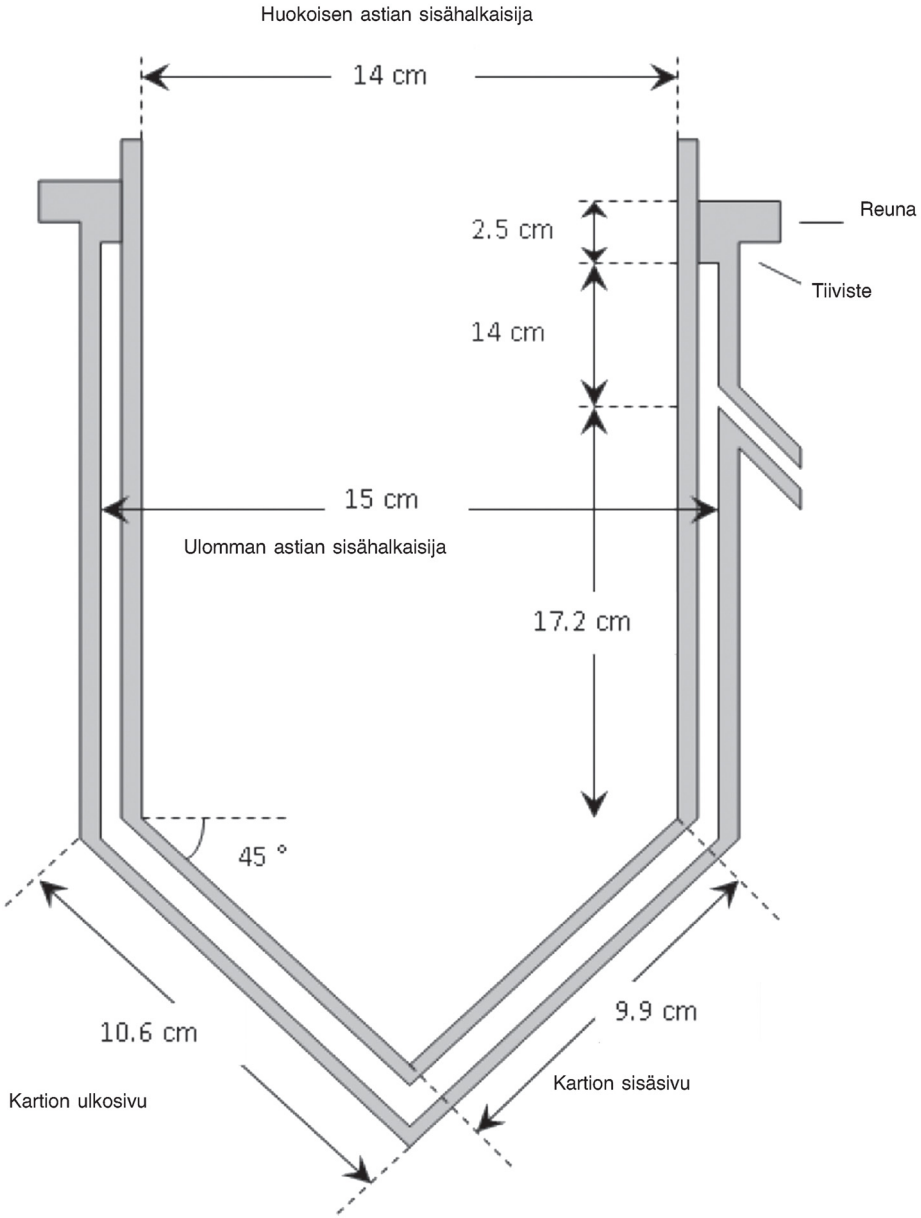
F. Diffuusori

G. Ilmavirtausmittari

▼**M4**

Kuva 3

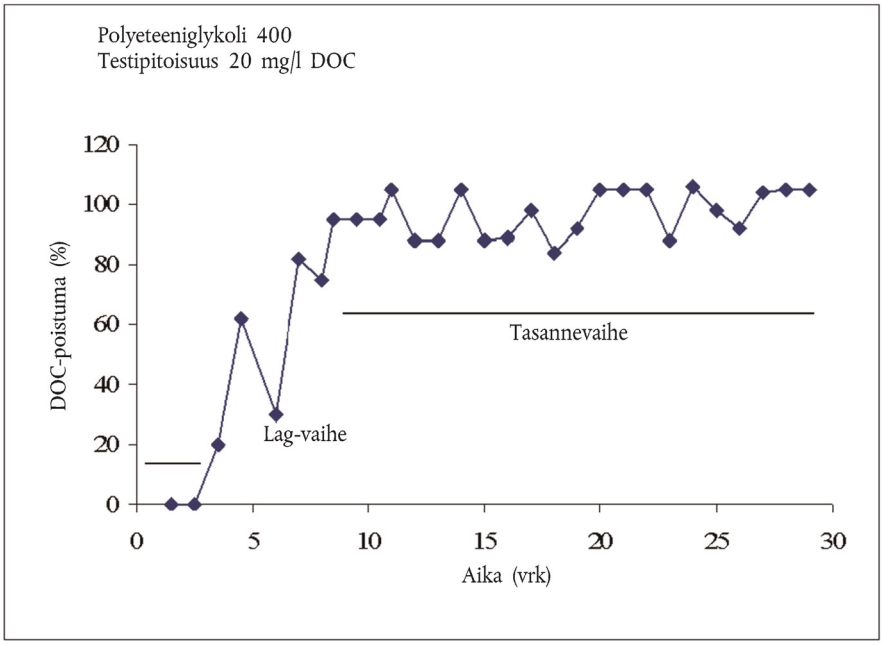
Kolmen litran huokoisen ilmastusastian yksityiskohdat



▼**M4**

Lisäys 2

Esimerkki poistumakäyrästä



▼M4

Lisäys 3

[INFORMATIIVINEN]

TESTIYKSIKÖIDEN YHDISTÄMINEN

Koska pyrkimyksenä oli yhtäläistää lietteiden mikrobipopulaatiot testiyksikössä, johon tulee jätevettä ja testikemikaalia, sekä kontrolliyksikössä, johon tulee vain jätevettä, lietettä alettiin vaihtaa yksiköstä toiseen päivittäin (1). Tätä menetelmää kutsutaan yhdistämiseksi ja pareiksi yhdistetyiksi yksiköiksi. Yhdistämistä tehtiin alun perin Husmannin aktiivilieteyksiköissä, mutta sitä on tehty myös huokoisia astioita käytettäessä (2)(3). Yhdistämättömien ja yhdistettyjen yksiköiden tuloksissa ei havaittu suuria eroja niin Husmannin yksiköissä kuin huokoisissa astioissakaan, joten yksiköiden yhdistämiseen on turha käyttää aikaa ja nähdä vaivaa.

Kun lietettä vaihdetaan, poistuma voi vaikuttaa merkittävältä, sillä osa testikemikaalista siirretään ja testikemikaalin pitoisuudet testi- ja kontrollipoistovirrassa yhtäläistyvät. Siksi on käytettävä korjauskertoimia, jotka määräytyvät vaihdetun osuuden ja keskimääräisen hydraulisen retentioajan mukaan. Laskennasta on julkaistu lisätietoa (1).

Laske korjattu DOC- tai COD-poistumisaste seuraavalla kaavalla:

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

jossa

D_{tc} = korjattu DOC- tai COD-poistumaprosentti

D_t = määritetty DOC- tai COD-poistumaprosentti

a = vaihdettu osuus aktiivilieteyksiköiden tilavuudesta

r = hydraulisen retentioajan keskiarvo (h)

Jos esimerkiksi puolet ilmastussäiliön tilavuudesta vaihdetaan (a = 0,5) ja hydraulisen retentioajan keskiarvo on 6 h, korjauskaava on seuraava:

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

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.

2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. s. 113–138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Lisäys 4

AKTIIVILIETTEEN INHIBITION ARVIOINTI

Käsittely testikemikaaleilla

1. On mahdollista, että kemikaali (tai jätevesi) ei hajoa tai poistu simulaatiotutkimuksessa, ja sillä saattaa jopa olla inhibitiovaikutus lietteen mikro-organismeihin. Toiset kemikaalit hajoavat biologisesti, kun pitoisuus on pieni, mutta ovat inhiboivia, kun pitoisuus on suuri (hormeesi). Inhibitiovaikutukset saattavat paljastua alkuvaiheessa tai ne voidaan määrittää toksisuustestillä, jossa käytetään samaa tai identtistä inokulaattia kuin simulaatiotutkimuksessa (1). Tällaisia menetelmiä ovat hapenkulutuksen estäminen (tämän liitteen luku C.11 (2) ja ISO 8192(3)) tai lietteen organismien kasvun estäminen (ISO 15522 (4)).

2. Simulaatiotutkimuksessa mahdolliset inhibitiovaikutukset ilmenevät siinä, että testiastian ja kontrolliastian poistoveden liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) tai kemiallisen hapenkulutuksen (COD) ero on suurempi kuin testikemikaalin mukana lisätty DOC. Toisin ilmaistuna käsiteltävän orgaanisen aineen DOC-poistumaprosentti (ja biokemiallinen hapentarve eli BOD, kemiallinen hapenkulutus eli COD ja/tai NH^{+}_{4}) laskee testikemikaalin vaikutuksesta. Jos näin käy, testi on toistettava siten, että testikemikaalin pitoisuutta lasketaan, kunnes saavutetaan taso, jossa inhibitiota ei tapahdu. Pitoisuutta voi olla hyvä laskea vielä lisää, kunnes testikemikaali hajoaa biologisesti. Jos testikemikaali (tai jätevesi) kuitenkin vaikuttaa prosessiin haitallisesti kaikilla testatuilla pitoisuuksilla, kemikaalia on luultavasti vaikeaa tai mahdotonta käsitellä biologisesti, mutta testi voi kuitenkin olla hyvä toistaa käyttämällä aktiivilietettä, joka on peräisin toisesta lähteestä, ja/tai totuttaa liete asteittaisesti.

3. Jos taas testikemikaali poistuu biologisesti simulaatiotutkimuksen ensimmäisessä yrityksessä, pitoisuutta on lisättävä, jos kemikaalin mahdollisen inhibitiovaikutuksen selvittäminen on tarpeen.

4. Kun inhibition astetta määritetään, on hyvä pitää mielessä, että aktiivilietteen populaatio voi muuttua, joten mikro-organismit saattavat kehittää ajan myötä toleranssin inhiboivalle kemikaalille.

5. Inhibitioasteen laskenta:

   Testi- ja kontrolliyksikön (BOD:n, DOC:n, COD:n jne.) kokonaispoistumaprosentti R_o, lasketaan seuraavasti:

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

   jossa:

   I = testi- tai kontrolliastian tuloveden BOD-, DOC-, COD-pitoisuus jne. (mg/l)

   E = vastaava pitoisuus poistovedessä (mg/l).

   I- ja E-arvot on korjattava siten, että testikemikaalista johtuva DOC testiyksikössä huomioidaan, sillä muuten saadaan väärä inhibitioprosentti.

▼**M4**

Testikemikaalin aiheuttaman inhibition aste lasketaan seuraavasti:

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

jossa:

R_c = poistumaprosentti kontrolliastioissa

R_t = poistumaprosentti testiastioissa

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Reynolds L et al. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

2) Tämän liitteen luku C.11 Biologinen hajoaminen – aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

3) ISO 8192 (2007) Water quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

4) ISO 15522 (1999) Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Lisäys 5

Heikosti veteen liukenevat testikemikaalit – haihtuvat kemikaalit

Heikosti veteen liukenevat kemikaalit

Heikosti veteen liukenevien ja liukenemattomien kemikaalien käytöstä jätevedenpuhdistusta simuloivissa testeissä on julkaistu vähän raportteja (1)(2)(3).

Ei ole yhtä testikemikaalin dispergointitapaa, joka soveltuisi kaikille liukenemattomille kemikaaleille. ISO 10634 -standardissa (4) kuvataan neljä tapaa, joista kaksi vaikuttaa soveltuvan testikemikaalien dispergointiin simulaatiotutkimusta varten: emulgointiaineiden käyttö ja/tai ultraäänienergia. Syntyvän dispersion stabiliteetti on määritettävä vähintään 24 tunnin ajalta. Sen jälkeen riittävän stabiloituneet dispersiot, joita sekoitetaan jatkuvasti säiliössä (kohta 38), annostellaan ilmastussäiliöön erillään kotitalousjätevedestä (tai synteettisestä jätevedestä).

Jos dispersiot ovat stabiileja, tutki, miten testikemikaali voidaan määrittää dispergoituneessa muodossa. DOC ei todennäköisesti sovellu tarkoitukseen, joten testikemikaalia varten on määritettävä spesifinen analyysimenetelmä, jota voidaan soveltaa poistoveteen, poistoveden kiintoainekseen ja aktiivilietteeseen. Sen jälkeen testikemikaalin kohtalo aktiivilieteprosessin simulaatiossa määritetään nestefaasissa ja kiinteässä faasissa. Näin saadaan massatase, jonka perusteella päätetään, onko testikemikaali hajonnut biologisesti. Tämä voi kuitenkin viitata vain primaariseen biohajoamiseen. Lopullinen biohajoaminen on pyrittävä osoittamaan soveltamalla nopean biologisen hajoavuuden respirometrista testiä (tämän liitteen luku C.4. C, F tai D (5)) ja käyttämällä inokulaattina lietettä, joka on altistunut testikemikaalille simulaatiotutkimuksessa.

Haihtuvat kemikaalit

Jätevedenpuhdistuksen simulaatioiden soveltaminen haihtuviin kemikaaleihin on kyseenalaista ja ongelmallista. Haihtuvien kemikaalien käytöstä simulaatiotutkimuksissa on julkaistu vain vähän raportteja, samoin kuin heikosti veteen liukenevista testikemikaaleistakin. Perinteinen täysin sekoittava laite mukautetaan tiivistämällä ilmastus- ja selkeytyssäiliöt, mittaamalla ja kontrolloimalla ilmavirtausta virtausmittareilla sekä keräämällä haihtuva orgaaninen aine kuljettamalla ulostuleva kaasu erottimien läpi. Joissakin tapauksissa käytetään tyhjiöpumppua, jolla ulostuleva kaasu ohjataan ”kylmäerottimen” läpi tai erottimeen (purge trap), jossa on Tenaxia ja silikageeliä, kaasukromatografista analyysiä varten. Erottimessa oleva testikemikaali voidaan määrittää analyyttisesti.

Testi tehdään kahdessa osassa. Ensin yksiköitä käytetään ilman lietettä, mutta niissä on synteettistä jätevettä ja testikemikaalia, jota pumpataan ilmastussäiliöön. Kaasunäytteitä kerätään tulovedestä, poistovedestä ja ulostulevasta kaasusta, ja niitä analysoidaan parin päivän ajan. Kerättyjen tietojen perusteella voidaan laskea järjestelmästä haihtuneen testikemikaalin prosenttimäärä (R_{vs}).

Sen jälkeen tehdään normaali biologinen testi (lietteen kanssa) identtisissä olosuhteissa kuin haihtuvuustutkimus (stripping). DOC- tai COD-mittaukset tehdään myös, jotta nähdään, toimivatko yksiköt tehokkaasti. Ajoittaisilla analyyseillä määritetään testikemikaali tulovedessä, poistovedessä ja ulostulevassa kaasussa testin ensimmäisessä osiossa. Adaptoitumisen jälkeen analyysejä tehdään useammin. Tasapainotilassa saaduista tiedoista voidaan jälleen laskea testikemikaalin poistumaprosentti nestefaasista kaikilla prosesseilla (R_T) (fyysiset ja biologiset) sekä järjestelmästä haihtunut osuus (R_V).

▼**M4**

Laskelma:

a) Ei-biologisessa testissä järjestelmästä haihtuneen testimateriaalin määrä prosentteina (R_{VP}) voidaan laskea seuraavasti:

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

jossa

R_{VP} = testikemikaalin poistuminen haihtumalla (%)

S_{VP} = erottimeen kerätty testikemikaali ilmaistuna vastaavana pitoisuutena nestefaasissa (mg/l)

S_{IP} = testikemikaalin pitoisuus tulovedessä (mg/l).

b) Biologisessa testissä järjestelmästä haihtuneen testimateriaalin määrä prosentteina (R_V) voidaan laskea seuraavasti:

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

jossa

R_V = testikemikaalin poistuminen haihtumalla biologisessa testissä (%)

S_V = erottimeen biologisessa testissä kerätty testikemikaali ilmaistuna vastaavana pitoisuutena nestemäisessä tulovirrassa (mg/l)

S_I = testikemikaalin pitoisuus tulovedessä (mg/l).

c) Biologisessa testissä kaikissa prosesseissa poistuneen testikemikaalin prosenttimäärä (R_T) saadaan seuraavasti:

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

jossa

S_E = testikemikaalin pitoisuus (nestemäisessä) poistovirrassa (mg/l).

d) Niinpä biohajoamisen ja adsorption poistama prosenttiosuus (R_{BA}) voidaan laskea seuraavasti.

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

Erillisillä testeillä on määritettävä, adsorboituuko testikemikaali. Jos adsorboituu, lisäkorjaus voi olla tarpeen.

e) Biologisesta (R_v) ja ei-biologisesta (R_{vp}) testijärjestelmästä haihtuneen testikemikaalin osuuden vertailu osoittaa, miten biologinen käsittely on vaikuttanut testikemikaalin päästöön ilmakehään.

Esimerkki: bentseeni

Lietteen retentioaika = 4 päivää

Synteettinen jätevesi, retentioaika = 8 h

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Niinpä

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

R_T = 100 % ja R_{BA} = 85 %.

Bentseenin ei oletettu adsorboituneen lietteeseen.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.

2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4) ISO 10634 (1995) Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

5) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

▼M4

Lisäys 6

Lietteen retentioajan (SRT) vaikutus kemikaalien käsiteltävyyteen

JOHDANTO

1. Päätekstissä kuvatun menetelmän tarkoitus on varmistaa, voivatko testatut kemikaalit (yleensä tunnetusti luontaisesti biohajoavia, mutta eivät helposti biohajoavia) hajota biologisesti jätevedenpuhdistamon asettamissa rajoissa. Tulokset ilmaistaan poistumaprosenttina ja biologisena hajoamisprosenttina. Aktiivilieteyksiköiden toimintaolosuhteet ja tuloveden valinta sallivat hyvin suuren vaihtelun testikemikaalin pitoisuudessa poistovedessä. Testit tehdään vain yhdellä lietteen kiintoaineksen nimellisellä pitoisuudella tai yhdellä nimellisellä lietteen retentioajalla (SRT), ja kuvatut lietteen poistumatavat voivat aiheuttaa SRT-arvon merkittävää vaihtelua testin kuluessa, sekä päivästä toiseen että päivän aikana.

2. Tässä muunnelmassa (1)(2) SRT:tä kontrolloidaan paljon tiukemmissa rajoissa jokaisen 24 tunnin jakson aikana (kuten suuressa mittakaavassakin tapahtuu), jolloin pitoisuus poistovesissä on paljon yhtenäisempi. Kotitalousjätevesi on suositeltavaa, koska sillä saadaan yhtenäisemmät ja korkeammat poistumaprosentit. Lisäksi tutkitaan useiden SRT-arvojen vaikutuksia, ja tarkemmassa tutkimuksessa voidaan määrittää eri lämpötilojen vaikutuksia pitoisuuteen poistovedessä.

3. Vielä ei ole yleistä yksimielisyyttä siitä, mitkä kineettiset mallit toimivat, kun kemikaalit hajoavat biologisesti jätevedenpuhdistuksessa vallitsevissa olosuhteissa. Kerättyihin tietoihin päätettiin soveltaa Monodin bakteerikasvun ja substraatin hyödyntämisen mallia (1)(2), sillä menetelmä oli tarkoitettu vain suurina tonnimäärinä tuotetuille kemikaaleille, jolloin pitoisuudet jätevedessä ovat yli 1 mg/l. Yksinkertaistetun mallin ja tehtyjen olettamusten luotettavuus määritettiin käyttämällä joukkoa alkoholietoksylaatteja, joiden primaarisen biohajoavuuden aste vaihteli (2)(3).

Huomautus: Tämä menetelmämuunnelma vasta suurta osaa kohdassa C.10-A kuvatun testimenetelmän tekstistä, ja tästä eteenpäin annetaan vain siitä poikkeavat tiedot.

TESTIN PERIAATE

4. Huokoisia aktiivilieteastioita, jotka on suunniteltu helpottamaan seoksen (melkein) jatkuvaa poistumaa ja jotka mahdollistavat lietteen retentioajan (SRT tai θ_s) hyvin tarkan seurannan, käytetään yhdistämättömässä tilassa useilla lietteen retentioajoilla ja valinnaisesti myös useissa lämpötiloissa. Retentioaika on yleensä 2–10 vuorokautta ja lämpötila 5–20 °C. Jätevesi, joka on mieluiten kotitalousjätevettä, ja testikemikaaliliuos annostellaan erikseen yksiköihin nopeudella, jolla saadaan tarvittava lietteen retentioaika (3–6 tuntia) ja testikemikaalin tarvittava pitoisuus tulovedessä. Kontrolliyksiköitä, joihin ei lisätä testikemikaalia, käytetään rinnakkain vertailua varten.

5. Muun tyyppisiä laitteita voidaan myös käyttää, mutta silloin on varmistettava huolellisesti, että SRT:n kontrollointi onnistuu hyvin. Jos käytetään esimerkiksi laitoksia, joissa on laskeutin, kiintoaineksen hävikki laitoksen poistoveden mukana voi olla tarpeen huomioida. Lisäksi on ryhdyttävä erityisiin varotoimiin, jotta laskeuttimessa olevan lietteen määrän vaihtelusta johtuvat virheet voidaan välttää.

▼M4

6. Yksiköitä käytetään kaikissa valituissa olosuhteissa, ja kun tasapainotila on saavutettu, testikemikaalin keskimääräiset pitoisuudet poistovesissä tasapainotilassa ja valinnaisesti DOC määritetään noin 3 viikon pituisen jakson aikana. Testikemikaalin poistumaprosentin ja valinnaisesti DOC:n arvioinnin lisäksi ilmaistaan laitoksen toimintaolosuhteiden ja poistovirran pitoisuuden välinen suhde graafisessa muodossa. Tästä voidaan laskea alustavat kineettiset vakiot ja ennustaa olosuhteet, joissa testikemikaalia voidaan käsitellä.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

7. Luvun C.10 A kohdat 12 ja 13 pätevät.

KYNNYSARVOT

8. Luvun C.10 A kohdat 14 ja 15 pätevät.

VERTAILUTESTIKEMIKAALI

9. Luvun C.10 A kohta 16 pätee.

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

10. Luvun C.10 A kohdat 17 ja 18 pätevät.

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

11. Soveltuva laite on muunneltu huokoinen astia (lisäys 6.1). Siinä on huokoisesta polypropeenista valmistettu sisäastia (tai sisäkappale), jonka paksuus on 3,2 mm ja huokoskoko noin 90 μm ja jossa on puskuhitsausliitos. (Siksi se on tukevampi kuin tämän luvun C.10 A kohdassa 21 kuvattu yksikkö). Sisäastia asetetaan läpäisemättömään polyeteeniseen ulkoastiaan, jossa on kaksi osaa: pyöreä pohja, johon porataan reiät kahta ilmaletkua ja lietteenpoistoletkua varten, ja yläsylinteri, joka ruuvataan kiinni pohjaan ja jonka ulostulo on sijoitettu siten, että se antaa tunnetun tilavuuden (3 l) huokoiseen astiaan. Toisessa ilmaletkussa on diffuusorikivi. Toisen pää on avoin, ja se on sijoitettu kohtisuorassa astiassa olevaan kiveen. Tämä järjestelmä tuottaa tarvittavan turbulenssin, jotta astian sisältö sekoittuu täydellisesti, ja sillä saadaan liuenneen hapen pitoisuuksiksi yli 2 mg/l.

12. Soveltuva määrä yksiköitä pidetään kontrolloiduissa lämpötiloissa alueella 5–20 °C (± 1 °C) joko vesihauteessa tai huoneissa, joiden lämpötila on vakio. Tarvitaan pumput, joilla testikemikaali ja selkeytetty jätevesi voidaan annostella tarvittavalla nopeudella ilmastusastioihin (testikemikaali 0–1,0 ml/min ja jätevesi 0–25 ml/min), ja kolmas pumppu, jolla jäteliete poistetaan ilmastusastioista. Jotta jätelietteen virtausnopeus saadaan vaadittavalle hyvin alhaiselle tasolle, pumppuja käytetään suurella nopeudella ja jaksoittaisesti ajastimen avulla (esim. 10 sekuntia minuutissa ja pumpun tuotto 3 ml/min, jolloin poistumanopeudeksi saadaan 0,5 ml/min).

Suodatinlaite tai sentrifugi

13. Luvun C10 A kohta 23 pätee.

Analyysilaitteet

14. Luvun C.10 A kohta 24 pätee.

Vesi

▼**M4**

15. Luvun C.10 A kohdat 25 ja 26 pätevät.

Orgaaninen aine

16. Luvun C.10 A kohta 27 pätee.

Synteettinen jätevesi

17. Luvun C.10 A kohta 28 pätee.

Kotitalousjätevesi

18. Luvun C.10 A kohta 29 pätee.

Aktiiviliete

19. Luvun C10 A kohta 30 pätee.

Testikemikaalin kantaliuokset

20. Luvun C.10 A kohdat 31 ja 32 pätevät.

MENETTELY

Inokulaatin valmistus

21. Vain luvun C.10 A kohta 34 pätee – käytä aktiivilietettä (noin 2,5 g/l).

Testiyksiköiden määrä

22. Yksinkertaisessa testissä, jolla mitataan esimerkiksi poistumaprosenttia, tarvitaan vain yksi SRT, mutta 4 tai 5 STR-arvoa on tarpeen, jotta saadaan alustavien kineettisten vakioiden laskemiseen tarvittavat tiedot. Valitut arvot ovat yleensä välillä 2–10 päivää. Käytännössä on kätevää tehdä testi samanaikaisesti neljällä tai viidellä SRT:llä yhdessä lämpötilassa. Laajoissa tutkimuksissa samoja SRT-arvoja tai ehkä eri arvoja käytetään muissa lämpötiloissa (5–20 °C). Primaarisessa biohajoamisessa (pääkäyttö) tarvitaan yleensä vain yksi yksikkö yhtä olosuhdejoukkoa kohden. Lopullisessa biohajoamisessa tarvitaan kuitenkin kontrolliyksikkö jokaista olosuhdejoukkoa kohden. Kontrolliyksikköön lisätään jätevettä mutta ei testikemikaalia. Jos käytetyssä jätevedessä epäillään olevan testikemikaalia, kontrolliyksiköiden käyttö on tarpeen primaarisen biohajoamisen arvioinnissa ja laskelmiin on tehtävä tarvittavat korjaukset.

Orgaanisen aineen ja testikemikaalin annostelu

23. Luvun C.10 A kohdat 36 ja 39 pätevät, mutta huomioi, että testikemikaaliliuos annostellaan erikseen ja että käytössä on useita lietteen poistumanopeuksia. Seuraa tulo- ja poistoveden virtausnopeuksia sekä lietteen poistumaa säännöllisesti, esimerkiksi kahdesti päivässä, ja säädä ne tarvittaessa ± 10 prosentin sisään. Jos analyysimenetelmissä ilmenee ongelmia, kun käytetään kotitalousjätevettä, tee testi synteettisellä jätevedellä, mutta varmista, että eri aine antaa verrattavissa olevat kineettiset tiedot.

Aktiivilieteyksiköiden käsittely

24. Luvun C.10 A kohdat 40–43 pätevät, mutta kontrolloi SRT:tä vain lietteen ”jatkuvalla” poistumalla.

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

25. Luvun C.10 A kohdat 44–50 pätevät, paitsi että testikemikaalin pitoisuus on määritettävä ja valinnaisesti DOC. COD:ta ei käytetä.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

26. Luvun C.10 A kohdat 52–54 pätevät.

Testitulosten ilmaiseminen

27. Luvun C.10 A kohdat 56–62 pätevät.

Kineettisten vakioiden laskenta

28. On realistisempaa antaa testikemikaalin keskimääräinen pitoisuus tasapainotilassa ja kuvata, miten se vaihtelee laitoksen toimintaolosuhteissa, kuin antaa primaarinen biohajoamisprosentti. Tämän voi tehdä tarkastelemalla lisäyksessä 6.2 annettua kaavaa (6), jolla saadaan K_S-, μ_m- ja θ_{SC}-arvot (kriittinen lietteen retentioaika).

(Vaihtoehtoisesti likimääräiset K_S- ja μm-arvot saadaan käyttämällä yksinkertaista tietokone-ohjelmaa, jolla kaavasta 2 (lisäys 6.2) laskettu teoreettinen kaava sovitetaan saatuihin kokeellisiin arvoihin. Vaikka mikään ratkaisu ei ole ainutlaatuinen, saadaan K_S- ja μm-arvot, jotka ovat kohtuullisen lähellä.)

Tulosten vaihtelevuus

29. On yleistä, että yksittäisille kemikaaleille saadaan erilaisia kineettisten parametrien arvoja. Arvellaan, että lietteen kasvuolosuhteilla sekä testissä vallitsevilla olosuhteilla (kuten kohdassa 5 ja muissa testeissä) on suuri vaikutus saatuihin arvoihin. Grady *et al* (4) ovat käsitelleet tätä vaihtelevuutta yhdestä näkökulmasta ja ehdottaneet, että termejä ”olemassa oleva” ja ”ominainen” pitäisi soveltaa kahteen ääriolosuhteeseen, jotka edustavat fysiologisen tilan ääripäitä, joita viljelmä voi saavuttaa kineettisen kokeen aikana. Jos tilan ei anneta muuttua testin aikana, kineettisten parametrien arvot heijastavat sen ympäristön olosuhteita, joista mikro-organismit on otettu. Näitä arvoja kutsutaan ”olemassa oleviksi”. Toisessa ääripäässä testin olosuhteet ovat sellaiset, että ne sallivat proteiinisynteesijärjestelmän täydellisen kehittymisen ja siten suurimman mahdollisen kasvunopeuden, saatuja kineettisiä parametreja kutsutaan ”ominaisiksi”, ja ne määräytyvät ainoastaan substraatin luonteen ja viljelmässä olevien bakteerien tyypin mukaan. Ohjenuorana on, että olemassa olevat arvot saadaan pitämällä substraatin pitoisuuden ja kompetenttien mikro-organismien välinen suhde (S_o/X_o) pienenä, esim. 0,025, ja ominaiset arvot saadaan, kun suhde on korkea eli vähintään 20. Kummassakin tapauksessa S_o-arvon pitää olla yhtä suuri tai suurempi kuin Ks-arvo (puolikyllästysvakio).

30. Vaihtelevuudesta ja muista biohajoavuuden kinetiikan näkökulmista keskusteltiin hiljattain pidetyssä SETAC-työpajassa (5). Raportoidut ja suunnitellut tutkimukset selventävät jätevedenpuhdistamojen kinetiikkaa, jotta olemassa olevat tiedot voidaan tulkita paremmin, ja niissä ehdotetaan paremmin soveltuvia suunnitelmia tulevia testimenetelmiä varten.

KIRJALLISUUSVIITTEET:

1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼**M4**

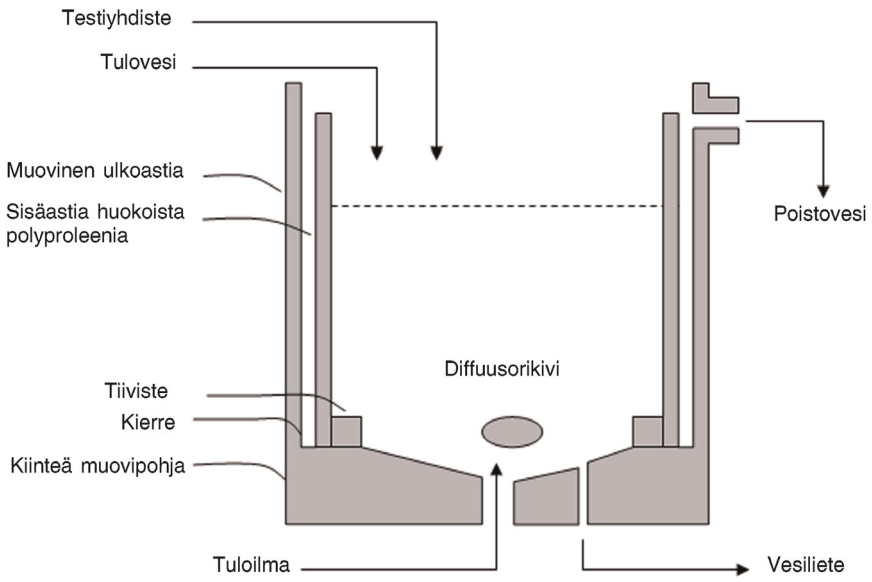
4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Lisäys 6.1

Huokoinen astia, jossa SRT-kontrolli



▼M4

Lisäys 6.2

Kineettisten vakioiden laskenta

1. Jos oletetaan, että Monodin kinetiikka pätee ja otetaan huomioon aktiivisen kiintoaineen ja substraatin massatase aktiivilietejärjestelmässä (1), saadaan seuraavat tasapainotilan lausekkeet:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

tai

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

jossa

S_1 = substraatin pitoisuus poistovedessä (mg/l)

K_S = puolikyllästysvakio; pitoisuus, jossa $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = spesifinen kasvunopeus (d^{-1})

μ_m = μ_m:n enimmäisarvo (d^{-1})

K_d = aktiivisen kiintoaineen spesifinen hajoamisnopeus (d^{-1})

θ_S = lietteen retentioajan keskiarvo, SRT (d)

Tästä yhtälöstä voi tehdä seuraavat päätelmät:

i) Pitoisuus poistovedessä ei ole riippuvainen pitoisuudesta tulovedessä (S_0). Niinpä biohajoamisprosentti vaihtelee tuloveden pitoisuuden (S_0) mukaan.

ii) Ainoa laitoksen kontrolliparametri, joka vaikuttaa S_1-arvoon, on lietteen retentioaika (θ_S).

iii) Tietylle pitoisuudelle tulovedessä (S_0) on kriittinen lietteen retentioaika:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

jossa

θ_{SC} = lietteen kriittinen retentioaika, jonka alla kompetentit mikro-organismit huuhtoutuvat laitoksesta.

iv) Koska yhtälön (2) muut parametrit liittyvät kasvukinetiikkaan, lämpötila vaikuttaa todennäköisesti poistoveden substraattitasoon ja lietteen kriittiseen ikään. Toisin sanoen tietynasteiseen käsittelyyn vaadittava lietteen retentioaika kasvaa, kun lämpötila laskee.

2. Kun otetaan huokoisten astioiden kiintoaineen massatase ja oletetaan, että kiintoaineen pitoisuus poistovedessä (X_2) on pienempi kuin ilmastusastiassa (X_1), lietteen retentioaika:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

ja

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

jossa

V = ilmastusastian tilavuus (l)

X_1 = kiintoaineen pitoisuus ilmastusastiassa (mg/l)

X_2 = kiintoaineen pitoisuus poistovedessä (mg/l)

Q_0 = tuloveden virtausnopeus (l/d)

Q_1 = jätelietteen virtausnopeus (l/d)

Niinpä lietteen retentioaikaa voidaan kontrolloida missä tahansa ennalta valitussa arvossa kontrolloimalla jätelietteen virtausnopeutta Q_1.

Päätelmät

3. Tämän testin päätarkoitus on mahdollistaa pitoisuuden arviointi poistovedessä ja siten testikemikaalin määrä vesissä, joihin päästöt kohdistuvat.

4. Kun esitetään S_1, vs. θ_S, lietteen kriittisen retentioajan θ_{SC} arviointi voi olla helppoa (esim. käyrä 3 kuvassa 1). Jos tämä ei ole mahdollista, θ_{SC} sekä likimääräiset μ_m- ja K_S-arvot voidaa laskea esittämällä S_1, vs. $S_1 \bullet \theta_S$.

Järjestämällä yhtälö (1) uudelleen saadaan

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

Jos K_d on pieni, $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ ja [5]:stä tulee:

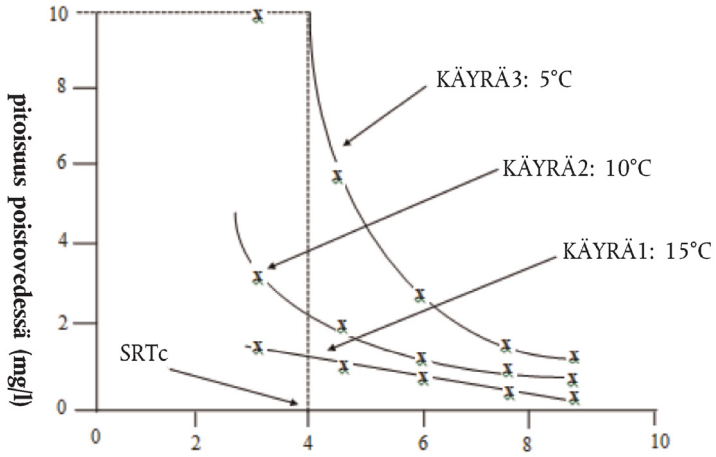
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Niinpä käyrän pitäisi olla suora viiva (katso kuva 2), jonka kaltevuus on $1/\mu_m$ ja joka leikkaa kuvaajan K_S/μ_m, myös $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

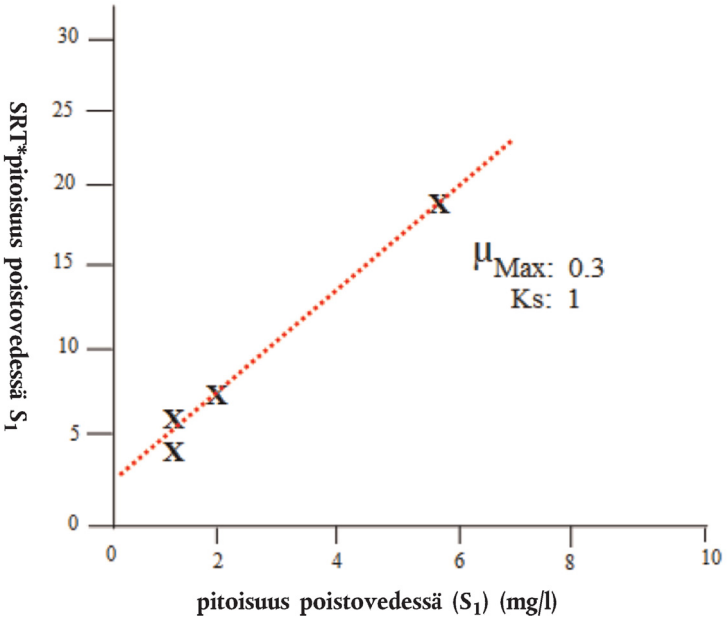
Kuva 1

Kolme lämpötilaa, viisi SRT-arvoa



Kuva 2

Regressiokuvaaja SRT S_1 vs. S_1, kun lämpötila on = 5 °C



Sanasto:

pitoisuus poistovedessä

käyrä

▼M4

Lisäys 7

TESTAUS PIENELLÄ PITOISUUSALUEELLA (μg/l)

1. Monia kemikaaleja esiintyy vesiympäristössä ja jopa jätevedessä hyvin pieninä pitoisuuksina (μg/l). Näin pieninä pitoisuuksina ne eivät todennäköisesti toimi ensisijaisina substraatteina, jotka aiheuttavat kasvua, vaan hajoavat todennäköisemmin kasvua aiheuttamattomina toissijaisina substraatteina samaan aikaan kuin joukko luonnossa esiintyviä hiilikemikaaleja. Siksi tällaisten kemikaalien hajoaminen ei sovi lisäyksessä 6 kuvattuun malliin. On olemassa monia soveltuvia malleja, ja jätevedenpuhdistamoissa vallitsevissa olosuhteissa usea malli saattaa toimia samanaikaisesti. Tämän ongelman ratkaisemiseksi tarvitaan paljon lisää tutkimusta.

2. Sillä välin voidaan noudattaa päätekstissä kuvattua menetelmää (luku C.10 A), mutta ainoastaan primaarisen biohajoamisen osalta, kun käytetään soveltuvan pieniä pitoisuuksia (< 100 μg/l) ja validoitua analyyttistä menetelmää. Biohajoamisprosentti voidaan laskea (katso testimenetelmän kohta 54), kun abioottiset prosessit (adsorptio, haihtuvuus jne.) otetaan huomioon. Esimerkkinä tästä on Nyholmin ja kumppaneiden tutkimus (1)(2), jossa käytettiin 4 tunnin jaksoa täyttö- ja poistojärjestelmässä. He ilmoittivat pseudo-ensimmäisen kertaluvun vakiot viidelle kemikaalille, joita lisättiin synteettiseen jäteveteen pitoisuudella 5–100 μg/l. (Lopulliseen biohajoamiseen voidaan käyttää ^{14}C-leimattuja testikemikaaleja. Tämän kuvaus ei kuulu tämän testimenetelmän alaan, sillä menetelmistä ei ole vielä sovittu, joskin ISO 14592 -standardissa (3) ehdotetussa menetelmässä on ohjeita ^{14}C-leimattujen kemikaalien käytöstä.

SCAS-testi

3. Myöhemmin ehdotettiin yksinkertaisempaa kaksivaiheista testiä (4)(5)(6). Puolijatkuvan aktiivilietteen (SCAS) menetelmän jälkeen SCAS-yksiköistä otetuille näytteille tehdään lyhytaikaisia kineettisiä testejä. SCAS-järjestelmää käytetään tunnetuilla lietteen poistumanopeuksilla (toisin kuin alkuperäisessä C.12-testimenetelmässä), ja siihen syötetään OECD:n synteettistä jätevettä tai kotitalousjätevettä. Synteettistä jätevettä muutettiin (koska pH-arvo muuttui ja liete selkeytyi heikosti) lisäämällä siihen fosfaattia puskurina, hiivauutetta, rauta(III)kloridia ja hivenainesuoloja, ja COD nostettiin noin arvoon 750 mg/l lisäämällä peptonin ja lihauutteen pitoisuutta. Yksiköt toimivat 24 tunnin jaksoissa: ilmastus 23 h, lietteen poistuma, selkeyttäminen, kelluvan nesteen (poistoveden) poisto ja sen jälkeen synteettisen jäteveden ja testikemikaalin lisäys, enintään 100 μg/l, (eli suunnilleen sama pitoisuus kuin lyhytaikaisessa testissä). Kerran viikossa 10 prosenttia lietteen kokonaismäärästä korvattiin tuoreella lietteellä, jotta mikrobipopulaatio pysyy tasapainossa.

4. Testikemikaalin pitoisuudet mitataan testin alussa ja ilmastuksen lopussa, ja testiä jatketaan, kunnes saavutetaan testikemikaalin vakiopoistuma. Tässä kestää yhdestä viikosta useaan kuukauteen.

Lyhytaikainen testi

5. Lyhyellä testillä (esim. 8 tuntia) määritetään testikemikaalin hajoamisen (pseudo)-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan nopeusvakio aktiivilietteessä, jolla on tunnettu mutta eri alkuperä ja historia. Erityisesti lietenäytteitä otetaan SCAS-reaktoreista – ilmastusjakson lopussa, kun orgaanisen substraatin pitoisuus on pieni – adaptaatiokokeen (kohdat 3, 4) aikana. Lietettä voidaan ottaa vertailutarkoituksessa myös rinnakkaisesta SCAS-yksiköstä, jota ei altisteta testikemikaalille. Lietteen ja testikemikaalin seokset, joita lisätään vähintään

▼M4

kahdella pitoisuudella alueella 1–50 μg/l, ilmastetaan lisäämättä synteettistä jätevettä tai muuta orgaanista substraattia. Liuoksessa jäljellä oleva testikemikaali määritetään säännöllisin välein kemikaalin hajoavuuden mukaan, esimerkiksi kerran tunnissa, jaksona, jonka pituus ei saa olla yli 24 h. Näytteet sentrifugoidaan ennen asianmukaista analyysiä.

Laskelmat

6. SCAS-yksiköiden tietojen perusteella lasketaan testikemikaalin poistumaprosentti (kohta 54). Lisäksi voidaan laskea keskimääräinen nopeusvakio K_1 (kiintoaineiden pitoisuuden suhteen normalisoitu) seuraavasti:

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

jossa

t = ilmastusaika (23 h)

C_e = pitoisuus ilmastusjakson lopussa (μg/l)

C_i = pitoisuus ilmastusjakson alussa (μg/l)

SS = aktiivilietteen kiintoaineen pitoisuus (g/l)

7. Lyhytaikaisessa testissä jäljellä oleva log%-pitoisuus esitetään käyränä suhteessa aikaan, ja käyrän ensimmäisen osan (hajoaminen 10–50 prosenttia) kulmakerroin vastaa (pseudo)-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan vakiota K_1. Vakio normalisoidaan suhteessa lietteen kiintoaineen pitoisuuteen jakamalla kulmakertoimet kiinteiden aineiden pitoisuudella. Raportoidun tuloksen täytyy sisältää myös tiedot testikemikaalin ja kiintoaineen alkuperäisistä pitoisuuksista, lietteen retentioajasta, lietteen lisäyksestä ja lähteestä sekä mahdollisesta aiemmasta altistuksesta testikemikaalille.

Tulosten vaihtelevuus

8. Vaihtelevuudesta ja muista biohajoavuuden kinetiikan näkökulmista keskusteltiin hiljattain pidetyssä SETAC-työpajassa (7). Raportoidut ja suunnitellut tutkimukset selventävät jätevedenpuhdistamojen kinetiikkaa, jotta olemassa olevat tiedot voidaan tulkita paremmin, ja niissä ehdotetaan paremmin soveltuvia suunnitelmia tulevia testimenetelmiä varten.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998). Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biokalvot

JOHDANTO

1. Simulaatiotutkimuksia tehdään tavallisesti kemikaaleille, jotka eivät ole läpäisseet biohajoavuuden seulontatestiä (tämän liitteen luvun C.4 kohta A–F (9)), mutta ovat läpäisseet luontaisen biohajoavuuden testin. Poikkeustilanteissa simulaatiotutkimuksia voidaan tehdä myös mille tahansa kemikaalille, josta tarvitaan lisää tietoa, ja etenkin suurina tonnimäärinä tuotetuille kemikaaleille. Tällöin sovelletaan tavallisesti aktiivilietetestiä (C.10 A). Joissakin tapauksissa tarvitaan kuitenkin spesifistä tietoa siitä, miten kemikaali käyttäytyy jätevedenpuhdistusmenetelmissä, joissa käytetään biokalvoja (biosuodatus eli tihkusuodatus, biorotaattorit ja leijukerros). Tätä tarkoitusta varten on kehitetty useita erilaisia laitteita.

2. Gerike *et al.* (1) käyttivät suuria, pilottimittakaavaisia biologisia suodattimia, jotka yhdistettiin toisiinsa. Nämä suodattimet veivät paljon tilaa ja vaativat suhteellisen suuria määriä jätevettä tai synteettistä jätevettä. Truesdale *et al.* (2) kuvasivat pienempiä suodattimia (halkaisija 1,8 m × 15,2 cm), joihin syötettiin luonnollista jätevettä, jossa ei ollut pinta-aktiivista ainetta, mutta tarvittavat tilavuudet olivat edelleen melko suuria. Biokalvon ”kypsymiseen” kului jopa 14 viikkoa, ja testiaineena käytetyn pinta-aktiivisen aineen ensimmäisen lisäyksen jälkeen kesti vielä 4–8 viikkoa, ennen kuin mukautuminen tapahtui.

3. Baumann *et al.* (3) kehittivät huomattavasti pienemmän suodattimen, jossa biokalvoa tukevana inerttinä aineena käytettiin ”polyesterifleeceä”, jota oli liotettu aiemmin aktiivilietteessä. Testikemikaalia käytettiin ainoana hiilen lähteenä, ja biohajoavuutta arvioitiin mittaamalla liuennut orgaaninen hiili (DOC) tulo- ja poistovedessä sekä ulostulevan kaasun CO_2-määrän perusteella.

4. Gloyna *et al.* (4) käyttivät hyvin erilaista lähestymistapaa. He keksivät pyörivän putkireaktorin. Pyörivän putken sisäpintaan kasvatettiin biokalvo tunnetulle pinta-alalle syöttämällä tulovettä putken yläpäästä, kun putki oli kallistettu pieneen vaakasuuntaiseen kulmaan. Reaktoria on käytetty pinta-aktiivisten aineiden biohajoavuuden tutkimiseen (5) sekä biokalvon optimaalisen paksuuden ja kalvon läpi tapahtuvan diffuusion tutkimiseen (6). Jälkimmäisenä mainitut tekijät jatkokehittivät reaktoria muokkaamalla sitä mm. siten, että ulostulevasta kaasusta voidaan määrittää CO_2.

5. Yhdistyneen kuningaskunnan SCA (Standing Committee of Analysts) on hyväksynyt pyörivän putkireaktorin kemikaalien biohajoavuuden (7) sekä jätevesien käsiteltävyyden ja toksisuuden (8) määrittämisen vakiomenetelmäksi. Tässä kuvatun menetelmän etuja ovat yksinkertaisuus, pieni koko, toistettavuus ja orgaanisen aineen suhteellisen pienet tilavuudet.

TESTIN PERIAATE

6. Synteettistä jätevettä tai kotitalousjätevettä sekä testikemikaalia lisätään sekoitettuna tai erikseen hitaasti pyörivän, kallistetun putken sisäpinnalle. Sisäpintaan kasvaa biosuodatusaineessa esiintyviä mikro-organismeja vastaava mikro-organismikerros. Reaktorin toimintaolosuhteet valitaan siten, että orgaanisen aineen poistuminen ja tarvittaessa ammoniumin hapettuminen on riittävää.

▼M4

7. Putken poistovesi kerätään ja laskeutetaan ja/tai suodatetaan, ennen kuin liuennut orgaaninen hiili (DOC) ja/tai testikemikaali analysoidaan spesifisellä menetelmällä. Kontrolliyksiköitä, joihin ei lisätä testikemikaalia, käytetään rinnakkain samoissa olosuhteissa vertailua varten. Poistoveden DOC-pitoisuuksien erot testi- ja kontrolliyksikössä johtuvat oletettavasti testikemikaalista ja sen orgaanisista metaboliiteista. Tätä eroa verrataan lisätyn kemikaalin pitoisuuteen (DOC:na), jotta voidaan laskea testikemikaalin poistuma.

8. Biohajoaminen voidaan tavallisesti erottaa biosorptiosta tarkastelemalla poistuma-aikakäyrää huolellisesti. Tulos voidaan yleensä vahvistaa biohajoavuuden testillä (hapenkulutus tai hiilidioksidin tuotanto), jossa käytetään sopeutunutta inokulaattia, joka on otettu testin loputtua reaktoreista, joihin testikemikaalia lisättiin.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

9. Testikemikaalin puhtauden, vesiliukoisuuden sekä haihtuvuus- ja adsorptio-ominaisuuksien on oltava tiedossa, jotta tulokset voidaan tulkita oikein.

10. Haihtuvia ja heikosti liukenevia kemikaaleja ei tavallisesti voida testata ilman erityisiä varotoimia (katso luvun C.10 A lisäys 5). Kemiallisen rakenteen tai vähintään empiirisen kaavan on oltava tiedossa, jotta voidaan laskea teoreettiset arvot ja/tai tarkistaa mitatut parametriarvot, kuten teoreettinen hapenkulutus (ThOD) ja DOC.

11. Tieto testikemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille (katso luvun C.10 A lisäys 4) voi olla hyödyllinen soveltuvia testipitoisuuksia valittaessa ja olennainen matalien biohajoavuusarvojen oikean tulkinnan kannalta.

KYNNYSARVOT

12. Alun perin pinta-aktiivisten aineiden primaarisen biohajoamisen täytyi olla vähintään 80 prosenttia, jotta kemikaalia voitiin markkinoida. Jos 80 prosentin arvoa ei saavuteta, tätä simulaatiotutkimusta (toteamiskoetta) voidaan soveltaa ja pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida vain, jos yli 90 prosenttia spesifisestä kemikaalista poistuu. Yleensä ei ole epäselvää, läpäisevätkö kemikaalit testin, ja poistumaprosenttia voidaan käyttää laskettaessa todennäköistä pitoisuutta ympäristössä, jota käytetään kemikaalin vaarallisuuden arvioinnissa. Useissa puhtaiden kemikaalien tutkimuksissa DOC:n poistumaprosentti oli yli 90 prosenttia yli kolmessa neljäsosassa tapauksista ja yli 80 prosenttia yli 90 prosentissa kemikaaleista, joissa ilmeni merkittävää biohajoavuutta.

VERTAILUKEMIKAALIT

13. Jotta voidaan varmistaa, että kokeellinen menetelmä suoritetaan oikein, on hyvä testata välillä kemikaaleja, joiden käyttäytyminen on tiedossa. Tällaisia kemikaaleja ovat esimerkiksi adipiinihappo, 2-fenyylifenoli, 1-naftoli, difeenihappo ja 1-naftoehappo.

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

14. Yhdistyneen kuningaskunnan laboratorion mukaan suhteellinen keskihajonta oli testien sisällä 3,5 prosenttia ja testien välillä 5 prosenttia (7).

▼**M4**

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

Pyörivät putkireaktorit

15. Laite (lisäyksen 8 kuvat 1 ja 2) koostuu akryyliputkikehikosta. Jokaisen putken pituus on 30,5 cm ja sisähalkaisija 5 cm, ja niitä kannattavat metallitukikehikossa olevat kumireunustetut pyörät. Jokaisessa putkessa on asennusreuna, jonka syvyys on noin 0,5 cm, jotta se pysyy pyörillä. Sisäpinta on karhennettu karkealla teräsvillalla, ja yläpäässä (syöttöpäässä) on 0,5 senttiä syvä sisäreuna, joka pitää nesteen sisällä. Putket on kallistettu vaakasuuntaisesti noin yhden asteen kulmaan, jotta vaadittu kontaktiaika saavutetaan, kun testiainetta lisätään puhtaaseen putkeen. Kumipyöriä pyöritetään hitaalla, muuttuvanopeuksisella moottorilla. Putkien lämpötilaa kontrolloidaan asentamalla ne lämpötilasäädettyyn huoneeseen.

16. Kun jokainen putkireaktori suljetaan hieman suurempaan suljettuun putkeen ja varmistetaan, että liitokset ovat kaasutiiviitä, ulostuleva CO_2-kaasu voidaan kerätä emäksiseen liuokseen myöhempää mittausta varten (6).

17. Jokaisesta putkesta kerätään 24 tunnin tuotos orgaanista ainetta ja mahdollisesti lisättyä testikemikaalia 20 l:n säilytysastiaan (A) (katso kuva 2). Testikemikaaliliuos voidaan tarvittaessa annostella erikseen. Lähellä jokaisen säilytysastian pohjaa on ulostulo, joka on yhdistetty soveltuvalla letkulla (esim. silikonikumisella) peristalttisen pumpun (B) kautta lasiseen tai akryyliseen syöttöputkeen, joka tulee 2–4 cm kallistetun putken (C) ylemmän pään (syöttöpään) sisään. Poistoveden annetaan tippua kallistetun putken alapäästä, josta se kerätään toiseen säilytysastiaan (D). Poistovesi selkeytetään tai suodatetaan ennen analyysiä.

Suodatinlaite-sentrifugi

18. Näytteiden suodattamiseen käytettävä kalvosuodatin, jonka huokoskoko on sopiva (aukon nimellishalkaisija 0,45 μm) ja joka adsorboi orgaanisia kemikaaleja tai vapauttaa mahdollisimman vähän orgaanista hiiltä. Jos käytettävät suodattimet vapauttavat orgaanista hiiltä, poista orgaaninen hiili pesemällä suodattimet huolellisesti kuumalla vedellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää sentrifugia, jolla voidaan saavuttaa 40 000 m/s^2:n kiihtyvyys.

19. Analyysilaitteet seuraavia määrityksiä varten:

— DOC / orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) tai kemiallinen hapenkulutus (COD)

— spesifinen kemikaali (HPLC, GC jne.) tarvittaessa

— pH, lämpötila, happamuus ja emäksisyys

— ammonium, nitriitti ja nitraatti, jos testit tehdään nitrifioivissa olosuhteissa.

Vesi

20. Vesijohtovesi, jossa DOC:tä on alle 3 mg/l.

21. Tislattu tai deionisoitu vesi, jossa DOC:tä on alle 2 mg/l.

▼M4

Orgaaninen aine

22. Orgaanisena aineena voidaan käyttää synteettistä jätevettä, kotitalousjätevettä tai näiden yhdistelmää. On osoitettu, että pelkän kotitalousjäteveden käyttö nostaa usein DOC:n poistumaprosenttia (aktiivilieteyksiköissä) ja sallii jopa sellaisten kemikaalien biologisen hajoamisen, jotka eivät hajoa biologisesti käytettäessä OECD:n synteettistä jätevettä. Niinpä kotitalousjäteveden käyttö on suositeltavaa. Mittaa jokaisen uuden orgaanisen aine-erän DOC-pitoisuus (tai COD-pitoisuus). Orgaanisen aineen happamuuden tai emäksisyyden täytyy olla tiedossa. Orgaaniseen aineeseen voi olla tarpeen lisätä soveltuvaa puskuria (natriumvetykarbonaattia tai kaliumvetyfosfaattia), jos happamuus tai emäksisyys on matala, jotta pH on 7,5 ± 0,5 reaktorissa testin aikana. Lisättävän puskurin määrä ja lisäämisen ajankohta on päätettävä tapauskohtaisesti.

Synteettinen jätevesi

23. Liuota yhteen litraan vesijohtovettä: 160 mg peptonia, 110 mg lihauutetta, 30 mg ureaa, 28 mg vedetöntä dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4), 7 mg natriumkloridia (NaCl), 4 mg kalsiumkloridihydraattia ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg magnesiumsulfaattiheptahydraattia ($MgSO_4.7H_2O$). Tämä OECD:n synteettinen jätevesi on esimerkki, ja siinä tulovirtauksen DOC-pitoisuuden keskiarvo on noin 100 mg/l. Vaihtoehtoisesti voi käyttää muita koostumuksia, joiden DOC-pitoisuus on suunnilleen sama ja jotka ovat lähempänä oikeaa jätevettä. Tätä synteettistä jätevettä voidaan valmistaa tislattuun veteen väkevöidyssä muodossa. Se säilyy viikon noin 1 °C:n lämpötilassa. Laimenna tarvittaessa vesijohtovedellä. (Tämä aine ei ole tyydyttävä, sillä esimerkiksi typpipitoisuus on hyvin korkea ja hiilipitoisuus suhteellisen matala, mutta parempia ehdotuksia ei ole tehty, lukuun ottamatta fosfaatin lisäämistä puskurina ja peptonin lisäämistä).

Kotitalousjätevesi

24. Käytä tuoretta selkeytettyä jätevettä, jota kerätään päivittäin puhdistamosta, johon tulee pääasiassa kotitalousjätevettä. Jätevesi kerätään primaarisen sedimentaatioaltaan ylivuotokanavasta tai aktiivilietelaitoksen syötöstä, eikä siinä saa juurikaan olla karkeita hiukkasia. Jätevettä voidaan käyttää, kun sitä on säilytetty usea päivä noin 4 °C:n lämpötilassa, jos voidaan todistaa, että DOC (tai COD) ei ole laskenut merkittävästi (alle 20 %) säilytyksen aikana. Jotta järjestelmän häiriöt voidaan välttää, jokaisen uuden erän DOC (tai COD) on säädettävä soveltuvaan vakioarvoon esimerkiksi vesijohtovedellä laimentamalla.

Voiteluaine

25. Peristalttisen pumpun rullat voidaan voidella glyserolilla tai oliiviöljyllä. Kumpikin aine sopii silikonikumisiin letkuihin.

Testikemikaalin kantaliuokset

26. Jos kemikaalin liukoisuus on riittävä, valmista kantaliuokset, joiden pitoisuus on soveltuva (esim. 1–5 g/l), deionisoituun veteen tai synteettisen jäteveden mineraaleihin. Tietoa liukenemattomista kemikaaleista on luvun C.10-A lisäyksessä 5. Tämä menetelmä soveltuu haihtuville kemikaaleille ilman, että putkireaktoreihin tarvitsee tehdä muutoksia (kohta 16). Määritä kantaliuoksen DOC ja TOC ja toista mittaukset jokaiselle uudelle erälle. Jos DOC- ja TOC-arvon välinen ero on yli 20 prosenttia, tarkista testikemikaalin vesiliukoisuus. Varmista, että saanto on riittävän hyvä (tavallisesti > 90 prosenttia on odotettavissa), vertaamalla nimellisarvoon DOC-arvoa tai testikemikaalin pitoisuutta, joka on mitattu kantaliuoksen ominaisanalyysilla. Varmista etenkin

▼M4

dispersioiden osalta, voidaanko DOC-arvoa käyttää analyyttisenä parametrina vai voidaanko käyttää ainoastaan testikemikaalikohtaista analyysimenetelmää. Näytteet on sentrifugoitava, jos kyseessä on dispersio. Mittaa jokaisen uuden erän DOC, COD tai testikemikaali ominaisanalyysilla.

27. Määritä kantaliuoksen pH. Äärimmäiset arvot viittaavat siihen, että kemikaalin lisääminen saattaa vaikuttaa testijärjestelmän aktiivilietteen pH-arvoon. Jos näin käy, neutraloi kantaliuos pienillä määrillä epäorgaanista happoa tai emästä, kunnes pH on 7 ± 0,5, mutta vältä testikemikaalin saostumista.

MENETTELY

Orgaanisen aineen valmistelu annostusta varten

28. Varmista, ettei tulo- ja poistoveden säiliössä tai tuloveden säiliöistä tulevissa ja poistoveden säiliöön johtavissa putkissa ole mikrobikasvustoja puhdistamalla ne huolellisesti ennen testiä ja testin aikana.

29. Valmista tuoretta synteettistä jätevettä (kohta 23) päivittäin joko kiintoaineesta tai väkevöidystä kantaliuoksesta laimentamalla sitä sopivassa suhteessa vesijohtovedellä. Mittaa tarvittava määrä sylinteriin ja lisää se puhtaaseen tuloveden säiliöön. Jos tarpeen, lisää synteettiseen jäteveteen tarvittava määrä testikemikaalin tai vertailukemikaalin kantaliuosta ennen laimentamista. Jos testikemikaalin häviötä on käytännöllistä tai tarpeellista välttää, valmista erillinen laimennettu testikemikaaliliuos erillisessä säiliössä ja syötä se kallistettuihin putkiin erillisellä annostelupumpulla.

30. Vaihtoehtoisesti (ja mieluiten) voidaan käyttää selkeytettyä kotitalousjätevettä (kohta 24), joka kerätään päivittäin tuoreena, jos mahdollista.

Pyörivien putkireaktoreiden toiminta

31. Yhden testikemikaalin arviointiin tarvitaan kaksi identtistä putkireaktoria, ja ne kootaan huoneessa, jonka lämpötilaa säädellään (tavallisesti 22 ± 2 °C).

32. Säädä peristalttinen pumppu pumppaamaan orgaanista ainetta (ilman testikemikaalia) nopeudella 250 ± 25 ml/h kallistettuihin putkiin, joita pyöritetään nopeudella 18 ± 2 rpm. Voitele pumpun putket aluksi voiteluaineella (kohta 25) ja toista voitelu säännöllisesti, jotta putket toimivat asianmukaisesti ja kestävät pitkään.

33. Säädä putkien kallistuskulma vaakasuuntaisesti siten, että puhtaaseen putkeen syötetyn liuoksen viipymäaika on 125 ± 12,5 sekuntia. Arvioi retentioaika lisäämällä syötettävään liuokseen ei-biologista merkkiainetta (esim. NaCl, inertti väriaine): huippupitoisuuden saavuttamiseen poistovedessä kuluvaa aikaa pidetään keskimääräisenä retentioaikana (kun kalvo on suurimmillaan, retentioaika voi nousta noin 30 minuuttiin).

34. Näiden nopeuksien ja aikojen on todettu tuottavan riittävät (> 80 %) DOC- (tai COD-) poistumat ja tuottavan nitrifioitua poistovettä. Virtausnopeutta on muutettava, jos poistuma ei ole riittävää tai jos on tarkoitus simuloida tietyn puhdistuslaitoksen toimintaa. Säädä jälkimmäisessä tapauksessa orgaanisen aineen annostelunopeutta, kunnes reaktorin toiminta vastaa puhdistuslaitoksen toimintaa.

▼M4

Ymppäys

35. Ilmalevinteinen ymppäys voi riittää käynnistämään mikro-organismien kasvun, kun käytetään synteettistä jätevettä. Muussa tapauksessa lisää 1 ml/l selkeytettyä jätevettä syötteeseen 3 päivän ajan.

Mittaukset

36. Tarkista säännöllisesti, että annosnopeudet ja pyörimisnopeudet ovat vaadituissa rajoissa. Mittaa myös poistoveden pH varsinkin, jos nitrifikaatio on odotettavissa.

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

37. Näytteenoton menetelmä, malli ja tiheys valitaan testin tarkoituksen mukaisesti. Tulo- ja poistovedestä voi ottaa hetkellisiä näytteitä tai kerätä näytteitä pitemmällä aikavälillä (esim. 3–6 h). Ota ensimmäisellä jaksolla (ilman testikemikaalia) näytteitä kahdesti viikossa. Suodata näytteet kalvojen läpi tai sentrifugoi kiihtyvyydellä 40 000 m/s^2 noin 15 minuutin ajan (kohta 18). Näytteet voi olla tarpeen selkeyttää ja/tai karkeasuodattaa ennen kalvosuodatusta. Määritä DOC (tai COD) ainakin kahdesti ja tarvittaessa BOD, ammonium ja nitriitti/nitraatti.

38. Kaikki analyysit on tehtävä mahdollisimman pian näytteiden keräämisen ja valmistelun jälkeen. Jos analysointia on lykättävä, säilytä näytteitä täysissä ja tiiviisti suljetuissa pulloissa pimeässä tilassa, jonka lämpötila on noin 4 °C. Jos näytteitä on säilytettävä yli 48 tuntia, säilö ne pakastamalla, hapottamalla tai lisäämällä soveltuvaa myrkyllistä kemikaalia (esim. 20 ml/l elohopea(II)kloridiliuosta, jonka pitoisuus on 10 g/l). Varmista, ettei säilömistapa vaikuta analyysin tuloksiin.

Esivaihe

39. Tässä vaiheessa pintabiokalvo kasvaa optimaaliseen paksuuteen. Siinä kestää yleensä noin 2 viikkoa, mutta ei kuitenkaan yli 6 viikkoa. DOC-poistuma (tai COD-poistuma) (kohta 44) kasvaa ja saavuttaa tasannearvon. Kun kummassakin putkessa saavutetaan vastaavat tasannearvot, toinen putki valitaan kontrolliputkeksi testin loppuvaiheen ajaksi. Putkien toiminnan on pysyttävä yhdenmukaisena tämän ajan.

Testikemikaalin lisääminen

40. Lisää tässä vaiheessa testikemikaali toiseen reaktoriin vaaditussa pitoisuudessa, yleensä 10–20 mg C/l. Kontrolliin tulee edelleenkin pelkkää orgaanista ainetta.

Akklimatisaatiojakso

41. Jatka DOC:n (tai COD:n) analysointia kahdesti viikossa, ja jos halutaan arvioida primaarista biohajoamista, mittaa myös testikemikaalin pitoisuus ominaisanalyysillä. Odota testikemikaalin ensimmäisen lisäyksen jälkeen 1–6 viikkoa (tai kauemmin erityisolosuhteissa), jotta akklimatisaatio tapahtuu. Kun poistumaprosentti (kohdat 43–45) saavuttaa enimmäisarvon, määritä 12–15 luotettavaa arvoa tasannevaiheessa noin 3 viikon aikana keskimääräisen poistumaprosentin arviointia varten. Testi on valmis, jos saavutetaan riittävän korkea poistumisaste. Yleensä testin ei ole tarkoitus kestää yli 12 viikkoa testikemikaalin ensimmäisen lisäämisen jälkeen.

▼M4

Kalvon irtoaminen liuskoina

42. Ylimääräistä kalvoa irtoaa säännöllisin väliajoin liuskoina putkista. Varmista tulosten vertailukelpoisuuden säilyminen antamalla testin kattaa vähintään kaksi täyttä kasvu- ja irtoamisjaksoa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

43. Laske testikemikaalin DOC-poistumaprosentti (tai COD-poistumaprosentti) jokaisen ajoitetun arvioinnin osalta käyttämällä kaavaa:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

jossa

D_t = DOC-poistumaprosentti (tai COD-poistumaprosentti) aikana t

Cs = testikemikaalin aiheuttama tuloveden DOC-pitoisuus (tai COD-pitoisuus), mieluiten arvioituna kantaliuoksen pitoisuuden ja lisätyn tilavuuden perusteella (mg/l)

E = testipoistovirrasta mitattu DOC-arvo (tai COD-arvo) aikana t (mg/l)

Eo = kontrollipoistovirrasta mitattu DOC-arvo (tai COD-arvo) aikana t (mg/l)

Tee samat laskelmat vertailukemikaalille, jos sellaista testataan.

Kontrollireaktorin toiminta

44. Orgaanisen aineen DOC-poistumisaste (tai COD-poistumisaste) (D_B) kontrollireaktoreissa antaa hyödyllistä tietoa, kun biokalvon biohajoamistoimintaa arvioidaan testin aikana. Laske poistumaprosentti seuraavan kaavan avulla:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\%$$

jossa

Cm = DOC (tai COD) kontrollitulovirran orgaanisessa aineessa (mg/l).

45. Laske testikemikaalin poistuma (D_{ST}), jos se on mitattu, ominaisanalyysillä jokaisella arviointikerralla seuraavalla kaavalla:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\%$$

jossa

Si = testikemikaalin mitattu tai mieluiten arvioitu pitoisuus testitulovirrassa (mg/l)

Se = testikemikaalin mitattu pitoisuus testipoistovirrassa aikana t (mg/l)

▼M4

Jos analyysimenetelmällä saadaan jätevedessä positiivinen arvo, joka vastaa arvoa S_c mg/l laske poistumaprosentti (D_{SC}) seuraavalla kaavalla:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\%$$

Testitulosten ilmaiseminen

46. Esitä poistumaprosentti D_t ja D_{ST} (tai D_{SC}), jos käytettävissä, graafisesti ajan funktiona (katso lisäys 2, luku C.10-A). Tasannevaiheessa otettujen 12–15 D_T-arvon (ja D_{ST}-arvon, jos käytettävissä) kokonaisluvuksi pyöristetty keskiarvo ja keskihajonta ovat testikemikaalin poistumaprosentti. Poistumakäyrän muodosta voidaan tehdä joitakin päätelmiä poistumisprosessista.

Adsorptio

47. Jos testikemikaalin DOC-poistuma on korkea testin alussa, testikemikaali poistuu todennäköisesti adsorboitumalla biokalvoon. Tämän todistaminen voi olla mahdollista määrittämällä kalvosta liuskoina irronneeseen kiintoaineeseen adsorboitunut testikemikaali. Adsorboituvien kemikaalien DOC-poistuma ei tavallisesti pysy korkeana koko testin ajan. Tavallisesti poistumisaste on korkea aluksi ja laskee sitten hiljalleen tasapainoarvoon. Jos adsorboitunut testikemikaali aiheutti kuitenkin mikrobipopulaation adaptoitumista, testikemikaalin DOC-poistuma nousee myöhemmin ja saavuttaa korkean tasannearvon.

Lag-vaihe

48. Samoin kuin staattisissa seulontatesteissä, monet testikemikaalit vaativat lag-vaiheet, ennen kuin biologinen hajoaminen on täydellistä. Lag-vaiheen aikana kompetentit bakteerit adaptoituvat eikä testikemikaalia poistu juuri lainkaan. Sen jälkeen alkaa näiden bakteerien alkukasvu. Tämä vaihe loppuu ja hajoamisvaiheen katsotaan alkavan suunnilleen silloin, kun noin 10 prosenttia testikemikaalin alkuperäisestä määrästä on poistunut (adsorptio huomioiden, jos sitä tapahtuu). Lag-vaihe on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Tasannevaihe

49. Jatkuvassa testissä poistumakäyrän tasannevaihe on vaihe, jossa hajoaminen on maksimaalista. Tasannevaiheen on kestettävä vähintään 3 viikkoa, ja sen aikana on mitattava noin 12–15 kelvollista arvoa.

Testikemikaalin keskimääräinen poistumisaste

50. Laske testikemikaalin tasannevaiheen poistumisarvojen D_t (ja D_{st}, jos käytettävissä) keskiarvo. Kun se pyöristetään lähimpään kokonaislukuun (1 %), saadaan testikemikaalin poistumisaste. On myös suositeltavaa laskea keskiarvon 95 prosentin luottamusväli. Laske samoin kontrolliastiassa olevan orgaanisen aineen keskimääräinen poistumisaste (D_B).

▼M4

Viite biologisesta hajoamisesta

51. Jos testikemikaali ei adsorboidu merkittävästi biokalvoon ja poistumakäyrän muoto vastaa tyypillistä biologisen hajoamisen käyrää, jossa näkyvät lag-, hajoamis- ja tasannevaihe (kohdat 48 ja 49), mitattua poistumaa voidaan pitää biologisesta hajoamisesta johtuvana. Jos poistuminen on aluksi runsasta, simulaatiotutkimuksella ei voida erottaa biologisia ja abioottisia eliminaatioprosesseja. Jos näin käy tai jos biologisesta hajoamisesta on muuten epävarmuutta (esim. haihtumista tapahtuu), analysoi adsorboituneet testikemikaalit kalvonäytteissä tai testaa biologista hajoavuutta tekemällä lisää tilastollisia (seulonta)testejä niiden parametrien perusteella, jotka viittaavat selvästi biologisiin prosesseihin. Tällaisia testejä ovat hapenkulutuksen menetelmät (tämän liitteen luku C.4, D, E ja F) (9) tai testi, joka mittaa CO_2-tuotantoa (tämän liitteen luku C.4-C tai kohta Headspace-menetelmä) (10). Käytä inokulaattina ennalta altistettua biokalvoa asianmukaisesta reaktorista.

52. Jos sekä DOC-poistuma että spesifisen kemikaalin poistuma on mitattu, poistumaprosenttien merkittävät erot (ensimmäinen on matalampi kuin jälkimmäinen) viittaavat siihen, että poistovesissä on orgaanisia välituotteita, jotka saattavat hajota heikosti. Niitä on tutkittava.

Testitulosten luotettavuus

53. Testi on luotettava, jos DOC-poistumisaste (tai COD-poistumisaste) (D_B) kontrolliyksiköissä on > 80 prosenttia kahden viikon kuluttua eikä epätavallisia havaintoja ole tehty.

54. Jos helposti biohajoavaa (vertailu)kemikaalia on testattu, biohajoamisen asteen pitäisi olla > 90 prosenttia, eikä kahden rinnakkaistuloksen ero saa olla yli 5 prosenttia. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, tarkista kokeelliset menetelmät ja/tai hanki kotitalousjätevettä toisesta lähteestä.

55. Samoin kahden testikemikaalia käsittelevän rinnakkaisyksikön (jos käytössä) biohajoamisarvojen ero ei saa olla yli 5 prosenttia. Jos tämä kriteeri ei täyty, mutta poistumisasteet ovat korkeita, jatka analyysiä vielä kolme viikkoa. Jos poistumisaste on matala, tutki testikemikaalin inhibitiovaikutuksia, jos ne eivät ole tiedossa, ja toista testi käyttämällä testikemikaalin alempaa pitoisuutta, jos se on mahdollista.

Testiraportti

56. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä.

Testiolosuhteet:

— mahdolliset testijärjestelmän muutokset varsinkin, jos testataan liukenemattomia tai haihtuvia aineita

— orgaanisen aineen tyyppi

— teollisuusjäteveden osuus jätevedestä ja sen ominaisuudet, jos käytössä ja tiedossa

— inokulaatiomenetelmä

▼M4

— testikemikaalin kantaliuos – DOC (liuennut orgaaninen hiili) ja TOC (orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus), valmistustapa, onko suspensio, käytetty testipitoisuus tai -pitoisuudet, syyt jos DOC ei ole alueella 10–20 mg/l, lisäystapa, ensimmäisen lisäyksen päivämäärä, mahdolliset pitoisuuden muutokset

— hydraulisen retentioajan keskiarvo (ilman kasvua), putken pyörimisnopeus, keskimääräinen kallistuskulma, jos mahdollista

— tiedot liuskoina irtoamisesta, aika ja voimakkuus

— testilämpötila ja -alue

— käytetyt analyyttiset tekniikat.

Testitulokset:

— kaikki mitatut tiedot, DOC, COD, ominaisanalyysit, pH, lämpötila, N-kemikaalit, mikäli aiheellista

— kaikki lasketut D_t- (tai D_{tc}-), D_B- ja D_S-arvot taulukoituina sekä poistumakäyrät

— lag- ja tasannevaiheiden tiedot, testin kesto, testikemikaalin tai vertailukemikaalin (jos testattu) ja kontrolliyksikön orgaanisen aineen poistumisaste sekä tilastotiedot ja lausumat biologisesta hajoavuudesta ja testin luotettavuudesta

— tulosten pohdinta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753–758.

2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441–444.

3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355–1357.

5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92–94.

6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865–881.

7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

9) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys, A–F.

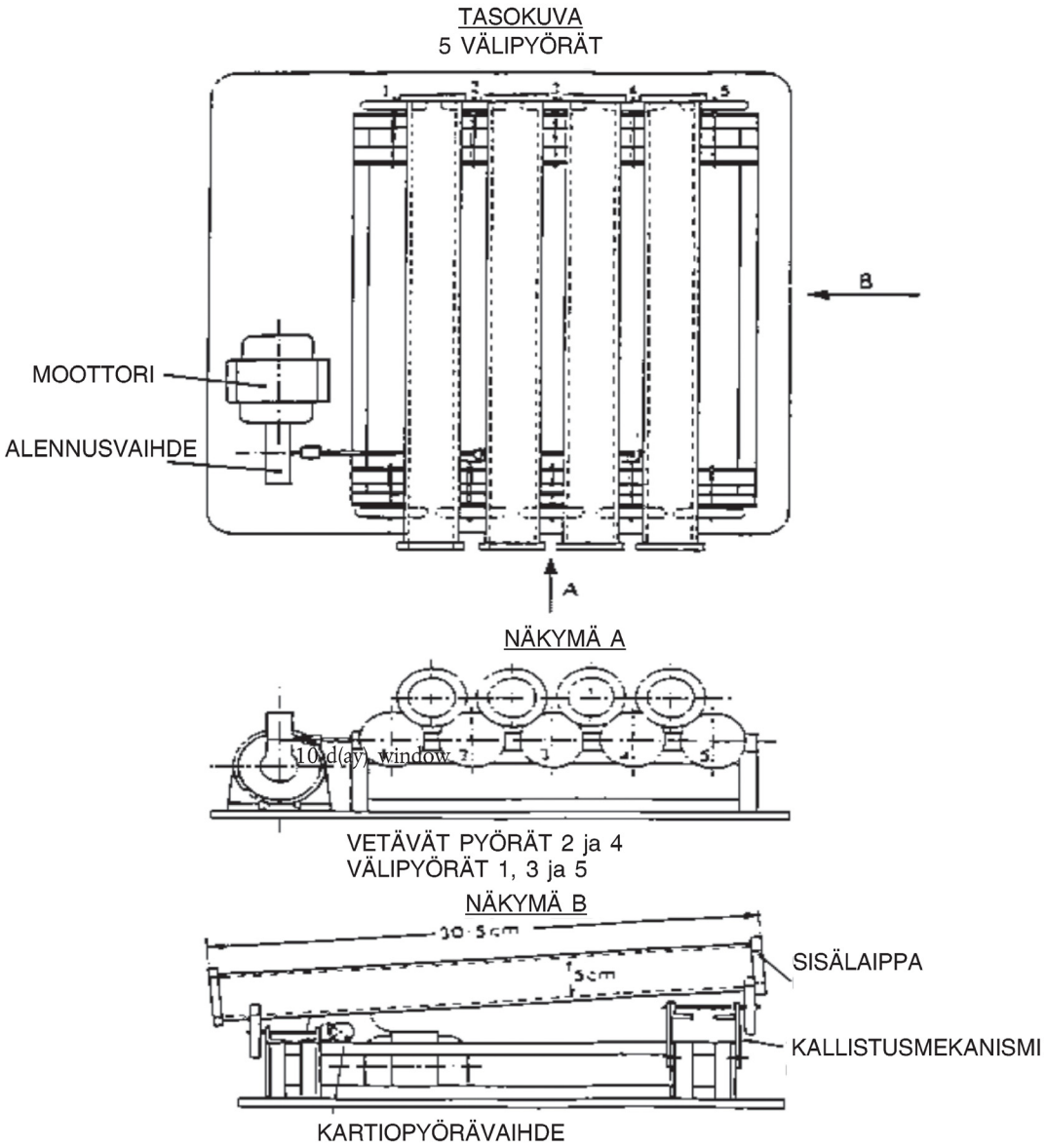
10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Lisäys 8

Kuva 1

Pyörivät putket



Sanasto:

tasokuva

näkymä A/B

vetävät pyörät

välipyörät

moottori

alennusvaihde

sisälaippa

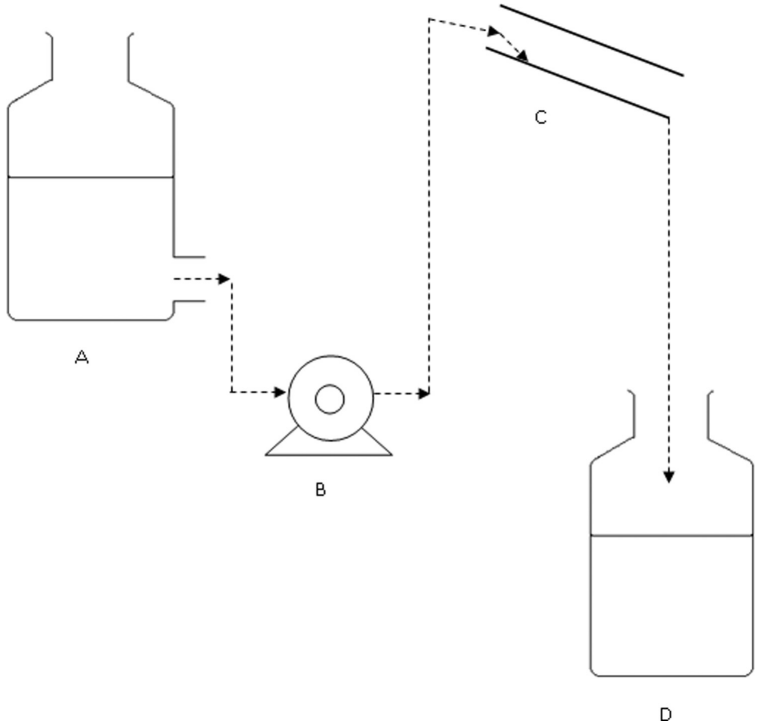
kallistusmekanismi

kartiopyörävaihde

▼**M4**

Kuva 2

Virtauskaavio



A: syöttöallas

B: peristalttinen pumppu

C: pyörivä putki

D: poistoveden keräysastia

MÄÄRITELMÄT:

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Kemikaalit: UNCED-sopimuksissa ja niihin liittyvissä asiakirjoissa termiä ”kemikaali” käytetään laajassa merkityksessä, joka kattaa kaikki aineet, tuotteet, seokset, valmisteet yms., joita olemassa olevissa järjestelmissä voidaan käyttää.

▼M6

C.11. AKTIIVILIETTEEN SOLUHENGITYKSEN INHIBITIOTESTI (HIILEN JA AMMONIUMIN HAPETTUMINEN)

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 209 (2010). Tässä testimenetelmässä kuvataan menetelmä, jolla voidaan määrittää kemikaalin vaikutukset aktiivilietteestä peräisin oleviin mikro-organismeihin (enimmäkseen bakteereihin) mittaamalla niiden soluhengitystasoa (hiilen ja/tai ammoniumin hapettumista) tietyissä olosuhteissa, joissa testikemikaalia on läsnä eri pitoisuuksina. Testimenetelmä perustuu ETAD:n (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry) testiin (1), (2), aikaisempaan OEC:n testiohjeeseen (TG) 209 sekä tarkistettuun ISO-standardiin 8192 (4). Testin on tarkoitus toimia nopeana seulontamenetelmänä, jolla voidaan arvioida kemikaalien vaikutusta jätevedenkäsittelylaitosten biologisen (aerobisen) vaiheen aktiivilietteessä oleviin mikro-organismeihin. Testin tuloksia voidaan käyttää myös osoittamaan testikemikaalien biologisiin hajoamiskokeisiin sopivat pitoisuudet, joilla ei ole inhibitiovaikutusta (esimerkiksi tämän liitteen C.4 A–F, C.9, C.10, C.12 ja C.29 luvut sekä OECD:n testiohje (TG) 302C). Tällöin testi voidaan tehdä pitoisuusalueen määritystestiä tai raja-annostestiä vastaavana seulontakokeena (ks. 39 kohta), jossa otetaan huomioon vain soluhengitys yleensä. Tietoa on kuitenkin sovellettava harkiten helpon biohajoavuuden testeihin (tämän liitteen C.4 A–F ja C.29 luvut), joissa inokulaattipitoisuus on merkittävästi tässä testimenetelmässä käytettyä pienempi. Inhibition puuttuminen tässä soluhengitystestissä ei siis ilman muuta tarkoita, että tämän liitteen C.4 A–F tai C.29 luvuissa kuvatun helpon biohajoavuuden testin olosuhteilla ei ole inhibitiovaikutusta.

2. Soluhengityksen inhibitiotestiä on yleensä sovellettu ilmeisen onnistuneesti julkistamisestaan saakka, mutta joissakin tapauksissa tulosten on ilmoitettu olleen virheellisiä. Pitoisuuksia koskevat soluhengityskäyrät ovat toisinaan olleet kaksifaasisia ja annosvastekuvaajat vääristyneitä sekä EC_{50}-arvot odottamattoman alhaisia (5). Tarkemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että tällaisia tuloksia on saatu tapauksissa, joissa testissä käytetty aktiiviliete nitrifioituu huomattavasti ja testikemikaalilla on suurempi vaikutus ammoniumin hapettumiseen kuin heterotrofiseen hapettumiseen yleensä. Virheelliset tulokset voidaan siis välttää lisätestillä, jossa käytetään spesifistä nitrifikaatioinhibiittoria. Kun hapenotto mitataan inhibiittoria (esimerkiksi N-allyylitioureaa (ATU)) käytettäessä ja ilman sitä, voidaan laskea erikseen kokonaishapenottotaso, heterotrofinen hapenotto sekä nitrifikaation hapenotto (4), (7), (8). Näin voidaan todeta testikemikaalin inhibitiovaikutus näihin kahteen prosessiin, ja sekä orgaanisen hiilen hapettumisen (heterotrofisen) että ammoniumin hapettumisen (nitrifikaation) EC_{50}-arvot voidaan laskea tavanomaiseen tapaan. On syytä huomata, että joissakin harvinaisissa tapauksissa N-allyylitiourean inhibitiovaikutus voi mitätöityä osittain tai kokonaan testikemikaalien tai ravinneliuoksen lisäaineiden (esimerkiksi Cu^{++}-ioneiden) kanssa tapahtuvan kompleksoinnin vuoksi (6). Cu^{++}-ionit ovat *Nitrosomonas*-bakteereille välttämättömiä, mutta suurempina pitoisuuksina myrkyllisiä.

3. Varsinkin Euroopan maissa on syntynyt selkeä tarve hyödyntää nitrifikaatiota jätevesien aerobisessa puhdistuksessa poistettaessa typpiyhdisteitä jätevesistä denitrifikoimalla ne kaasumaisiksi aineiksi, kun EU on määrännyt alhaisemmat rajat vesistöihin päästettävien käsiteltyjen jätevesien typpipitoisuudelle ([1]).

([1]) Neuvoston direktiivi 91/271/ETY, annettu 21 päivänä toukokuuta 1991, yhdyskuntajätevesien käsittelystä, EYVL L 135, 30.5.1991, s. 40.

▼M6

4. Useimmissa tapauksissa riittää pelkästään menetelmä, jolla arvioidaan vaikutusta orgaanisen hiilen hapettumisprosesseihin. Joissakin tapauksissa on kuitenkin tarkasteltava vaikutusta pelkästään nitrifikaatioon tai erikseen sekä nitrifikaatioon että orgaanisen hiilen hapettumiseen, jotta tulokset osataan tulkita ja vaikutuksia ymmärtää oikein.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

5. Standardiannoksella synteettistä jätevettä ravitun aktiivilietteen soluhengitystaso mitataan happielektrodin sisältävässä suljetussa kennossa kolmen tunnin kontaktiajan kuluttua. Jos realistinen altistusskenaario tätä edellyttää, tarvittava kontaktiaika voi olla pitempikin. Jos testikemikaali hajoaa nopeasti esimerkiksi abioottisesti hydrolyysin kautta tai on erittäin haihtuvaa, jolloin pitoisuutta ei saada pidettyä samana, voidaan lisäksi käyttää lyhyempää altistusaikaa, esimerkiksi 30 minuuttia. Kunkin aktiiviliete-erän herkkyys olisi tarkistettava soveltuvan vertailukemikaalin avulla altistuspäivänä. Testiä käytetään yleensä testikemikaalin EC_x:n (esimerkiksi EC_{50}:n) ja/tai NOEC-pitoisuuden (pitoisuuden, josta ei aiheudu vaikutuksia) määrittämiseen.

6. Orgaanista hiiltä hapettavien mikro-organismien hapenoton inhibitio voidaan ilmaista erillisenä ammoniumia hapettavien mikro-organismien hapenoton inhibitiosta mittaamalla hapenotto sekä N-allyylitioureaa käytettäessä että ilman sitä. N-allyylitiourea on spesifinen inhibiittori, jolla estetään ensimmäisen vaiheen nitrifioivia bakteereita hapettamasta ammoniumia nitriitiksi. Tässä tapauksessa hapenottotason prosentuaalinen inhibitio lasketaan vertaamalla hapenottoa testikemikaalin läsnä ollessa vastaavien, testikemikaalia sisältämättömien kontrollien keskimääräiseen hapenottoon sekä spesifistä inhibiittoria N-allyylitioureaa käytettäessä että ilman sitä.

7. Mahdollinen abioottisista prosesseista johtuva hapenotto voidaan todeta määrittämällä taso testikemikaalin, synteettisen jäteveden ja veden seoksissa, joista aktiiviliete on jätetty pois.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

8. Testikemikaalin tunnisteen (mieluiten CAS-numeron), nimen (IUPAC), puhtauden, vesiliukoisuuden, höyrynpaineen sekä haihtuvuus- ja adsorptio-ominaisuuksien on oltava tiedossa, jotta tulokset voidaan tulkita oikein. Haihtuvia kemikaaleja ei tavallisesti voi testata riittävällä tavalla ilman erityisiä varotoimia (katso kohta 21).

TESTIMENETELMÄN SOVELLETTAVUUS

9. Testimenetelmää voidaan käyttää vesiliukoisille, heikosti liukeneville ja haihtuville kemikaaleille. Aina ei kuitenkaan ole välttämättä mahdollista saada EC_{50}-arvoja kemikaaleista, joiden liukoisuus on rajallinen, ja haihtuvista kemikaaleista saadaan paikkansapitäviä tuloksia vain silloin, kun testikemikaalista suurin osa (esimerkiksi > 80 prosenttia) on edelleen reaktioseoksessa altistusajan tai -aikojen lopussa. EC_x-pitoisuus on määritettävä analyysiin perustuvien lisätietojen avulla, jos testikemikaalin stabiilisuutta tai haihtuvuutta ei tunneta tarkasti.

▼M6

VERTAILUKEMIKAALIT

10. Vertailukemikaalien säännöllisin väliajoin toistuvilla testeillä varmistetaan testimenetelmän ja testiolosuhteiden luotettavuus ja tarkistetaan kunkin mikrobi-inokulaattina käytetyn aktiiviliete-erän herkkyys altistuspäivänä. Inhiboivaksi vertailukemikaaliksi suositellaan 3,5-dikloorifenolia (3,5-DCP), sillä kyseessä on tunnettu hengitysinhibiittori, jota käytetään monenlaisissa inhibitio- ja myrkyllisyyskokeissa (4). Kokonaissoluhengityksen inhiboivana vertailukemikaalina voidaan käyttää myös kupari(II)sulfaatin pentahydraattia (9). Nitrifikaation spesifisenä vertailuinhibiittorina voidaan käyttää N-metyylianiliinia.

VALIDITEETTIVAATIMUKSET JA TOISTETTAVUUS

11. Nollanäytteissä (joissa ei ole testi- tai vertailukemikaalia) hapenoton on oltava tunnissa vähintään 20 mg happea yhtä aktiivilietegrammaa kohti (kiintoaineen kuivapaino). Jos taso on pienempi, testi on toistettava pestyllä aktiivilietteellä tai toisesta lähteestä saadulla lietteellä. Kontrollirinnakkaisnäytteissä hapenoton variaatiokertoimen on oltava varsinaisen testin lopussa enintään 30 prosenttia.

12. ISO:n vuonna 2004 järjestämässä kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (4), jossa käytettiin kotitalousjätevedestä saatua aktiivilietettä, 3,5-DCP:n EC_{50}:n todettiin olevan kokonaissoluhengityksessä 2–25 mg/l, heterotrofisessa soluhengityksessä 5–40 mg/l ja nitrifikaatiosoluhengityksessä 0,1–10 mg/l. Jos 3,5-DCP:n EC_{50} ei ole odotetulla vaihteluvälillä, testi on toistettava käyttäen toisesta lähteestä saatua aktiivilietettä. Kupari(II)sulfaatin pentahydraatin EC_{50}:n olisi oltava kokonaissoluhengityksessä 53–155 mg/l (9).

TESTIMENETELMÄN KUVAUS

Koeastiat ja -välineet

13. Testissä tarvitaan tavallinen laboratoriolaitteisto ja seuraavat välineet:

a) Koeastioita; esimerkiksi 1 000 ml:n dekantterilaseja, joihin tulee 500 ml reaktioseosta (ks. kuvan 1 kohta 5).

b) Kenno ja tarvikkeet liuenneen hapen pitoisuuden mittaamista varten; sopiva happielektrodi; suljettu kenno, johon näyte sijoitetaan niin, että avointa tilaa ei jää, sekä piirturi (esimerkiksi lisäyksen 2 kuvan 1 kohdat 7, 8, 9); vaihtoehtoisesti voidaan käyttää BOD-pulloa, jossa on sopiva sovitinholkki, jolla happielektrodi voidaan kiinnittää pullon kaulaa vasten (ks. lisäyksen 3 kuva 2). Suositeltavinta on laittaa holkin läpi ensin suppilo tai lasiputki tai käyttää astioita, joiden reunat levenevät ulospäin, jotta nestettä ei joudu hukkaan happielektrodin kiinnittämisen yhteydessä. Molemmissa tapauksissa on käytettävä magneettisekoitinta tai jotain muuta sekoitusmenetelmää, esimerkiksi automaattista sekoitinpuikkoa;

c) Inertillä materiaalilla päällystettyjä magneettisekoittimia ja magneettisauvoja, joita käytetään mittauskammiossa ja/tai koeastioissa;

d) Ilmastuslaite: paineilmaa puhalletaan tarvittaessa sopivan suodattimen läpi pölyn ja öljyn poistamiseksi sekä vettä sisältävien pesupullojen läpi ilman kosteuttamiseksi. Astioiden sisältöä ilmastetaan Pasteur-pipeteillä tai

▼M6

muilla kemikaaleja adsorboimattomilla ilmastuslaitteilla. Orbitaaliliikettä tekevää ravistinta, jonka kierrosnopeus esimerkiksi 2 000 ml:n pulloille on 150–250 rpm, käyttämällä voidaan huolehtia lietteen hapenkulutuksesta sekä käyttää ongelmitta myös kemikaaleja, jotka vaahtoavat runsaasti, katoavat helposti haihtuvuutensa takia tai ovat vaikeasti dispergoitavissa, jos ilmastamisessa käytetään ilmahuuhtelua. Testijärjestelmä koostuu yleensä dekanttereista, joita ilmastetaan jatkuvasti ja joiden liike pysäytetään yksi toisensa jälkeen (esimerkiksi noin 10–15 minuutin välein), minkä jälkeen niiden sisältö analysoidaan yksi kerrallaan. Mahdollista on myös käyttää validoituja instrumentteja, joiden avulla seoksia voidaan samanaikaisesti ilmastaa ja niiden hapenkulutusta mitata;

e) ph-mittari;

f) sentrifugi: tavanomainen lietteelle tarkoitettu pöytäsentrifugi, kiihtyvyys 10 000 m/s_2.

Reagenssit

14. Koko testin ajan käytetään analyysilaatuisia reagensseja.

Vesi

15. Käytetään tislattua tai deionisoitua vettä, jonka DOC-pitoisuus on alle 1 mg/l, ellei testissä erityisesti vaadita klooritonta talousvettä.

Synteettinen jätevesiravinne

16. Väliaine on valmisteltava siten, että se sisältää seuraavia ainesosia mainitun määrän verran:

— peptonia	16 g
— lihauutetta (tai vastaavaa kasvisuutetta)	11 g
— ureaa	3 g
— natriumkloridia (NaCl)	0,7 g
— kalsiumkloridihydraattia ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— magnesiumsulfaattiheptahydraattia ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— vedetöntä dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4)	2,8 g
— tislattua tai deionisoitua vettä lisätään, kunnes liuosta on yhteensä 1 litra.	

17. Liuoksen pH-arvon on oltava 7,5 ±0,5. Ellei ravintoainetta käytetä välittömästi valmistuksen jälkeen, sitä säilytetään enintään viikon ajan pimeässä 0–4 °C:n lämpötilassa tai olosuhteissa, joissa aineen koostumus ei muutu säilytyksen aikana. On syytä huomata, että synteettinen jätevesi on 100-kertainen tiiviste OECD:n teknisessä raportissa ”Proposed method for the determination of the biodegrability of surfactants used in synthetic detergents” (11. kesäkuuta 1976) esitetystä jätevedestä, paitsi että se sisältää myös dikaliumvetyfosfaattia.

▼M6

18. Ravinneliuoksen ainesosat voidaan vaihtoehtoisesti steriloida yksitellen ennen säilytystä, tai peptoni ja lihauute voidaan lisätä juuri ennen testiä. Ennen käyttöä ravinneliuos on sekoitettava kauttaaltaan ja pH-arvoa on tarvittaessa säädettävä siten, että se on 7,5 ±0,5.

Testikemikaali

19. Veteen helposti liukeneville testiaineille kantaliuosta valmistetaan enintään suurinta veteen liukenevuutta vastaava määrä (saostumia ei saa olla). Heikosti veteen liukenevat aineet, seokset, joiden ainesosat liukenevat veteen eri tavoin, ja adsorptiiviset aineet on punnittava suoraan testiastioihin. Näissä tapauksissa vaihtoehtona voi olla kantaliuosten käyttäminen, jos testikemikaalien liuenneet pitoisuudet määritetään analyyttisesti testiastioissa (ennen aktiivilietteen lisäämistä). Veteen liuenneita fraktioita (Water Accommodated Fractions) käytettäessä on myös määritettävä analyyttisesti testikemikaalien liuenneet pitoisuudet testiastioissa. Orgaanisia liuottimia käytettäessä on vältettävä liukoisuuden lisäämistä dispergointiaineiden/emulgaattoreiden avulla. Kantaliuosten sonikaatiota ja suspensioiden esisekoittamista esimerkiksi yön yli voidaan käyttää, jos testikemikaalin stabiiliudesta näissä olosuhteissa on riittävästi tietoa.

20. Testikemikaali voi vaikuttaa haitallisesti pH-arvoon testijärjestelmässä. Testikemikaalilla käsiteltyjen seosten pH-arvo määritetään ennen testiä esikokeella, jonka avulla todetaan, onko pH-arvon säätäminen tarpeen ennen varsinaista testiä ja uudelleen varsinaisena testipäivänä. Veteen liuennut tai suspendoitunut testikemikaali on tarvittaessa neutraloitava ennen inokulaatin lisäämistä. Neutralointi voi kuitenkin muuttaa kemikaalin kemiallisia ominaisuuksia, minkä vuoksi lisätesteillä voidaan tutkimuksen tavoitteiden mukaan arvioida testikemikaalin vaikutusta lietteeseen ilman pH:n säätämistä.

21. Haihtuvien kemikaalien myrkyllisten vaikutusten johdosta etenkin testeissä, joissa ilmakuplia puhalletaan järjestelmän läpi, vaikutukset voivat vaihdella, koska ainetta häviää altistusjakson aikana. Näiden aineiden käsittelyssä on noudatettava huolellisuutta tekemällä ainetta sisältäville kontrolliseoksille ainekohtainen analyysi sekä muuttamalla ilmastusaikataulua.

Vertailukemikaali

22. Jos vertailukemikaalina käytetään 3,5-dikloorifenolia, valmistetaan liuos, jossa 1,00 g 3,5-dikloorifenolia sekoitetaan 1 000 ml:aan vettä (15). Liukenemista nopeutetaan käyttämällä lämmintä vettä ja/tai sonikaatiota, ja kun liuos on jäähtynyt huoneenlämpöiseksi, haihtunut vesi korvataan uudella. On syytä kuitenkin varmistaa, että vertailukemikaalin rakenne ei muutu. Liuoksen pH tarkistetaan ja sitä säädetään tarvittaessa NaOH:lla tai H_2SO_4:lla siten, että pH-arvo on 7–8.

23. Jos vertailukemikaalina käytetään kupari(II)sulfaattipentahydraattia, käytettävät pitoisuudet ovat 58 mg/l, 100 mg/l ja 180 mg/l (kerroin 1,8). Aine punnitaan suoraan testiastioihin (29, 50 ja 90 mg, jolloin kokonaistilavuudeksi saadaan 500 ml). Tämän jälkeen aine liuotetaan 234 ml:aan autoklaavissa käsiteltyä talousvettä. Kupari(II)sulfaattipentahydraatti on helposti liukenevaa. Kun testi aloitetaan, lisätään 16 ml synteettistä jätevettä sekä 250 ml aktiivilietettä.

▼M6

Nitrifikaation spesifinen inhibiittori

24. Valmistetaan kantaliuos, jonka N-allyylitioureapitoisuus (ATU) on 2,32 g/l. Kun tätä kantaliuosta lisätään 2,5 ml inkubaatioseokseen, jonka lopullinen tilavuus on 500 ml, saadaan lopulliseksi pitoisuudeksi 11,6 mg ATU/l (10^{-4}mol/l). Tiedossa on, että tämä riittää inhiboimaan nitrifikaation 100-prosenttisesti nitrifioivassa aktiivilietteessä, joka sisältää kiintoainetta 1,5 g/l.

Abioottinen kontrolli

25. Eräissä harvoin esiintyvissä olosuhteissa testikemikaali, jolla on voimakkaasti pelkistäviä ominaisuuksia, saattaa aiheuttaa mitattavissa olevaa abioottista hapenkulutusta. Tällöin on välttämätöntä erottaa toisistaan testikemikaalin abioottinen hapen yhteytys ja mikrobien soluhengitys. Abioottiset kontrollit voidaan valmistaa jättämällä inokulaatti pois testiseoksista. Inokulaattia sisältämättömät abioottiset kontrollit voidaan myös ottaa mukaan tehtäessä analyyttisiä mittauksia, joilla määritetään testin altistusvaiheen aikana saavutettu pitoisuus esimerkiksi silloin, kun käytetään heikosti veteen liukenevia kemikaaleja sisältäviä kantaliuoksia, joiden ainesosat liukenevat veteen eri tavoin. Erityistapauksissa voi olla tarpeen valmistaa abioottinen kontrolli, jossa inokulaatti on steriloitu (esimerkiksi autoklaavia käyttämällä tai lisäämällä steriloivia myrkyllisiä aineita). Eräät kemikaalit saattavat tuottaa tai kuluttaa happea silloinkin, jos pinta-ala on reaktiolle riittävän suuri, vaikka reaktio normaalisti edellyttäisi huomattavasti korkeampaa lämpötilaa tai painetta. Tässä suhteessa on kiinnitettävä erityistä huomiota peroksiaineisiin. Steriloidun inokulaatin pinta-ala on suuri.

Inokulaatti

26. Yleiseen käyttöön tarkoitettu aktiiviliete kerätään pääasiassa kotitalousjätettä käsittelevän, hyvin hoidetun jätevedenkäsittelylaitoksen ilmastussäiliön poistoaukosta tai sen läheltä. Testin tarkoituksen mukaan voidaan käyttää myös muunlaisia sopivia aktiivilietelähteitä tai -tyyppejä, esimerkiksi laboratoriossa kasvatettua lietettä, jonka kiintoainepitoisuus on 2–4 g/l. Eri käsittelylaitoksista peräisin olevien lietteiden ominaisuudet ja herkkyydet kuitenkin todennäköisesti poikkeavat toisistaan.

27. Lietettä voidaan käyttää sellaisena kuin se on kerätty, mutta karkeat hiukkaset poistetaan antamalla lietteen laskeutua lyhyen aikaa, esimerkiksi 5–15 minuuttia, ja dekantoimalla hienojakoisempia kiintoaineita sisältävä ylin kerros tai siivilöimällä liete (esimerkiksi siivilällä, jonka silmäkoko on 1 mm^2). Vaihtoehtoisesti liete voidaan homogenoida sekoittamalla sitä tehosekoittimessa vähintään 15 sekunnin ajan, mutta tällöin on syytä ottaa huomioon leikkuuvoimat ja lämpötilan muutos, jonka pitkäaikainen sekoittaminen saattaa aiheuttaa.

28. Liete on usein pestävä esimerkiksi silloin, jos endogeeninen soluhengitystaso on alhainen. Lietettä olisi ensin sentrifugoitava jonkin aikaa (esimerkiksi 10 minuuttia nopeudella 10 000 m/s^2), jotta saadaan aikaan kirkas kelluva neste ja kiintoaineesta muodostuva kakku. Kelluva neste heitetään pois ja liete suspendoidaan uudelleen kloorittomaan talousveteen ravistelemalla astiaa, minkä jälkeen pesuvesi poistetaan sentrifugoimalla uudelleen ja heittämällä kelluva neste jälleen pois. Pesu- ja sentrifugointiprosessi toistetaan tarvittaessa. Tilavuudeltaan tunnetun uudelleen suspendoituneen lietteen kuivapaino määritetään, minkä jälkeen liete konsentroidaan poistamalla siitä lientä tai sitä laimennetaan edelleen kloorittomalla talousvedellä, jotta lietteen kiintoainepitoisuudeksi saadaan vaadittu 3 g/l. Aktiivilietteeseen on syötettävä jatkuvasti ilmaa (esimerkiksi 2 l minuutissa) testilämpötilassa, ja se on mahdollisuuksien mukaan käytettävä keräämispäivänä. Jos tämä

▼M6

ei ole mahdollista, lietteeseen on syötettävä päivittäin synteettistä jätevesiravinnetta (50 ml synteettistä jätevesiravinnetta yhteen litraan aktiivilietettä) vielä kahden päivän ajan. Tämän jälkeen lietettä käytetään testiin, ja testin tulokset katsotaan paikkansapitäviksi, jos lietteen aktiivisuudessa ei endogeenisen heterotrofisen soluhengitystason ja nitrifikaatiosoluhengitystason perusteella arvioituna ole tapahtunut merkittävää muutosta.

29. Vaikeuksia voi ilmetä, jos inkubaation aikana muodostuu niin runsaasti vaahtoa, että vaahto ja sen mukana lietteen kiintoaineet tulevat ulos ilmastusastioista. Vaahtoaminen voi toisinaan johtua pelkästään synteettisen jäteveden olemassaolosta, mutta sitä on odotettavissa, jos testikemikaali on pinta-aktiivinen aine tai sisältää sellaista. Lietteen kiintoaineiden poistuminen testiseoksista johtaa keinotekoisesti alentuneisiin soluhengitystasoihin, jotka saatetaan virheellisesti tulkita inhibitiosta johtuviksi. Pinta-aktiivista ainetta sisältävän liuoksen ilmastaminen saa lisäksi pinta-aktiivisen aineen kerääntymään vaahtokerrokseen, jolloin vaahdon poistuminen testijärjestelmästä alentaa altistuspitoisuuksia. Vaahtoamista voidaan hallita yksinkertaisilla mekaanisilla menetelmillä (esimerkiksi satunnaisesti lasisauvalla sekoittamalla), lisäämällä pinta-aktiivista ainetta sisältämätöntä silikoniemulsioon perustuvaa vaahdonestoainetta ja/tai käyttämällä ilmastuksessa ravistuspullomenetelmää. Jos ongelma johtuu synteettisen jäteveden olemassaolosta, jäteveden koostumusta muutetaan lisäämällä vaahdonestoreagenssia esimerkiksi 50 µl/l. Jos vaahtoaminen johtuu testikemikaalista, vaahdonestoon tarvittava määrä todetaan maksimitestipitoisuudessa, minkä jälkeen jokainen ilmastusastia käsitellään samalla tavoin (myös ne, joissa vaahtoa ei muodostu, esimerkiksi nollanäytteet ja vertailuastiat). Vaahdonestoaineita käytettäessä vältetään interaktio inokulaatin ja/tai testikemikaalin kanssa.

TESTIMENETTELY

30. Hapenoton inhibointi voidaan määrittää kolmella eri tavalla: kokonaisinhibointi, pelkkä heterotrofinen inhibointi sekä nitrifikaatiosta johtuva inhibointi. Yleensä riittää pelkkä kokonaishapenoton inhiboinnin mittaaminen. Orgaanisen hiilen hapettumisesta johtuvaa vaikutusta heterotrofiseen hapenottoon sekä ammoniumin hapettumisen vaikutusta tarvitaan, kun tietylle kemikaalille tarvitaan jostain erityisestä syystä molemmat erilliset loppupisteet tai kun halutaan (tarvittaessa) selittää kokonaishapenoton inhiboinnista muodostuvia epätyypillisiä annosvastekäyriä.

Testiolosuhteet

31. Testi tehdään lämpötilassa, jonka vaihteluväli on 20 ± 2 °C.

Testiseokset

32. Vettä, synteettistä jätevesiravinnetta sekä testikemikaalia sisältävät testiseokset (taulukon 1 F_T) valmistetaan siten, että testikemikaalin nimellispitoisuudet niissä poikkeavat toisistaan (ainesosien esimerkkitilavuuksista ks. taulukko 1). pH-arvoa säädetään tarvittaessa siten, että se on 7,5 ± 0,5. Seoksia laimennetaan vedellä ja inokulaattia lisätään siten, että kaikkien astioiden lopulliset tilavuudet ovat samat ja ilmastaminen voidaan aloittaa.

Vertailuseokset

33. Seokset (F_R) valmistetaan samalla tavoin kuin testiseokset, mutta testikemikaali korvataan vertailukemikaalilla, kuten 3,5-dikloorifenolilla.

▼M6

Nollanäytteet

34. Nollanäytteet (F_B) valmistetaan altistusjakson alussa ja lopussa testeissä, joissa testidekanttereita valmistetaan yksi kerrallaan säännöllisin väliajoin. Testeissä, joissa käytettävien laitteiden avulla hapenkulutusta koskevat mittaukset voidaan tehdä samanaikaisesti, jokaisessa samanaikaisesti analysoitavassa erässä on oltava ainakin kaksi nollanäytettä. Nollanäytteissä on yhtä paljon aktiivilietettä sekä synteettistä ravinneliuosta, mutta ei testi- tai vertailukemikaalia. Nollanäytteet laimennetaan vedellä samaan tilavuuteen kuin testi- ja vertailuseokset.

Abioottinen kontrolli

35. Tapauksissa, joissa testikemikaalilla esimerkiksi tiedetään tai epäillään olevan voimakkaasti pelkistäviä ominaisuuksia, on tarvittaessa valmistettava seos F^A abioottisen hapenkulutuksen mittaamista varten. Seoksessa on oltava samat määrät testikemikaalia ja synteettistä jätevesiravinnetta ja sen tilavuuden on oltava sama kuin testiseosten, mutta aktiiviliete puuttuu.

Yleinen menetelmä ja mittaukset

36. Testiseokset, vertailuseokset sekä nollanäytteet ja abioottiset kontrollit inkuboidaan testilämpötilassa koneellisesti ilmastaen (0,5–1 l/min), jotta liuenneen hapen kyllästymispitoisuus on jatkuvasti yli 60–70 prosenttia ja lietehiutaleet pysyvät suspendoituneina. Viljelmiä on myös sekoitettava, jotta lietehiutaleet pysyvät suspendoituneina. Inkubaation katsotaan alkavan, kun aktiivilieteinokulaatti joutuu ensimmäistä kertaa kosketuksiin lopullisen seoksen muiden ainesosien kanssa. Inkubaation lopussa määritellyn altistusajan (yleensä kolme tuntia) jälkeen näytteet kerätään pois ja liuenneen hapen pitoisuuden lasku mitataan tätä varten tarkoitetussa kennossa (lisäyksen 3 kuva 2) tai kokonaan täytetyssä BOD-pullossa. Inkubaation alkamistapa riippuu myös hapenkulutuksen mittaamiseen tarkoitetun laitteiston kapasiteetista. Jos laitteistoon kuuluu esimerkiksi vain yksi happianturi, mittaukset tehdään yksitellen. Tällöin synteettisessä jätevedessä tehtävää testiä varten tarvittavat seokset valmistetaan, mutta inokulaattia ei käytetä, ja lietteen tarvittavat osat lisätään kuhunkin sarjaan kuuluvaan astiaan. Inkubaatiot aloitetaan yksi kerrallaan sopivin väliajoin, esimerkiksi 10–15 minuutin välein. Vaihtoehtoisesti mittausjärjestelmään voi kuulua useita antureita, jolloin useita mittauksia voidaan tehdä samanaikaisesti. Tässä tapauksessa inokulaattia voidaan lisätä yhtä aikaa sopiviin astiaryhmiin.

37. Nimellinen aktiivilietepitoisuus kaikissa testi- ja vertailuseoksissa sekä nollanäytteissä (muttei abioottisissa kontrolleissa) on 1,5 g kiintoainetta litrassa. Hapenkulutus mitataan kolmen tunnin altistusajan päätteeksi. Tarvittaessa 5 kohdassa kuvatuissa tapauksissa tehdään vielä lisää altistusmittauksia 30 minuutin välein.

Lietteen nitrifikaatiopotentiaali

38. Lietteen mahdollisen nitrifikaation ja nitrifikaatiotason selville saamiseksi valmistetaan seokset (F^B) samaan tapaan kuin nollanäytteet ja lisäkontrolliseokset (FN), mutta näissä seoksissa on myös N-allyylitioureaa 11,6 mg

▼M6

litrassa. Seoksia ilmastetaan ja inkuboidaan lämpötilassa 20° ± 2 °C kolmen tunnin ajan. Tämän jälkeen mitataan hapenottotaso ja lasketaan nitrifikaatiosta johtuva hapenotto.

Testijärjestelyt

Raja-annostesti

39. Alustavalla testillä voidaan tarvittaessa arvioida, millä testikemikaalin pitoisuuksien vaihteluvälillä voidaan lopullisessa testissä määrittää hapenkulutuksen estyminen. Jos testikemikaali ei toisaalta estä hapenkulutusta alustavassa testissä, tämä voi osoittaa, että lopullista testiä ei tarvita. Tähän tarvitaan kuitenkin kolme testiä korkeimmalla alustavassa testissä käytetyllä pitoisuudella (yleensä 1 000 mg/l, kuitenkin tarvittavan tiedon määrän mukaan).

Taulukko 1

Esimerkkejä alustavassa testissä käytettävistä seoksista

Reagenssi	Lähtöpitoisuus				
Testikemikaalin kantaliuos	10 g/l				
Synteettisen ravinneliuoksen kantaliuos	Katso edellä kohta 16.				
Aktiivilietteen kantasuspensio	Kiintoainetta 3 g/l				
Seosten ainesosat	Annostelu testiastioihin [a]				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Testikemikaalin kantaliuos (ml) (19–21 kohdat)	0,5	5	50	0	50
Synteettisen jätevesiravinteen kantaliuos (ml) (16 kohta)	16	16	16	16	16
Aktiivilietesuspensio (ml) (26–29 kohdat)	250	250	250	250	0
Vesi (15 kohta)	233,5	229	184	234	434
Seosten kokonaismäärä (ml)	500	500	500	500	500
Pitoisuudet seoksessa					
Testisuspensio (mg/l) Aktiiviliete	10	10	1 000	0	1 000
(kiintoaineita) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

[a] Samaa menettelyä käytetään myös vertailukemikaalille pulloissa $F_{R1–3}$

40. Testiä tehtäessä käytetään testikemikaalia vähintään kolmena eri pitoisuutena (esimerkiksi 10 mg/l, 100 mg/l ja 1 000 mg/l) sekä nollanäytettä ja tarvittaessa lisäksi vähintään kolmea abioottista kontrollia, joissa testikemikaalia

▼M6

on suurin mahdollinen pitoisuus (esimerkkinä ks. taulukko 1). Ihannetapauksessa pienimmällä pitoisuudella ei ole vaikutusta hapenkulutukseen. Hapenottotasot sekä tarvittaessa nitrifikaatiotaso lasketaan ensin, minkä jälkeen lasketaan hapenoton prosentuaalinen estyminen. Testin tarkoituksen mukaan on mahdollista myös määrittää pelkkä rajapitoisuuden myrkyllisyys, esimerkiksi 1 000 mg/l. Jos tilastollisesti merkittävää myrkyllistä vaikutusta ei esiinny tässä pitoisuudessa, lisätestejä suuremmilla tai pienemmillä pitoisuuksilla ei tarvita. On syytä huomata, että heikosti veteen liukenevat aineet, seokset, joiden ainesosat liukenevat veteen eri tavoin sekä adsorptiiviset aineet on punnittava suoraan testiastioihin. Tässä tapauksessa testiaineen kantaliuokselle varattu tilavuus korvataan laimennusvedellä.

Varsinainen testi

Kokonaishapenoton estyminen

41. Testissä käytetään alustavan testin perusteella määriteltyjä pitoisuuksia. Useimmissa tapauksissa suositellaan kuutta kontrollia ja viittä geometrisen sarjan muodostavaa käsittelypitoisuutta sekä viittä rinnakkaisnäytettä, jotta saadaan sekä NOEC että EC_x (esimerkiksi EC_{50}). Abioottista kontrollia ei ole tarpeen toistaa, jos alustavassa testissä ei tapahtunut hapenottoa. Jos hapenotto on huomattavaa, jokaista testikemikaalin pitoisuutta varten tarvitaan abioottiset kontrollit. Lietteen herkkyys tarkistetaan vertailukemikaalia (3,5-dikloorifenoli) käyttämällä. Lietteen herkkyys on tarkistettava erikseen jokaiselle testisarjalle, sillä herkkyyden tiedetään vaihtelevan. Kaikissa tapauksissa näytteet poistetaan testiastioista kolmen tunnin tai tarvittaessa 30 minuutin lisäajan kuluttua hapenottotason mittaamiseksi happielektrodikennossa. Kerätystä tiedosta lasketaan kontrollille ja testiseoksille ominaiset soluhengitystasot, minkä jälkeen prosentuaalinen inhibitio lasketaan alla olevasta yhtälöstä 7.

Heterotrofisen soluhengityksen ja nitrifikaation erottaminen

42. Nitrifikaation spesifistä inhibiittoria (ATU) käyttämällä voidaan arvioida suoraan testikemikaalien inhibitiovaikutusta heterotrofiseen hapettumiseen. Vaikutus nitrifikaatioon voidaan laskea vähentämällä ATUa käytettäessä saatu hapenotto kokonaishapenotosta (ilman ATUa). Kaksi reaktioseossarjaa valmistetaan 41 kohdassa kuvatun EC_x- tai NOEC-testijärjestelyjen mukaisesti, mutta lisäksi toisen sarjan jokaiseen seokseen lisätään ATUa lopullisena pitoisuutena 11,6 mg/l. Tämän pitoisuuden on osoitettu inhiboivan nitrifikaation täydellisesti lietteessä, jonka kiintoainepitoisuus on enintään 3 000 mg/l (4). Hapenotto mitataan altistusjakson jälkeen; nämä suorat arvot edustavat pelkkää heterotrofista soluhengitystä, ja näiden arvojen sekä vastaavien kokonaissoluhengitystä ilmaisevien arvojen erotus ilmaisee nitrifikaatiota. Tämän jälkeen lasketaan eri inhibitioasteet.

Mittaukset

43. Altistusjakson tai -jaksojen jälkeen siirretään näyte ensimmäisestä ilmastusastiasta happielektrodikennoon (lisäyksen 2 kuva 1) ja liuenneen hapen pitoisuus mitataan välittömästi. Useita elektrodeja sisältävää järjestelmää käytettäessä mittaukset voidaan tehdä samanaikaisesti. Sekoittaminen (päällystetyllä magneetilla) samalla nopeudella, jolla elektrodi on kalibroitu, on välttämätöntä, jotta anturi varmasti reagoi mahdollisimman nopeasti muuttuviin happipitoisuuksiin ja mittausastiasta voidaan tehdä säännöllisiä ja toistettavissa olevia happimittauksia. Eräissä happielektrodeissa käytettävä automaattinen sekoitinpuikko on useimmiten riittävä. Kenno huuhdellaan

▼M6

vedellä mittausten välillä. Näytteellä voidaan vaihtoehtoisesti täyttää magneettisekoittimella varustettu BOD-pullo (lisäyksen 3 kuva 2). Tämän jälkeen pullon kaulasta laitetaan sisään happianturi, jossa on sovitinholkki, ja magneettisekoitin käynnistetään. Molemmissa tapauksissa liuenneen hapen pitoisuutta on mitattava jatkuvasti ja kirjattava muistiin tietyn aikaa, tavallisesti 5–10 minuutin ajan tai siihen saakka, että happipitoisuus on alle 2 mg/l. Elektrodi poistetaan, seos kaadetaan takaisin ilmastusastiaan ja ilmastusta ja sekoittamista jatketaan, jos mittauksia on tarpeen tehdä pitemmän altistusajan jälkeen.

Testikemikaalin pitoisuuden toteaminen

44. Toisinaan saattaa olla tarpeen mitata testikemikaalin pitoisuus testiastioissa. On syytä huomata, että jos käytettävänä kantaliuoksena on

— heikosti veteen liukenevaa ainetta,

— seosta, jonka ainesosat liukenevat veteen eri tavoin, tai

— aineita, jotka liukenevat veteen hyvin, mutta pitoisuus kantaliuoksessa on lähellä vesiliukoisuuden maksimimäärää,

liuennut osa on tuntematon, ja testiastioihin siirrettävän testikemikaalin todellista pitoisuutta ei tunneta. Altistuksen kuvaamiseksi on tehtävä analyyttinen estimaatti testikemikaalin pitoisuuksista testiastioissa. Yksinkertaisuuden vuoksi analyyttinen estimaatti on syytä tehdä ennen inokulaatin lisäämistä. Koska testiastioihin siirtyvät vain liuenneet osat, mitatut pitoisuudet saattavat olla hyvin alhaisia.

45. Aikaa vievien ja kalliiden analyysien välttämiseksi suositellaan, että testikemikaali yksinkertaisesti punnitaan suoraan testiastioihin ja alkuperäistä punnittua nimellispitoisuutta käytetään myöhemmissä laskelmissa. Testikemikaalin liuenneen, liukenemattoman tai adsorboituneen osan erottaminen ei ole tarpeen, sillä kaikki osat ilmenevät samoin myös jätevesien käsittelylaitokseen todellisissa käyttöolosuhteissa, ja osissa voi olla vaihtelua jäteveden koostumuksen mukaan. Testimenetelmän tarkoituksena on tehdä realistinen estimaatti pitoisuudesta, jossa inhibitiota ei tapahdu, eikä sillä voida tutkia yksityiskohtaisesti, mitkä osat vaikuttavat aktiivilietteen organismien inhibitioon. Lopuksi mainittakoon, että myös adsorptiiviset aineet on punnittava suoraan testiastioihin ja astiat on silanoitava, jotta ainetta menetetään adsorption vuoksi mahdollisimman vähän.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Hapenottotasojen laskeminen

46. Hapenotto lasketaan mitattujen arvojen keskiarvosta, esimerkiksi happipitoisuutta ajan funktiona esittävän kuvaajan lineaarisesta osasta siten, että laskelmia tehdään vain happipitoisuuksista 2,0–7,0 mg/l, sillä suuremmat ja pienemmät pitoisuudet saattavat itsessään vaikuttaa kulutukseen. Nämä pitoisuudet ylittävien arvojen käyttämistä ei aina voi välttää, ja se voi olla tarpeen esimerkiksi silloin, kun soluhengitys on voimakkaasti estynyt

▼**M6**

ja tapahtuu erittäin hitaasti, tai jos soluhengitys jossakin tietyssä aktiivilietteessä on erityisen nopeaa. Tämä on hyväksyttävää, kunhan hapenottoa esittävässä kuvaajassa on pitkiä suoria osuuksia, eivätkä niiden gradientit muutu ylitettäessä raja-arvoja 2,0 mg/l tai 7,0 mg/l O_2. Jos kuvaajassa on mutkia, tämä tarkoittaa, että mittausjärjestelmä on stabiloitumassa tai hapenotto muuttumassa, eikä näitä kohtia käytetä soluhengitystason laskemisessa. Hapenotto ilmaistaan milligrammoina litrassa tuntia kohti (mg/lh) tai milligrammoina yhtä kuivalietegrammaa kohti tunnissa (mg/gh). Hapenkulutus R (mg/lh) voidaan laskea tai interpoloida havaittua happipitoisuuden laskua esittävän kuvaajan lineaarisesta osasta käyttämällä yhtälöä 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

jossa

Q_1 on happipitoisuus lineaarisen osan valitun kohdan alussa (mg/l);

Q_2 on happipitoisuus lineaarisen osan valitun kohdan lopussa (mg/l);

Δ_t on näiden kahden mittauksen välillä kulunut aika (min).

47. Ominaissoluhengitystaso (R_s) ilmaistaan lietteen yhtä kuivapainogrammaa kohti kulutetun hapen määränä tunnissa (mg/gh) käyttämällä yhtälöä 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

jossa SS on testiseoksen kiintoainepitoisuus (g/l).

48. R:n yhdisteltävissä olevat indeksit ovat seuraavat:

S ominaistaso

T kokonaissoluhengitystaso

N nitrifikaatiosoluhengityksestä johtuva taso

H heterotrofisesta soluhengityksestä johtuva taso

A abioottisista prosesseista johtuva taso

B nollakokeisiin perustuva taso (keskiarvo)

Nitrifikaatiosta johtuvan hapenoton laskeminen

49. Kokonaissoluhengityksen (R_T), nitrifikaatiosoluhengityksen (R_N) sekä heterotrofisen soluhengityksen (R_H) välinen suhde esitetään yhtälössä 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

jossa

R_N on nitrifikaatiosta johtuva hapenotto (mg/lh);

R_T on hapenoton taso mitattuna nollanäytteistä (eivät sisällä ATUa; F_B) (mg/lh)

R_H on hapenoton taso mitattuna nollanäytteistä (lisätty ATUa; F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Tämä suhde on voimassa nollanäytteille (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abioottisille kontrolleille (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) sekä testikemikaaleja sisältäville analyyseille (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Ominaissoluhengitystasot saadaan seuraavista yhtälöistä:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Jos R_N on alustavassa testissä merkityksetön (esimerkiksi < 5 % R_T-arvosta nollanäytteissä), voidaan olettaa, että heterotrofinen hapenotto vastaa kokonaishapenottoa, eikä nitrifikaatiota esiinny. Aktiivilietettä on hankittava toisesta lähteestä, jos testeillä halutaan tutkia vaikutusta heterotrofisiin ja nitrifioiviin mikro-organismeihin. Varsinainen testi tehdään, jos havaitaan merkkejä estyneestä hapenotosta testikemikaalin eri pitoisuuksia käytettäessä.

Prosentuaalisen inhibition laskeminen

52. Hapenkulutuksen kokonaistason prosentuaalinen inhibitio I_T testikemikaalin eri pitoisuuksilla saadaan yhtälöstä 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Heterotrofisen hapenkulutuksen prosentuaalinen inhibitio I_H testikemikaalin eri pitoisuuksilla saadaan vastaavasti yhtälöstä 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \ / \ 100\ \% \quad (8)$$

54. Hapenkulutuksen nitrifikaatiosta johtuva inhibitio I_N eri pitoisuuksilla saadaan yhtälöstä 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Hapenkulutuksen prosentuaalinen inhibitio piirretään testikemikaalin pitoisuuden logaritmin funktiona (inhibitiokäyrä; ks. lisäyksen 4 kuva 3). Inhibitiokäyrät piirretään erikseen jokaiselle kolmen tunnin ilmastusjaksolle tai 30 minuutin lisäajan jälkeen. Testikemikaalin pitoisuus, joka inhiboi hapenottoa 50 % (EC_{50}), lasketaan tai interpoloidaan käyrästä. Jos käytössä on sopivaa dataa, voidaan laskea tai interpoloida EC_{50}:n 95 prosentin luottamusvälit, käyrän kaltevuus sekä sopivat arvot, jotka ilmaisevat inhibition alkamishetken (esimerkiksi EC_{10} tai EC_{20}) sekä inhibitiovälin päättymisen (esimerkiksi EC_{80} tai EC_{90}).

56. On syytä huomata, että tuloksissa usein havaitun vaihtelun vuoksi monissa tapauksissa riittänee, kun tulokset lisäksi ilmaistaan suuruusjärjestyksessä esimerkiksi seuraavalla tavalla:

EC_{50}	< 1 mg/l
EC_{50}	1–10 mg/l
EC_{50}	10–100 mg/l
EC_{50}	> 100 mg/l

Tulosten tulkinta

EC_x

▼M6

57. EC_x-arvot, mukaan lukien niitä koskevat parametrin 95 prosentin luottamusvälit, lasketaan sopivien tilastollisten menetelmien avulla (esimerkiksi tilastollinen koestus, logistinen funktio tai Weibullin funktio, viritetty Spearmanin ja Kärberin menetelmä tai yksinkertainen interpolointi (11)). EC_x saadaan lisäämällä yhtälöön kontrollin keskiarvon x prosenttia vastaava arvo. Jos halutaan laskea EC_{50} tai jokin muu EC_x-arvo, käsittelyä edeltävälle keskiarvolle (x) olisi tehtävä regressioanalyysi.

NOEC-estimointi

58. Jos tilastollisella analyysilla on tarkoitus määrittää NOEC-arvo, astiakohtaiset tilastot (yksittäisiä astioita pidetään rinnakkaisnäytteinä) ovat tarpeen. Tässä käytetään sopivia tilastollisia menetelmiä, jotka perustuvat OECD:n asiakirjaan Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application (11). Yleensä testikemikaalin haitallisia vaikutuksia verrattuna kontrolliin tutkitaan käyttämällä yksisuuntaista (pienempää) hypoteesitestausta, jossa $p \leq 0{,}05$.

Testiraportti

59. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, puhtaus;

— testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (esimerkiksi log K_{ow}, vesiliukoisuus, höyrynpaine, Henryn vakio (H) sekä mahdolliset tiedot testikemikaalin kulkeutumisesta, esimerkiksi adsorboituminen aktiivilietteeseen);

Testijärjestelmä

— hankintapaikka, jäteveden käsittelylaitoksen toimintaolosuhteet ja sille saapuva tulovesi, pitoisuus, aktiivilietteen esikäsittely ja hoitotapa;

Testiolosuhteet

— testilämpötila, pH testin aikana sekä altistusvaiheen tai -vaiheiden kesto;

Tulokset

— kontrollien ominaishapenkulutus (mg O_2/(g lietettä × h);

— kaikki mitatut tiedot, inhibitiokäyrä tai -käyrät sekä EC_{50}:n laskentamenetelmä;

— EC_{50} sekä mahdollisuuksien mukaan 95 prosentin luottamusvälit, mahdollisesti EC_{20} ja EC_{80}; mahdollisesti NOEC sekä käytetyt tilastolliset menetelmät, jos EC_{50}:n määrittäminen ei ole mahdollista;

— kokonaisinhibitiota sekä tarvittaessa heterotrofista ja nitrifikaatioinhibitiota koskevat tulokset;

— abioottinen hapen yhteytys fysikaalis-kemiallisessa kontrollissa (jos käytössä);

— vertailukemikaalin nimi ja sillä saadut tulokset;

— kaikki tarkkailutulokset ja tuloksiin mahdollisesti vaikuttavat poikkeamat standarditestausmenetelmästä.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245–261.

▼M6

(2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27–39.

(3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.

(5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.

(6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471–483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515–524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test – acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556–1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼**M6**

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä sovelletaan seuraavia määritelmiä:

Kemikaali: aine tai seos.

ECx (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa × prosenttia muutoksia): Pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC_{50}-arvo on pitoisuus, jonka on arvioitu aiheuttavan vaikutuksen testiominaisuuteen 50 prosentilla altistuneesta populaatiosta tietyn altistusjakson aikana.

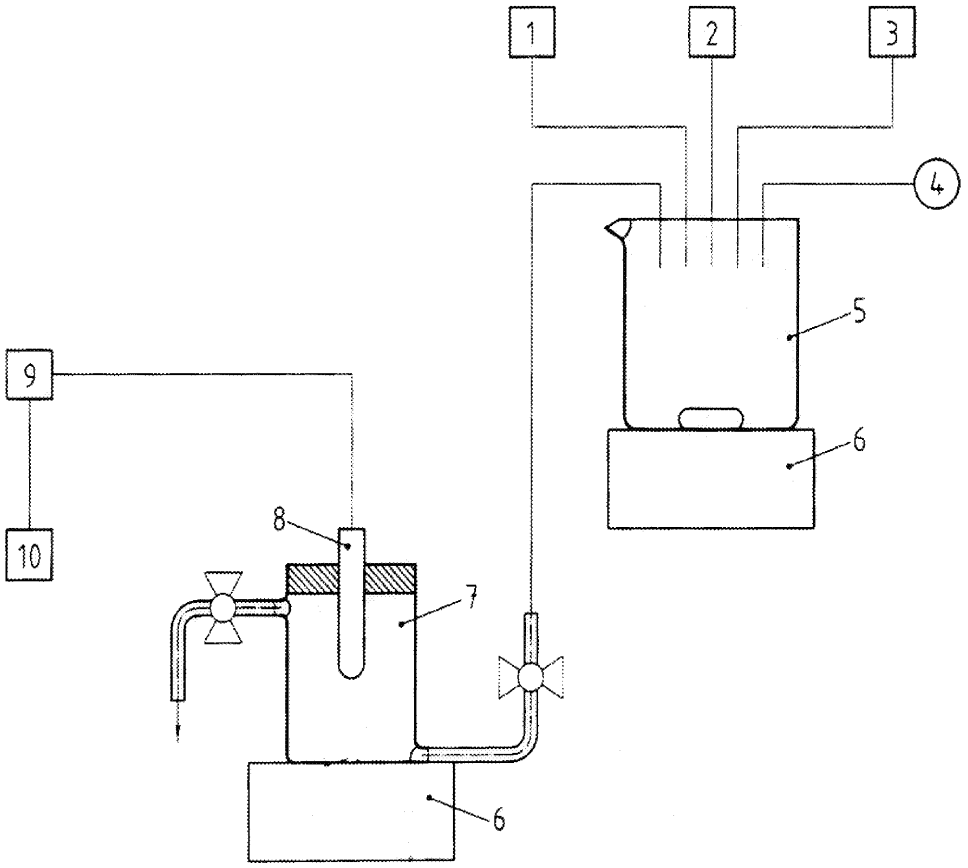
NOEC (no observed effect concentration = pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta): testikemikaalin pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia. Tässä testissä NOEC-arvoa vastaavalla pitoisuudella ei ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta ($p < 0,05$) tietyn altistusajan kuluessa kontrolliin verrattuna.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼**M6**

Lisäys 2

Kuva 1: **Esimerkkejä mittausyksiköstä**



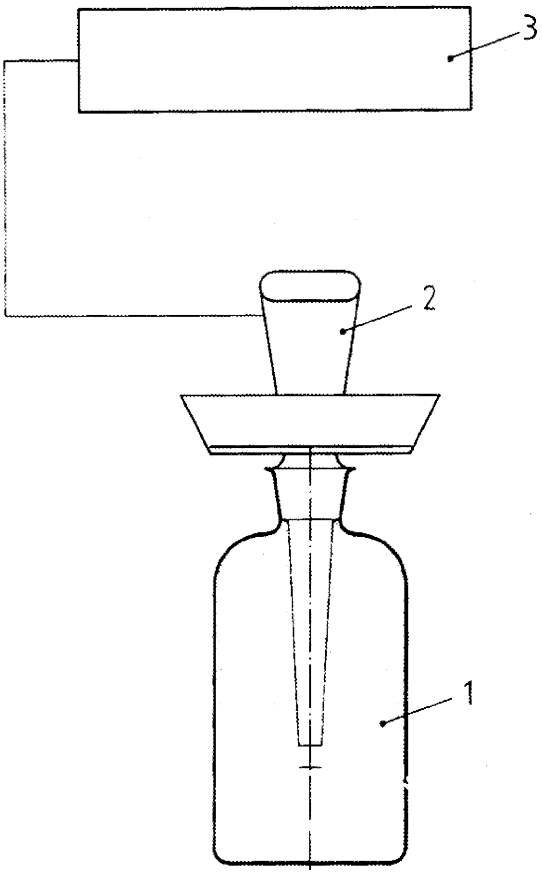
Selitykset

1 Aktiiviliete	6 Magneettisekoitin
2 Synteettinen ravinneliuos	7 Hapenmittauskenno
3 Testikemikaali	8 Happielektrodi
4 Ilmaa	9 Hapenmittausinstrumentti
5 Sekoitusastia	10 Piirturi

▼**M6**

Lisäys 3

Kuva 2: **Esimerkki mittausyksiköstä BOD-pulloa käytettäessä**



Selitykset

1 Testiastia

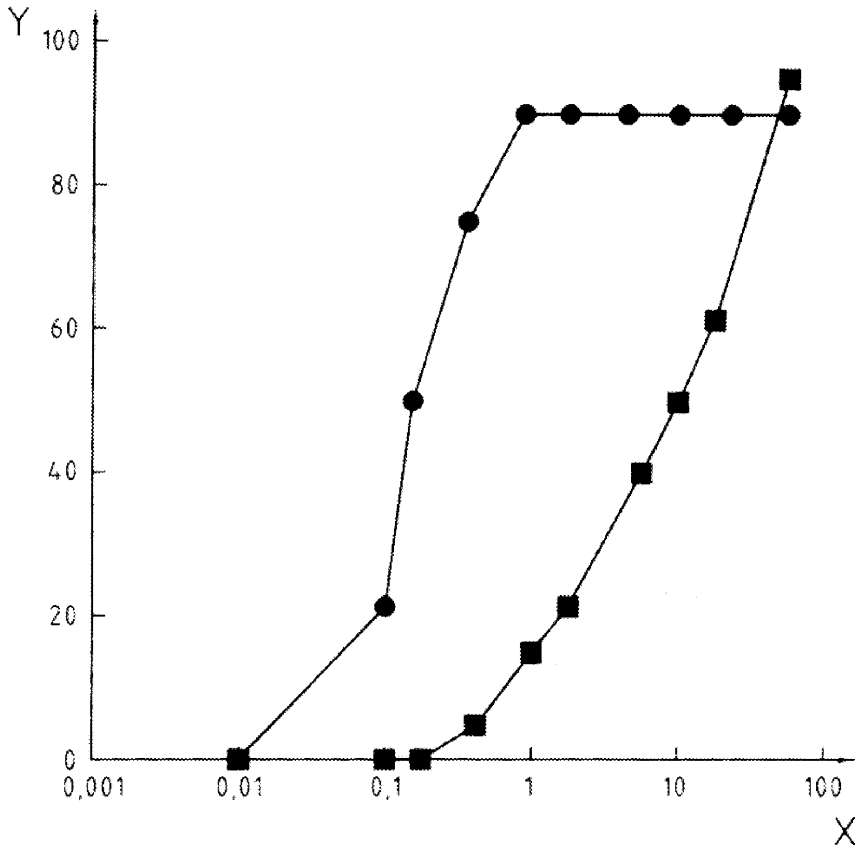
2 Happielektrodi

3 Hapenmittausinstrumentti

▼**M6**

Lisäys 4

Kuva 3: **Esimerkki inhibitiokäyristä**



Selitykset

X 3,5-dikloorifenolin pitoisuus (mg/l)

Y inhibitio (%)

■ heterotrofisen soluhengityksen inhibitio nitrifioivaa lietettä käytettäessä

● nitrifikaation inhibitio nitrifioivaa lietettä käytettäessä.

▼B

C.12. **BIOLOGINEN HAJOAMINEN**

MODIFIOITU SCAS-TESTI

1. **MENETELMÄ**

1.1 JOHDANTO

Menetelmän tarkoituksena on arvioida vesiliukoisten, haihtumattomien orgaanisten aineiden mahdollinen lopullinen biologinen hajoaminen, kun ne altistetaan pitkäksi ajaksi mikro-organismien suurille pitoisuuksille. Mikro-organismien elinkykyä pidetään edellä tämän ajan kuluessa lisäämällä selkeytettyä jätevesiravinnetta päivittäin. (Viikonloppuina tarvittava jätevesi voidaan varastoida 4 °C:ssa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää OECD:n toteamiskokeen synteettistä jätevettä.)

Liuokseen suspensoituneisiin kiinteisiin aineosiin voi tapahtua fysikaalis-kemiallista adsorptiota ja tämä on otettava huomioon tuloksia tulkittaessa (ks. 3.2).

Nestefaasin pitkän pidätysajan (36 tuntia) ja ravinteiden ajoittaisen lisäämisen vuoksi koe ei simuloi jätevesipuhdistamossa vallitsevia olosuhteita. Testattavilla aineilla saadut tulokset viittaavat siihen, että biologinen hajoamispotentiaali on testissä suuri.

Tämä testi antaa erittäin sopivat puitteet testattavan yhdisteen hajottamiseen sopivien mikro-organismien valinnalle ja/tai adaptaatiolle. (Menetelmällä voidaan myös tuottaa adaptoituja inokulaatteja muita kokeita varten.)

Tässä menetelmässä liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuuden määritystä käytetään testattavien aineiden lopullisen biologisen hajoamisen arviointiperusteena. Liuenneen hiilen määrittäminen happamaksi tekemisen ja huuhtelun jälkeen on suositeltavampaa kuin sen määrittäminen $C_{kokonais}$ -$C_{epaorgaaninen}$ erona.

Samanaikaisesti käytetyllä ominaisanalyysimenetelmällä voidaan määrittää aineen biologinen primaarihajoaminen (alkuperäisen kemiallisen rakenteen häviäminen).

Tällä menetelmällä voidaan tutkia vain sellaisia orgaanisia aineita, jotka testissä käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

— ovat vesiliukoisia (vähintään 20 mg liuennutta orgaanista hiiltä/l),

— joiden höyrynpaine on mitätön,

— eivät estä bakteeritoimimaa,

— eivät merkitsevästi absorboidu käytetyssä testissä,

— eivät poistu testiliuoksesta vaahtoamisen vuoksi.

Testattavan aineen sisältämä orgaaninen hiili on määritettävä.

▼B

Tiedot testattavan materiaalin pääaineosien suhteellisista osuuksista auttavat tulosten tulkinnassa, varsinkin jos tulokset ovat alhaisia tai marginaalisia.

Tiedot aineen myrkyllisistä vaikutuksista mikro-organismeihin ovat avuksi alhaisten tulosten tulkinnassa ja oikeiden pitoisuuksien valinnassa.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

C_T = testattavan yhdisteen pitoisuus joko selkeytetyssä jätevedessä olevana tai siihen lisättynä orgaanisena hiilenä ilmastusjakson alkaessa (mg/l),

C_1 = testissä käytetyn liuoksen kelluvaan nesteeseen liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus ilmastusjakson lopussa (mg/l),

C_c = kontrolliliuoksen kelluvaan nesteeseen liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus ilmastusjakson lopussa (mg/l),

Tässä menetelmässä biologinen hajoaminen ilmenee orgaanisen hiilen katoamisena. Biologinen hajoaminen voidaan ilmaista seuraavasti:

1. Prosentuaalinen poistuma D_{da} päivittäin lisätyn aineen määrästä:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad (1)$$

jossa

D_{da} = hajoaminen/päivittäinen lisäys.

2. Prosentuaalinen poistuma D_{ssd} aineen määrästä päivän alkaessa:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

jossa

D_{ssd} = hajoaminen/aine päivän alkaessa;

indeksit i ja (i + 1) viittaavat määrityspäivään.

Yhtälöä 2 (a) suositellaan käytettäväksi, mikäli poistoveteen liuennut orgaaninen hiili vaihtelee päivästä toiseen, kun taas yhtälö 2 (b) sopii käytettäväksi määrän pysyessä suhteellisen vakiona päivästä päivään.

▼B

1.3 VERTAILUAINEET

Tutkittaessa uutta ainetta vertailuaineista saattaa joissakin tapauksissa olla apua, mutta mitään tiettyä vertailuainetta ei kuitenkaan suositella.

Joidenkin yhdisteiden rengasreaktioiden tulokset esitetään lisäyksessä 1, jotta menetelmä voidaan kalibroida aika ajoin ja suorittaa tulosten vertailua jotakin toista menetelmää käytettäessä.

1.4 TESTIN PERIAATE

Jätevesipuhdistamosta peräisin olevaa aktiivilietettä pannaan puolijatkuvaan aktiivilieteyksikköön (semi-continuous activated sludge unit, SCAS). Testattava yhdiste selkeytetään, lisätään selkeytettyä kotitalousjätevettä ja seosta ilmastetaan 23 tuntia. Tämän jälkeen ilmastus lopetetaan, lietteen annetaan selkeytyä ja kelluva neste poistetaan.

Ilmastuskammioon jäävään lietteeseen sekoitetaan uusi määräannos testattavaa yhdistettä ja jätevettä ja sykli toistetaan.

Biologinen hajoaminen määritetään mittaamalla kelluvasta nesteestä liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus. Saatua arvoa verrataan kontrolliin, johon on lisätty ainoastaan selkeytettyä jätevettä.

Ominaisanalyyttisellä menetelmällä voidaan määrittää biologisesta hajoamisesta johtuvat muutokset alkuperäismolekyylin pitoisuudessa (biologinen primaarihajoaminen).

1.5 LAATUVAATIMUKSET

Tämän liuenneen orgaanisen hiilen poistumiseen perustuvan menetelmän toistettavuutta ei vielä ole vahvistettu. (Biologisen primaarihajoamisen osalta saadaan hyvin tarkkoja tietoja aineista, joiden hajoavuus on hyvä.)

Menetelmän herkkyys riippuu suuresti nollakokeen vaihteluista ja jonkin verran myös liuenneen orgaanisen hiilen määrityksen tarkkuudesta sekä nesteessä olevan testattavan yhdisteen määrästä kunkin syklin alussa.

1.6 TESTIN KUVAUS

1.6.1 *Testin valmistelu*

Testiä varten varataan puhtaita ilmastusyksiköitä tai vaihtoehtoisesti alkuperäinen 1,5 litran SCAS-testiyksikkö ja ilmaputki kutakin testattavaa ainetta ja kontrollia varten (kuva 1). Koeyksikköihin pumpataan vanusuodattimella puhdistettua paineilmaa, jossa ei ole orgaanista hiiltä, ja joka on esikyllästetty vedellä haihtumisesta johtuvan hävikin vähentämiseksi.

Pääasiassa kotitalousjätevettä käsittelevästä puhdistamosta otetaan nestenäyte, jossa on 1–4 g kiinteitä aineita litraa kohden. Tätä nestettä tarvitaan kutakin ilmastusyksikköä kohden noin 150 ml.

▼B

Testattavasta aineesta tehdään varastoliuokset tislattuun veteen. Tarvittava pitoisuus on yleensä 400 mg/l orgaanista hiiltä, joka antaa testattavan yhdisteen pitoisuudeksi 20 mg/l hiiltä kunkin ilmastussyklin alkaessa, ellei biologista hajoamista tapahdu.

Suurempia pitoisuuksia voidaan käyttää, jos mikro-organismeihin kohdistuvat myrkkyvaikutukset eivät ole esteenä sille.

Varastoliuosten orgaanisen hiilen pitoisuus määritetään.

1.6.2 *Koeolosuhteet*

Testi on suoritettava 20–25 °C:n lämpötilassa.

Testissä käytetään korkeita aerobisia mikro-organismipitoisuuksia (1–4 g/l suspendoituja kiinteitä aineita) ja tehokas retentioaika on 36 tuntia. Jätevesiravinteessa oleva hiilipitoinen aines hapettuu suuresti yleensä kahdeksan tunnin kuluessa ilmastussyklin alkamisesta. Sen jälkeen lietteessä tapahtuu endogeenista uloshengitystä ilmastuksen loppuajan, ja tämän ajan kuluessa testattava yhdiste on ainoa substraatti, ellei tämäkin metaboloidu helposti. Nämä ominaisuudet yhdessä päivittäisen uudelleenymppäyksen kanssa, kun kotitalousjätevettä käytetään ravinteena, antavat hyvät mukautumis- ja biologiset hajoamisedellytykset.

1.6.3 *Testin suorittaminen*

Pääasiassa kotitalousjätevettä käsittelevästä aktiivilietelaitoksesta, tai laboratorioyksiköstä, hankittu nesteseos pidetään aerobisena laboratoriokäyttöön asti. Kuhunkin ilmastus- ja kontrolliyksikköön pannaan 150 ml nesteseosta (alkuperäistä SCAS-yksikköä käytettäessä käytetään kymmenkertaista määrää) ja ilmastus aloitetaan. Ilmastus lopetetaan 23 tunnin kuluttua ja lietteen annetaan selkeytyä 45 minuuttia. Kunkin astian hana avataan vuorollaan ja 100 ml erä kelluvaa nestettä poistetaan. Juuri ennen käyttöä hankittua selkeytettyä kotitalousjätevettä lisätään 100 ml kuhunkin ilmastusyksikköön jäävään lietteeseen ja ilmastus aloitetaan uudelleen. Tässä vaiheessa ei lisätä testattavaa ainetta ja yksikköihin lisätään ainoastaan kotitalousjätevettä päivittäin, kunnes selkeytyksen jälkeinen kelluva neste on kirkasta. Tähän kuluu yleensä korkeintaan kaksi viikkoa, jolloin kelluvaan nesteeseen liuenneen orgaanisen hiilen määrä jokaisen ilmastussyklin lopussa lähestyy vakio arvoa.

Tämän ajan lopussa yksiköissä olevat lietteet sekoitetaan keskenään ja 50 ml näin yhdistettyä lietettä lisätään kuhunkin yksikköön.

Kontrolliyksikköihin lisätään 95 ml selkeytettyä jätevettä ja 5 ml vettä ja testiyksikköihin 95 ml selkeytettyä jätevettä ja 5 ml testattavan yhdisteen varastoliuosta (400 mg/l). Ilmastus aloitetaan jälleen ja sitä jatketaan 23 tuntia. Sen jälkeen lietteen annetaan selkeytyä 45 minuuttia, kelluva neste poistetaan ja siitä analysoidaan liuennut orgaaninen hiilipitoisuus.

Edellä esitetyt täyttö- ja poistotoimenpiteet suoritetaan testin aikana päivittäin.

▼B

Ennen selkeytystä voi olla tarpeen puhdistaa yksikön seinämät, jotta nestepinnan yläpuolelle ei pääse kertymään kiinteitä aineita. Kutakin yksikköä varten on varattava oma kaavin tai harja, jotta yksikköjen välillä ei pääse tapahtumaan kontaminaatiota.

Kelluvissa nesteissä oleva liuennut orgaaninen hiili tulee mieluimmin määrittää päivittäin, mutta harvemminkin tapahtuvat määritykset ovat hyväksyttäviä. Ennen analyysiä nesteet suodatetaan pestyillä 0,45 μm kalvosuodattimilla tai sentrifugoidaan. Kalvosuodattimet ovat sopivia, jos ne eivät vapauta hiiltä eivätkä absorboi ainetta suodatusvaiheessa. Aineen lämpötila sentrifugissa ei saa ylittää 40 °C:+ta.

Testin kestoaikaa ei ole määrätty testattaessa yhdisteitä, jotka hajoavat heikosti tai ei lainkaan, mutta kokemus on osoittanut, että ajan tulisi yleensä olla vähintään 12 viikkoa ja korkeintaan 26 viikkoa.

2. **TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI**

Koe- ja kontrolliyksikköjen kelluviin nesteisiin liuenneen orgaanisen hiilen arvot esitetään käyränä suhteessa aikaan.

Kun biologinen hajoaminen saavutetaan, testissä saavutettu taso lähenee kontrollien tasoa. Kun ero on pysyvä kolmessa peräkkäisessä määrityksessä, määrityksiä tehdään vielä tietojen tilastollisen käsittelyn edellyttämä määrä ja testattavan yhdisteen biologinen hajoamisprosentti lasketaan (Dj_a tai D_{ssd}, ks. 1.2).

3. **RAPORTOINTI**

3.1 TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— kaikki jätevettä ja käytettyä koeyksikköä koskevat tiedot ja testattavalla aineella ja mahdollisella vertailuaineella saadut tulokset sekä nollakokeen tulokset,

— lämpötila,

— poistumakäyrä ja selostus, laskutapa (ks. 1.2),

— aktiivilietteen ja jäteveden hankintapaikka ja -aika, adaptaatiotiedot, pitoisuus jne.,

— testausmenetelmään tehtyjen muutosten tieteelliset perustelut,

— allekirjoitus ja päiväys.

▼B

3.2 TULOSTEN TULKINTA

Koska testattava aine ei ole tällä menetelmällä biologisesti helposti hajoavaa, pelkästään biologisesta hajoamisesta johtuva liuennut orgaaninen hiili poistuu yleensä vähitellen päivien tai viikkojen kuluessa, paitsi milloin mukautuminen tapahtuu äkillisesti, mikä näkyy äkillisenä poistumana muutamien viikkojen kuluttua.

Fysikaalis-kemiallisella adsorptiolla voi joskus olla huomattava vaikutus. Tähän viittaa lisätyn liuenneen orgaanisen hiilen täydellinen tai osittainen poistuma kokeen alussa. Sen jälkeinen kehitys riippuu adsorption asteesta sekä poistettuun poistovirtaan suspendoituneiden kiinteiden aineiden pitoisuudesta. Kontrollin ja kokeen kelluviin nesteisiin liuenneen orgaanisen hiilipitoisuuden ero kasvaa tavallisesti asteittain kokeen alun alhaisesta arvosta ja tämä ero pysyy sitten saavuttamallaan uudella tasolla testin loppuajan, ellei adaptaatiota tapahdu.

Lisätutkimuksia tarvitaan, mikäli biologinen hajoaminen (tai osittainen biologinen hajoaminen) ja adsorptio halutaan erottaa toisistaan. Tämä voidaan tehdä usealla tavalla, mutta luotettavin tapa on käyttää kelluvaa nestettä tai lietettä inokulaattina perussarjan testissä (mieluimmin respirometritestissä).

Testattavia aineita, joiden liuenneen orgaanisen hiilen täydellinen tai osittainen poistuma ilman adsorptiota on tässä testissä korkea, voidaan pitää biologisesti hajoavina. Osittainen poistuma ilman adsorptiota osoittaa, että kemikaali hajoaa biologisesti ainakin jossakin määrin.

Alhainen tai nollapoistuma saattaa johtua testattavan aineen mikro-organismeihin kohdistuvasta inhibitiovaikutuksesta, joka voi myös ilmetä lietteen liukenemisena ja häviämisenä, jolloin kelluva neste on sameaa. Koe on uusittava testattavan aineen alhaisemmalla pitoisuudella.

Suurempi herkkyys saadaan käyttämällä ominaisanalyysiä tai ^{14}C:llä merkittyä testattavaa ainetta. Mikäli testattava yhdiste on merkitty ^{14}C:llä, $^{14}CO_2$:n toteaminen osoittaa, että biologista hajoamista on tapahtunut.

Kun tulokset ilmoitetaan myös primaarihajoamisena, alkuperäisen testattavan aineen reagoimattomuuteen johtanut kemiallinen rakennemuutos tulisi mahdollisuuksien mukaan selvittää.

Analyysimenetelmän kelpoisuus samoin kuin nollakokeen elatusaineesta saatu vaste on ilmoitettava.

4. **LÄHDELUETTELO**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A,* Decision of the Council C(81)30 final.

▼B

Lisäys 1

SCAS-testi: esimerkki tuloksista

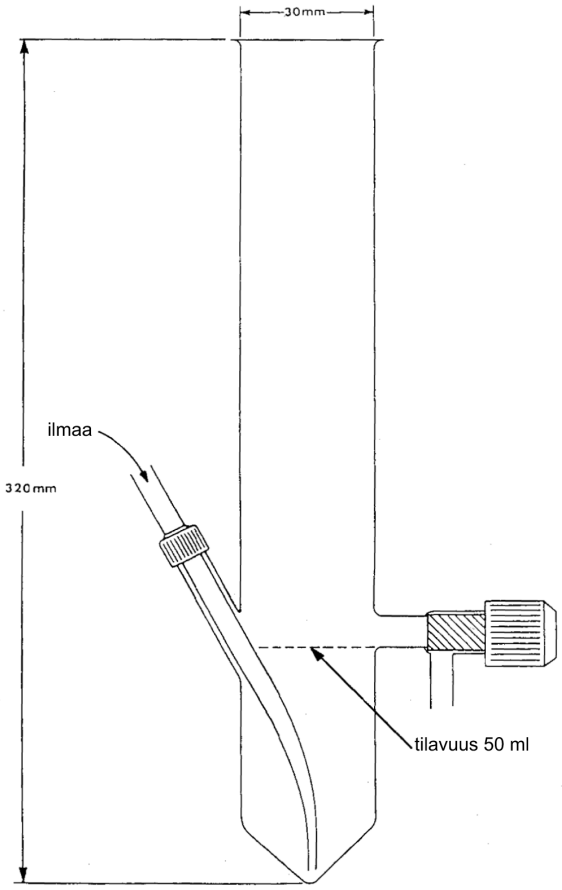
Aine	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/1)	Biologinen hajoamisprosentti, D_{da},	Kokeen kesto (päiviä)
4-asetyyliaminobentseemsulfonaatt]	17,2	2,0	85	40
Tetrapropyleembentseenisulfonaatti	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenoli	16,9	0,8	95,3	40
Dietyleeniglykoli	16,5	0,2	98,8	40
Aniliini	16,9	1,7	95,9	40
Syklopentaanitetrakarboksylaatti	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Lisäys 2

Esimerkki koelaitteesta

Figure 1



▼M7

C.13. BIOAKKUMULAATIO KALOISSA: ALTISTAMINEN VEDEN JA RAVINNON VÄLITYKSELLÄ

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä (TM) vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 305 (2012). Testimenetelmän tarkistamisella on kaksi päätavoitetta. Ensinnäkin tavoitteena on yhdistää ravinnon välityksellä tapahtuvaa bioakkumulaatiota ([1]) koskeva testi hyvin niukkaliukoisten aineiden mahdollisen bioakkumulaation määrittämiseen. Toiseksi tavoitteena on luoda testimenetelmä, jossa käytetään mahdollisuuksien mukaan vähemmän kaloja, mikä parantaa eläinten hyvinvointia ja on myös kustannustehokkaampaa.

Konsolidoidun testimenetelmän C.13 (1) käyttöönoton jälkeen on testattu lukuisia aineita, joten sekä laboratorioilla että sääntelyviranomaisilla on nykyään huomattavasti enemmän kokemusta asiasta. Tämä on vakuuttanut eri tahot siitä, että testejä voidaan yksinkertaistaa tiettyjen perusteiden täyttyessä (ks. 88 kohta) ja että vaiheittainen lähestymistapa on mahdollinen. Kokemus on myös osoittanut, että erilaiset biologiset tekijät, kuten kasvu ja kalan rasvapitoisuus, voivat vaikuttaa merkittävästi testituloksiin, joten ne pitää tarvittaessa ottaa huomioon. Lisäksi on todettu, ettei hyvin niukkaliukoisten aineiden testaus ole välttämättä teknisesti mahdollista. Vesiympäristössä esiintyville hyvin niukkaliukoisille aineille altistuminen veden välityksellä ei myöskään välttämättä ole niin merkittävää kuin ravinnon välityksellä tapahtuva altistuminen. Näiden seikkojen perusteella on kehitetty testimenetelmä, jossa kalat altistetaan ravinnon välityksellä (ks. 7–14 kohta ja 97 kohdasta eteenpäin). Ravinnon välityksellä tehtävä altistustesti validoitiin (yhteistutkimuksessa) vuonna 2010 (51).

Tärkeimpiä muutoksia ovat seuraavat:

— Yhden testipitoisuuden testaamista voidaan pitää riittävänä, jos on todennäköistä, ettei biokertyvyystekijä (bioconcentration factor, BCF) ole riippuvainen testipitoisuudesta.

— Minimoitu vesialtistustesti, jossa näytteenottopisteiden määrä voidaan pitää vähäisenä, on mahdollinen tiettyjen perusteiden täyttyessä.

— Kalojen rasvapitoisuus olisi mitattava siten, että biokertyvyystekijä voidaan ilmaista viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti.

— Tasapainotilassa tehtävän biokertyvyystekijöiden arvioinnin rinnalla painotetaan (kun mahdollista) aiempaa enemmän kineettisen biokertyvyystekijän arviointia.

— Tietyille aineryhmille ehdotetaan ravinnon välityksellä tehtävää altistustestiä, jos sen katsotaan soveltuvan tarkoitukseen veden välityksellä tapahtuvaa altistustestiä paremmin.

— Kala pitäisi punnita siten, että kineettinen biokertyvyystekijä ($BCF_{k)}$ voidaan korjata kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaisesti.

Ennen bioakkumulaatiotestin tekemistä testiaineesta on tiedettävä seuraavat asiat:

a) Analyysitekniikan herkkyys sekä testiaineen että mahdollisten metaboliittien kudos-, vesi- tai ravintopitoisuuksien mittaamiseksi (ks. 65 kohta).

b) Vesiliukoisuus [TM A.6; (2)] on määritettävä (arvioituun) liukoisuusalueeseen soveltuvalla menetelmällä, jotta saatava arvo olisi luotettava. Hydrofobisilla aineilla tällainen menetelmä on yleensä kolonnieluutiomenetelmä.

([1]) Ks. liitteessä 1 annetut määritelmät ja yksiköt.

▼M7

c) N-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin, K_{OW} ([1]) [TM A.8 (4), TM A.24 (5) ja TM A.23 (6)] tai muu sopiva jakaantumiskäyttäytymistä koskeva tieto (kuten rasvasorptiokerroin, K_{OC}) pitäisi määrittää (arvioituun) K_{OW}-alueeseen soveltuvalla menetelmällä, jotta saatava arvo olisi luotettava. Hydrofobisilla aineilla tämä menetelmä on yleensä hidassekoitusmenetelmä [TM A.23 (6)].

d) Aineen stabiilius vedessä (hydrolyysi) [TM C.7 (7)].

e) Aineen stabiilius ravinnossa (erityisesti silloin, kun testimenetelmänä on ravintoaltistus).

f) Testin säteilyolosuhteiden kannalta merkitykselliset tiedot valokemiallisesta muuntumisesta (8).

g) Pintajännitys (aineilla, joiden log K_{OW}:ta ei voida määrittää) [TM A.5 (9)].

h) Höyrypaine [TM A.4 (10)].

i) Tarvittaessa tiedot bioottisesta ja abioottisesta hajoamisesta vedessä, kuten (esimerkiksi) nopea biohajoavuus [TM C.4, osat II–VII(11), TM C.29 (12)].

j) Tiedot metaboliiteista: rakenne, log K_{OW}, muodostuminen ja hajoavuus tarvittaessa.

k) Hapon dissosiaatiovakio (pK_a) mahdollisesti ionisoituvilla aineilla. Testiveden pH-arvo on tarvittaessa säädettävä siten, että aine on testin aikana ionisoimattomassa muodossa, jos se on mahdollista käytettävillä kalalajeilla.

Riippumatta valitusta altistusmenetelmästä tai otanta-aikataulusta tämä testimenetelmä kuvaa prosessia, jonka avulla voidaan määrittää eri aineiden bioakkumulaatiopotentiaali kaloissa. Vaikka läpivirtausolosuhteissa suoritettu testaus on paras, puolistaattiset olosuhteet ovat hyväksyttäviä tiettyjen validiteettiperusteiden täyttyessä (ks. 24 ja 113 kohta). Ravinnon välityksellä tehtävä altistus ei edellytä läpivirtausjärjestelmää, jotta testiaineen pitoisuus vedessä pysyisi samana, mutta sen avulla voidaan ylläpitää liuenneen hapen pitoisuus sopivalla tasolla sekä varmistaa veden puhtaus ja mitätöidä esimerkiksi erilaisten eritteiden vaikutukset.

Tässä kuvatussa testimenetelmässä annetaan riittävän tarkat ohjeet testin suorittamiseksi valitusta testimenetelmästä riippumatta, mutta koejärjestelyjä on mahdollista mukauttaa yksittäisten laboratorioiden erityisolosuhteiden ja testiaineiden vaihtelevien ominaisuuksien huomioimiseksi. Vesialtistustesti soveltuu parhaiten sellaisille stabiileille orgaanisille aineille, joiden log K_{OW} -arvo on 1,5–6,0 (13), mutta sitä voidaan käyttää myös erittäin hydrofobisten aineiden (joiden log K_{OW} on yli 6,0) testaamisessa, jos on mahdollista osoittaa, että testiaine on kokonaan liuennut ja sen pitoisuus vedessä on vakaa. Jos testiaineen vakaata pitoisuutta vedessä ei voida osoittaa, vesitutkimus ei ole hyvä menetelmä. Tällöin ainetta on testattava kaloissa ravinnon välityksellä (vaikkakin ravintoaltistustestin tulosten tulkinta ja käyttö saattavat riippua sovellettavasta säädöskehyksestä). Orgaanisilla aineilla, joiden log K_{OW} on noin 9,0, biokertyvyystekijä (BCF, josta käytetään

([1]) Joskus käytetään myös lyhennettä P_{OW}; määritetään ravistuspullomenetelmällä TM A.8:ssa (3), HPLC-menetelmällä (nestekromatografia) TM A.24:ssä (4) ja hidassekoitusmenetelmällä TM A.23:ssa (5). Log K_{OW} -kertoimen määrittämisessä käytetään joskus myös kehitinkolonnimenetelmää. Tätä menetelmää on käytetty tutkimuksissa vähän. Tutkimusten kohteina ovat tällöin olleet etupäässä klooratut bifenyylit ja dibentsodioksiinit (esimerkiksi Li ja Doucette, 1993) (3). Mahdollisesti ionisoituvilla aineilla log K_{OW} -kertoimen pitäisi viitata ionisoitumattomaan muotoon.

▼M7

joskus myös tunnusta K_B), biokertyvyystekijää voidaan arvioida alustavasti Bintein *et al.* -yhtälön avulla (14). Erittäin hydrofobisilla aineilla biokertyvyystekijän alustavassa arviossa saatu arvo voi olla korkeampi kuin laboratorio-olosuhteissa odotettu tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SS}). Näin on erityisesti silloin, kun alustavassa arviossa käytetään yksinkertaista lineaarista mallia. Bioakkumulaatiopotentiaalia kuvaavia muuttujia ovat muun muassa kertymävakio (k_1), poistumavakiot (kuten k_2), tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SS}), kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ja ravinnon biomagnifikaatiokerroin (BMF) ([1]).

Radioaktiivisten merkkiaineiden käyttö saattaa helpottaa vesi-, ravinto- ja kalanäytteiden analysointia, ja niitä voi käyttää sen arvioimiseksi, onko metaboliittien tunnistaminen ja kvantifiointi tarpeen. Jos mitataan vain radioaktiivisten jäämien kokonaismäärä (esim. polttamalla tai kudoksiin liuottamalla), BCF tai BMF perustuu perusaineen kokonaismäärään, mahdollisesti jäljellä oleviin metaboliitteihin sekä assimiloituneeseen hiileen. Radioaktiivisten jäämien kokonaismäärään perustuva BCF- tai BMF-arvo ei siis ole välttämättä suoraan verrattavissa siihen BCF:ään tai BMF:ään, joka on johdettu pelkästään perusaineen spesifisestä kemiallisesta analyysistä. Erilaisia erotusmenetelmiä, kuten TLC, HPLC GC ([2]), voidaan käyttää ennen analyysia radioaktiivisia merkkiaineita soveltavissa tutkimuksissa perusaineeseen perustuvan BCF:n tai BMF:n määrittämiseksi. Erotustekniikoita käytettäessä on tunnistettava ja kvantifioitava perusaine ja merkitykselliset metaboliitit ([3]) (ks. 65 kohta), jos BCF tai BMF on tarkoitus määrittää kalojen perusainepitoisuuden perusteella radioaktiivisten jäämien kokonaismäärän sijasta. Kalojen aineenvaihduntaa koskeva tutkimus tai *in vivo* -distribuutiotesti on myös mahdollista liittää bioakkumulaatiotutkimukseen analysoimalla ja tunnistamalla kudoksissa esiintyvät jäämät. Mahdollista metaboloitumista voidaan ennustaa tarkoitukseen soveltuvilla työkaluilla (kuten OECD:n QSAR-työkalupakki (15) sekä alkuperäisvalmisteita koskevat QSAR-ohjelmat).

Siitä, tehdäänkö altistustesti veden vai ravinnon välityksellä, pitäisi päättää 3 kohdassa kuvattujen tekijöiden sekä sovellettavan säädöskehyksen perusteella. Esimerkiksi aineilla, joiden log K_{OW} -arvo on korkea mutta joiden vesiliukoisuus on kuitenkin arvioitavissa käytettävissä olevien analyysitekniikoiden herkkyyden ansiosta, pitäisi ensisijaisesti valita vesialtistustesti. On kuitenkin mahdollista, etteivät vesiliukoisuutta koskevat tiedot ole hydrofobisilla aineilla lopullisia. Näin ollen ennen testimenetelmän valitsemista pitäisi selvittää, onko mahdollista valmistaa vakaita ja mitattavissa olevia liuenneita vesipitoisuuksia (stabiilit emulsiot eivät ole sallittuja), joita voidaan käyttää veden välityksellä tehtävässä altistustutkimuksessa (16). Käytettävästä menetelmästä ei ole mahdollista antaa tarkkoja ohjeita vesiliukoisuuden ja oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen raja-arvojen perusteella, koska muut tekijät (kuten analyysitekniikat, hajoaminen ja imeytyminen) voivat vaikuttaa merkittävästi menetelmän soveltuvuuteen edellä esitetyistä syistä. Log K_{OW} -arvon ollessa yli 5 ja vesiliukoisuuden alle ~0,01–0,1 mg/l aineen testaus vesialtistuksella voi olla hankalampaa.

Testimenetelmän valintaan mahdollisesti vaikuttavat muut tekijät on myös otettava huomioon. Niitä ovat esimerkiksi aineen mahdollinen imeytyminen testiastioihin ja -laitteisiin ja aineen stabiilius vesiliuoksessa verrattuna sen stabiiliuteen kalan ravinnossa (17) (18).

Tietoa vastaavista käytännön seikoista saattaa löytyä aiemmin tehdyistä vesitutkimuksista. Lisätietoa bioakkumulaatiotutkimusten tehokkuuden arvioinnista löytyy aihetta käsittelevästä kirjallisuudesta (esim. (19)).

Tätä menetelmää suositaan testiaineen bioakkumulaatiopotentiaalin määrittämisessä aineilla, joilla liukoisuus tai vesipitoisuuden ylläpitäminen ja pitoisuuksien

([1]) Ks. määritelmät ja yksiköt liitteessä 1.
([2]) TLC: ohutkerroskromatografia; HPLC: nestekromatografia; GC: kaasukromatografia.
([3]) Joidenkin säädöskehysten mukaan metaboliittien analysointi voi olla pakollista, jos tietyt edellytykset täyttyvät (ks. 65 kohta).

▼M7

analysointi ei hankaloita vesialtistusmenetelmän toteutusta. Joka tapauksessa olisi varmistettava, että vesialtistuksessa käytettävät pitoisuudet vastaavat väliaineen vesiliukoisuusaluetta. Liuenneiden testiaineiden pitoisuuksien ylläpitämiseksi stabiileina voidaan käyttää eri menetelmiä, kuten kantaliuosten tai passiivisten annostelujärjestelmien käyttöä (esimerkiksi kolonnieluutiomenetelmä), kunhan voidaan osoittaa, että pitoisuudet voidaan pitää stabiileina eivätkä testiaineet muutu kohdassa 27 annettuihin suosituksiin nähden.

Erittäin hydrofobisilla aineilla (log K_{OW} > 5 ja liukoisuus alle ~ 0,01–0,1 mg/l) testaaminen vesialtistuksessa voi olla hankalampaa. Ongelmia saattaa seurata siitä, ettei vesipitoisuutta voida ylläpitää riittävän vakiona (esimerkiksi siksi, että aine imeytyy altistussäiliöiden lasiin tai kertyy kaloihin nopeasti) tai käytettävien vesipitoisuuksien taso on yhtä alhainen tai alhaisempi kuin kvantifioinnin analysointiraja ([1]). Tällaisilla erittäin hydrofobisilla aineilla on suositeltavaa käyttää ravinnon välityksellä tehtävää testiä edellyttäen, että testissä noudatetaan sovellettavaa säädöskehystä ja huomioidaan riskinarviointiin liittyvät tarpeet.

Pinta-aktiivisilla aineilla on arvioitava, voidaanko biokertyvyys testata vedessä ottaen huomioon aineen ominaisuudet. Jos se ei ole mahdollista, ravinnon välityksellä tehtävä tutkimus on todennäköisemmin parempi vaihtoehto Pinta-aktiiviset aineet ovat aineita, jotka alentavat kahden nesteen välistä rajapintajännitystä. Ne ovat luonteeltaan amfifiilisia (eli niissä on sekä hydrofiilinen että hydrofobinen osa), minkä takia ne kertyvät erilaisiin rajapintoihin, kuten veden ja ilman väliseen rajapintaan, veden ja ravinnon väliseen rajapintaan sekä lasiseinämiin. Tästä johtuen niiden vesipitoisuutta ei voida määrittää.

Ravinnon välityksellä tehtävässä testissä voidaan kiertää osa altistukseen liittyvistä näkökohdista, kun on kyse monimutkaisista seoksista, joiden ainesosat liukenevat veteen eri tavoin. Tällöin vertailtavissa oleva altistuminen kaikille seoksen ainesosille on todennäköisempää kuin veden välityksellä tehtävässä menetelmässä (ks. (20)).

On huomattava, että ravinnon välityksellä tehtävässä testissä saadaan ennemminkin ravinnon biomagnifikaatiokerroin (BMF) kuin biokertyvyystekijä (BCF) ([2]). Kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) voidaan arvioida erilaisin menetelmin ravinnon välityksellä tehtävässä tutkimuksessa saatujen tietojen perusteella (kuten esitetään liitteessä 8), mutta niitä on käytettävä varovaisesti. Yleensä kyseisillä menetelmillä voidaan selvittää ensimmäisen asteen kinetiikka ja ne soveltuvat vain tietyille ainesosaryhmille. On epätodennäköistä, että niitä voitaisiin soveltaa pinta-aktiivisiin aineisiin (ks. 12 kohta).

Minimoitua vesialtistustestiä, jossa eläinten ja/tai resurssien määrä pidetään pienempänä vähentämällä näytteenottopisteiden määrää (ks. 83 kohta ja siitä eteenpäin), pitäisi käyttää vain sellaisilla aineilla, joilla on syytä olettaa, että kertymä ja poistuma noudattavat suurin piirtein ensimmäisen asteen kinetiikkaa (eli kyse on yleensä ionisoitumattomista orgaanisista aineista, ks. 88 kohta).

C.13 – I: **BIOKERTYVYYDEN TESTAAMINEN KALOILLA VESIALTISTUKSESSA**

TESTIN PERIAATE

Testissä on kaksi vaihetta: altistusvaihe (kertymävaihe) ja altistuksen jälkeinen vaihe (poistumavaihe). Kertymävaiheen aikana ryhmä tietyn kalalajin yksilöitä altistetaan testiaineelle yhdessä tai useammassa valitussa pitoisuudessa testiaineen ominaisuuksista riippuen (ks. 49 kohta). Kalat siirretään tämän jälkeen poistumavaihetta varten väliaineeseen, jossa ei ole testiainetta. Kokeessa on aina oltava

([1]) Kertymävaiheen aikana vedestä mitattujen pitoisuuksien pitäisi yleensä olla vähintään yhden suuruusluokan korkeampia kuin kvantifiointiraja, jotta kaloihin kertyneestä aineesta saadaan tutkimuksen poistumavaiheessa määritettyä useampi kuin yksi puoliintumisaika.

([2]) Ks. määritelmät ja yksiköt liitteessä 1.

▼M7

poistumavaihe, paitsi jos aineen kertyminen kertymisvaiheen aikana on mitättömän pieni. Testiaineen pitoisuutta kalassa tai kalan pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa) seurataan testin molempien vaiheiden aikana. Altistusryhmän lisäksi kalojen vertailuryhmää pidetään samanlaisissa olosuhteissa (mutta ilman testiainetta), jotta biokertyvyyskokeessa mahdollisesti havaittavia haitallisia vaikutuksia voidaan verrata vertailukelpoiseen vertailuryhmään ja saadaan testiaineen taustapitoisuudet ([1]).

Vesialtistuksessa kertymävaihe kestää tavallisesti 28 vuorokautta. Kertymävaiheen kestoa voidaan tarvittaessa pidentää (ks. 18 kohta) tai sitä voidaan lyhentää, jos ilmenee, että tasapainotila on saavutettu nopeammin (ks. lisäys 1, määritelmät ja yksiköt). Kertymävaiheen kestoa ja tasapainotilan saavuttamiseen tarvittavaa aikaa voidaan ennustaa liitteessä 5 esitettyjen yhtälöiden avulla. Poistumavaihe alkaa, kun kaloja ei enää altisteta testiaineelle ja ne siirretään puhtaaseen astiaan samaan väliaineeseen, jossa ei kuitenkaan ole testiainetta. Biokertyvyystekijä lasketaan mahdollisuuksien mukaan sekä kalassa olevan pitoisuuden (C_f) ja vedessä olevan pitoisuuden suhteena (C_w) tasapainotilassa (BCF_{SS}; ks. lisäys 1, määritelmä) että kineettisenä biokertyvyystekijänä (BCF_K; ks. lisäys 1, määritelmät ja yksiköt), joka arvioidaan kertymävakion (k1) ja poistuma-vakion (k2) suhteena, kun oletetaan, että reaktio noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa ([2]).

Jos tasapainotilaa ei saavuteta 28 vuorokauden kuluessa, voidaan joko laskea BCF käyttämällä kineettistä lähestymistapaa (ks. 38 kohta) tai pidentää kertymävaihetta. Jos tasapainotilan saavuttaminen edellyttää kohtuuttoman pitkää kertymävaihetta (ks. 37 ja 38 kohta, liite 5), on suositeltavampaa käyttää kineettistä lähestymistapaa. Erittäin hydrofobisilla aineilla pitäisi vaihtoehtoisesti harkita ravintoaltistustestin toteuttamista ([3]) edellyttäen, että sovellettava säädöskehys sallii tämän.

Kertymävakio, poistumavakio (tai vakiot, jos käytetään monimutkaisempia malleja), biokertyvyystekijä (tasapainotilan ja/tai kineettinen) ja mahdollisuuksien mukaan näiden muuttujien luottamusvälit lasketaan mallista, joka parhaiten kuvaa testiaineen mitattuja pitoisuuksia kaloissa ja vedessä (ks. liite 5).

Koska kalan massa kasvaa testin aikana, testiaineen pitoisuus kasvavassa kalassa laskee (niin kutsuttu kasvun aiheuttama liukeneminen). Näin ollen kineettinen BCF arvioidaan liian alhaiseksi, jollei sitä korjata kasvun mukaisesti (ks. 72 ja 73 kohta).

BCF perustuu aineen kokonaispitoisuuteen kalassa (tässä huomioidaan kalan kokonaistuorepaino). Erityisistä syistä voidaan kuitenkin käyttää tiettyjä kudoksia tai elimiä (esim. lihas ja maksa), jos kala on riittävän suurikokoinen tai se voidaan jakaa syötävään (filee) ja syömäkelvottomaan (sisälmykset) osaan. Koska monien orgaanisten aineiden biokertyvyyspotentiaalin ja hydrofobisuuden välillä on selvä suhde, myös testattavan kalan rasvapitoisuuden ja kyseisten aineiden

([1]) Useimmilla testiaineilla niitä ei pitäisi ideaalitilanteessa löytyä kontrollivedestä. Taustapitoisuuksilla pitäisi olla merkitystä vain luonnossa esiintyvien materiaalien (kuten joidenkin metallien) ja kaikkialla ympäristössä olevien aineiden kannalta.

([2]) Jos reaktio ei selvästikään noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, pitäisi käyttää monimutkaisempia malleja (ks. liitteessä 5 annetut viitteet) ja pyytää neuvoa biostatistiikan asiantuntijoilta.

([3]) Alhainen altistuspitoisuus voi rajoittaa kertymää, koska biokertyvyystestissä vesiliukoisuus on heikko, kun taas ravintotestissä voidaan saavuttaa korkeampi altistuspitoisuus.

▼M7

havaitun biokertyvyyden välillä on vastaava suhde. Jotta tämän muuttujan merkitystä testituloksissa voitaisiin pienentää aineilla, joiden lipofiilisyys on korkea (joiden log K_{OW} > 3), biokertyvyys pitäisi ilmaista normalisoituna viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti (kalan kokonaistuorepainoon verrattuna) suoraan tutkimuksesta johdetun biokertyvyyden ohella. Tämä on tarpeen, jotta eri aineita ja/tai testilajeja koskevia tuloksia voidaan verrata keskenään. Viiden prosentin rasvapitoisuutta on käytetty laajalti, koska se edustaa tässä testimenetelmässä yleisesti käytettävien kalojen keskimääräistä rasvapitoisuutta (21).

TESTIAINEEN TIEDOT

Johdannossa (3 kohta) mainittujen testiaineen ominaisuuksien lisäksi muita tarvittavia tietoja ovat aineen toksisuus testissä käytettävälle kalalajille, mieluiten asymptoottinen (ajasta riippumaton) LC_{50}, ja/tai pitkäkestoisten kalakokeiden perusteella arvioitu toksisuus (esim. TM C.47 (22), TM C.15 (23) ja TM C.14 (24)).

Testiliuoksissa ja biologisessa aineksessa olevan aineen kvantifioimiseksi pitäisi olla käytettävissä sopiva määritysmenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan, sekä näytteen valmistusta ja säilyttämistä koskevat yksityiskohtaiset tiedot. Testiaineen kvantifiointiraja sekä vedessä että kalan kudoksissa pitäisi myös olla tiedossa. Jos testissä käytetään radioaktiivista merkkiainetta, sen pitäisi olla mahdollisimman puhdasta (mieluiten > 98 %). Lisäksi on tunnettava epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden prosenttiosuus.

TESTIN VALIDITEETTI

Testi on luotettava, jos seuraavat edellytykset täyttyvät:

Veden lämpötilan vaihtelu on alle ± 2 °C, koska suuret poikkeamat voivat vaikuttaa kertymisen ja poistuman kannalta olennaisiin biologisiin muuttujiin ja aiheuttaa eläimille stressiä.

Liuenneen hapen pitoisuus ei laske alemmaksi kuin 60 prosenttia kyllästymisarvosta.

Testiaineen pitoisuus testauskammiossa pidetään 20 prosentin rajoissa kertymävaiheessa mitattujen arvojen keskiarvosta.

Testiaineen pitoisuus ei ylitä sen vesiliukoisuusrajaa ottaen huomioon vaikutuksen, joka testivedellä voi olla tosiasialliseen liukoisuuteen ([1]).

Kuolleisuus tai muut haittavaikutukset tai sairaudet sekä vertailu- että käsittelyryhmän kaloissa on alle 10 prosenttia testin lopussa; jos koe kestää useita viikkoja tai kuukausia, kuolleisuuden tai muiden haittavaikutusten olisi oltava molemmissa ryhmissä alle 5 prosenttia kuukautta kohti, eikä se saisi kaikkiaan olla enemmän kuin 30 prosenttia. Merkittävä ero testi- ja vertailukalojen keskimääräisessä kasvussa saattaa olla merkki testiaineen toksisuudesta.

VERTAILUAINEET

Testimenettelyn tarkistamisessa (esimerkiksi silloin, kun laboratoriolla ei ole aiempaa kokemusta kyseisestä testistä tai testausolosuhteet ovat muuttuneet) on hyödyllistä käyttää vertailuaineita, joiden biokertyvyyspotentiaali tunnetaan ja joiden metaboloituminen tiedetään vähäiseksi.

([1]) Useammasta ainesosasta koostuvien aineiden, koostumukseltaan tuntemattomien tai vaihtelevien aineiden, kompleksin reaktiotuotteen tai biologisen materiaalin (UCVB) sekä seosten testauksessa sopiva altistuspitoisuus on määritettävä kunkin olennaisen ainesosan vesiliukoisuuden perusteella.

▼M7

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

Laitteistossa – tai missään sen osissa – ei saisi käyttää materiaaleja, jotka voivat liueta, sorboitua tai uuttua ja vaikuttaa kaloihin haitallisesti. Testeissä voidaan käyttää tavallisia laatikon- tai lieriönmuotoisia säiliöitä, jotka on tehty kemiallisesti inertistä aineesta ja jotka ovat täyttönopeuden perusteella kooltaan sopivia (ks. 43 kohta). Pehmeää muoviletkua pitäisi käyttää mahdollisimman vähän. Ennemminkin pitäisi käyttää politetrafluorieteenistä, ruostumattomasta teräksestä ja/tai lasista valmistettua putkea/letkua. Kokemus on osoittanut, että testiaineilla, joilla on korkea imeytymiskerroin, kuten synteettisillä pyretroideilla, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet pitäisi hävittää käytön jälkeen. On suositeltavaa altistaa testijärjestelmät tutkimuksessa käytettävälle testiainepitoisuudelle niin kauan kuin on tarpeen sen osoittamiseksi, että altistuspitoisuus pysyy stabiilina, ennen kuin testiorganismit syötetään niihin.

Vesi

Testissä käytetään yleensä luonnon vettä, jonka on oltava pilaantumatonta ja laadultaan tasaista. Synteettinen vesi (eli demineralisoitu vesi, johon on lisätty tunnettu määrä tiettyjä ravinteita) voi kuitenkin varmistaa tasalaatuisuuden paremmin ajan kuluessa. Laimennusvesi, joka sekoitetaan testiaineen kanssa ennen sen syöttämistä testiastiaan (ks. 30 kohta), pitäisi olla niin hyvälaatuista, että valitut kalalajit elävät siinä totuttamisvaiheen ja testin ajan ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä ilmenee mitään poikkeavaa. Olisi ihanteellista pystyä osoittamaan, että koelaji elää, kasvaa ja lisääntyy laimennusvedessä (esim. laboratoriokasvatuksessa tai koko sukupolven kierron käsittävässä toksisuustestissä). Laimennusvedestä on tiedettävä ainakin sen pH, kovuus, kiinteiden aineiden kokonaispitoisuus, orgaanisissa yhdisteissä olevan hiilen kokonaismäärä (TOC ([1])) ja mieluiten myös ammonium-ioni- ja nitriittipitoisuus sekä emäksisyys ja merieliöiden osalta suolapitoisuus. Kalojen hyvinvoinnille tärkeitä tekijöitä ei tunneta täysin, mutta lisäyksessä 2 annetaan suositeltavat enimmäispitoisuudet useille makean ja meriveden testivesien muuttujille.

Laimennusveden laadun on pysyttävä tasaisena testin ajan. Sen pH-arvo voi olla testin alkaessa 6,0–8,5, mutta vaihteluväli ei saa olla tietyn testin ajan suurempi kuin ± 0,5 pH-yksikköä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testiainetta) tai vaikuta haitallisesti kalakannan vointiin, näytteitä olisi otettava analysointia varten säännöllisin väliajoin ja vähintään testin alussa ja lopussa. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, ja SO_4^{2-}), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos laimennusveden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esimerkiksi kuuden kuukauden välein).

Luonnosta peräisin olevien hiukkasten samoin kuin orgaanisen hiilen kokonaismäärän laimennusvedessä olisi oltava mahdollisimman alhainen, jotta testiaine ei absorboituisi orgaaniseen aineeseen, mikä saattaisi vähentää sen biologista hyötyosuutta ja johtaa samalla siihen, että BCF arvioitaisiin liian pieneksi. Suurin hyväksyttävä arvo on 5 mg/l hiukkasille (kuiva-aine, joka ei läpäise 0,45 μm:n

([1]) TOC käsittää sekä hiukkasten muodostaman orgaanisen hiilen että liuenneen orgaanisen hiilen, eli TOC = POC + DOC.

▼M7

suodatinta) ja 2 mg/l orgaanisen hiilen kokonaismäärälle (ks. lisäys 2). Laimennusvesi on tarvittaessa suodatettava ennen käyttöä. Testattavista kaloista (ulosteista) ja ruoanjätteistä peräisin olevan orgaanisen hiilen määrän pitäisi olla testivedessä mahdollisimman alhainen (ks. 46 kohta).

Testiliuokset

Testiaineesta tehdään kantaliuos, jonka pitoisuus on sopiva. Kantaliuos valmistetaan mieluiten joko sekoittamalla tai ravistelemalla testiaine laimennusveteen. Joissakin tapauksissa voi olla parempi käyttää kiinteän faasin desorptioannostelujärjestelmää. Liuottimien ja dispergointiaineiden (liuotusapuaineiden) käyttöä ei yleensä suositella (ks. (25)). Kyseisten aineiden käyttö voi kuitenkin joskus olla hyväksyttävää riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi, mutta niiden käyttö pitää kaikin tavoin pyrkiä pitämään mahdollisimman vähäisenä eikä niiden kriittistä misellipitoisuutta pitäisi ylittää (tarvittavilta osin). Hyväksyttäviä liuottimia ovat asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Dispergointiaineista käytössä ovat olleet Tween 80, 0,01-prosenttinen metyyliselluloosa ja HCO-40. Lopullisen testiaineen liuotinpitoisuuden pitäisi olla sama kaikissa käsittelyissä (riippumatta testiaineen pitoisuudesta), eikä sen pitäisi ylittää kyseiselle liuottimille määritettyä toksisuuden kynnysarvoa testiolosuhteissa. Suurin sallittu pitoisuus on 100 mg/l (tai 0,1 ml/l). On epätodennäköistä, että liuottimen pitoisuus muuttaisi testiaineen liuennutta maksimipitoisuutta väliaineessa, kun se on 100 mg/l (25). Liuottimen (samoin kuin testiaineen) osuus orgaanisen hiilen kokonaismäärästä testivedessä on tunnettava. Orgaanisen hiilen pitoisuus testiastioissa ei saa missään testivaiheessa ylittää testiaineesta ja mahdollisesti käytetystä liuotusaineesta tai liuotinapuaineesta ([1]) peräisin olevaa pitoisuutta yli 10 milligrammalla litraa kohti (± 20 prosenttia). Orgaanisen aineksen pitoisuus voi vaikuttaa merkittävästi siihen, minkä verran testiainetta liukenee vapaasti kaloilla tehtävän läpivirtaustestin aikana. Tämä koskee etenkin erittäin lipofiilisia aineita. Kiinteäfaasiuuton (ks. 60 kohta) avulla voidaan saada tärkeää tietoa sitoutuneiden ja vapaasti liuenneiden yhdisteiden suhteesta. Viimeksi mainitun katsotaan osoittavan aineen biologisen hyötyosuuden. Testiaineen pitoisuuden pitäisi olla väliaineessa testiaineen liukoisuuden raja-arvoa alhaisempi riippumatta siitä, käytetäänkö testissä liuotinta tai liuotusapuainetta. Nopeasti biohajoavia liuottimia käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa läpivirtaustesteissä ongelmia bakteerikasvuston takia. Jos kantaliuosta ei voida valmistaa ilman liuotusapuainetta, on mietittävä, onko vesialtistustutkimus todella parempi vaihtoehto kuin ravinnon välityksellä tehtävää altistus.

Läpivirtaustestissä on käytettävä järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää), joka annostelee ja laimentaa jatkuvasti testiaineen kantaliuosta, tai kiinteän faasin desorptioannostelujärjestelmää testipitoisuuksien annostelemiseksi testikammioihin. Testikammioiden veden pitäisi vaihtua mielellään ainakin viisi kertaa vuorokaudessa. Läpivirtausmalli on paras, mutta jos sitä ei voida käyttää (jos se esimerkiksi vaikuttaa haitallisesti testiorganismeihin), voidaan käyttää puolistaattista järjestelmää, mikäli validiteettiperusteet täyttyvät (ks. 24 kohta). Kantaliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava sekä 48 tuntia ennen testiä että vähintään kerran päivässä testin aikana. Tämän tarkistuksen yhteydessä mitataan myös läpivirtausnopeus kaikissa testikammioissa ja varmistetaan, ettei se vaihtele yli 20:tä prosenttia yhdessä kammiossa tai kammioiden välillä.

([1]) Liuottimen tai liuotusapuaineen käyttöä ei yleensä suositella,. Jos niitä kuitenkin käytetään, niistä peräisin oleva orgaaninen hiili on laskettava yhteen testiaineesta peräisin olevan orgaanisen hiilen kanssa, jotta voidaan arvioida orgaanisen hiilen pitoisuus testiastioissa.

▼M7

Lajin valinta

Tärkeitä perusteita lajin valinnassa ovat se, että lajia on helposti saatavilla, se, että lajia voi saada sopivan kokoisina yksilöinä, sekä se, että lajia voidaan helposti ylläpitää laboratoriossa. Muita perusteita kalalajin valitsemiselle voivat olla virkistyskäyttö, kaupallinen tai ekologinen merkitys sekä vertailukelpoinen herkkyys, onnistunut käyttö aikaisemmin ym. Suositeltavat testilajit luetellaan lisäyksessä 3. Muita lajeja voidaan käyttää, mutta testiprosessia on mahdollisesti mukautettava sopivien testiolosuhteiden varmistamiseksi. Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen. Kun käytetään pienempiä kalalajeja, tasapainotila saavutetaan yleensä nopeammin. Tällöin saatetaan kuitenkin tarvita enemmän kaloja (suurempi otanta), jotta rasvapitoisuus ja testiaineen pitoisuus kaloissa voitaisiin määrittää asianmukaisesti. On myös mahdollista, että erot nuorten ja vanhojen kalojen soluhengitystasossa ja aineenvaihdunnassa estävät eri testeissä ja eri lajeilla saatujen tulosten vertaamisen. On huomattava, että kalalajien testaaminen nopean kasvun vaiheessa (nuorena) voi vaikeuttaa testitulosten tulkintaa.

Kalojen hoito (veden ja ravinnon välityksellä tehtävissä altistuksissa)

Kalojen kantapopulaatiota pitäisi totuttaa veteen vähintään kahden viikon ajan (ks. 28 kohta) testauslämpötilassa ja kaloja ruokkia riittävästi (ks. 45 kohta). Sekä veden että ravinnon pitäisi olla samantyyppistä kuin varsinaisessa testissä.

Kuolleiden kalojen määrä kirjataan 48 tunnin alkutotuttelun jälkeen, jonka jälkeen noudatetaan seuraavia periaatteita:

— Jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa, koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on 5–10 prosenttia populaatiosta, kaloja totutetaan vielä seitsemän päivää. Jos kuolleisuus on yli 5 prosenttia toisen seitsemän päivän jakson aikana, koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on alle 5 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa, erä hyväksytään.

Testeissä käytettävissä kaloissa ei saa olla havaittavia tauteja tai poikkeavuuksia. Kuolleet kalat on hävitettävä. Kaloille ei saisi antaa mitään hoitoa sairauden takia testiä edeltävien kahden viikon aikana eikä testin aikana.

TESTIN SUORITTAMINEN

Alustava testi

Voi olla hyvä tehdä esikoe lopullisen testin olosuhteiden optimoimiseksi. Näin voidaan esimerkiksi valita testiaineen pitoisuus (pitoisuudet), määrittää kertymä- ja poistumavaiheen kesto tai arvioida, miten kattava testin pitäisi olla. Alustava testi on suunniteltava siten, että se antaa tarvittavat tiedot. Näin voidaan arvioida, riittääkö minimitesti BCF:n määrittämiseksi vai tarvitaanko kattava tutkimus (ks. 83–95 kohta, joissa käsitellään minimoitua testiä).

Altistusolosuhteet

Kertymävaiheen kesto

Kertymävaiheen kesto voidaan ennustaa käytännön kokemuksen perusteella (esim. rakenteeltaan samankaltaisia aineita koskevien aiempien tutkimusten tai akkumulaatiotutkimusten perusteella) tai tietyistä kokemusperäisistä suhteista hyödyntämällä joko testiaineen vesiliukoisuutta tai oktanoli-vesi-jakaantumiskerrointa koskevia tietoja (edellyttäen, että kertymä noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa, ks. liite 5).

▼M7

Kertymävaiheen on kestettävä 28 vuorokautta, paitsi jos voidaan osoittaa, että tasapainotila on saavutettu aikaisemmin (ks. lisäys 1, määritelmät ja yksiköt). Tasapainotila saavutetaan kalassa esiintyvän testiaineen määrää (C_t) ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä C_t-määritystä ovat ± 20 prosenttia toisiinsa verrattuna eikä C_t ole kasvanut merkittävästi ensimmäisen ja viimeisen perättäisen määrityksen välisenä aikana. Yhdistettyjä näytteitä määritettäessä vaaditaan vähintään neljä perättäistä määritystä. Kun testataan aineita, joiden kertyminen kudoksiin tapahtuu hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta. Jos tasapainotilaa ei ole saavutettu 28 vuorokauden kuluessa, voidaan joko laskea BCF soveltamalla kineettistä lähestymistapaa, joka ei edellytä tasapainotilan saavuttamista, tai jatkaa kertymäaikaa ja tehdä mittauksia niin kauan, että tasapainotila saavutetaan, tai kun on kulunut 60 vuorokautta riippuen siitä, kumpi tapahtuu aiemmin. Testiaineen pitoisuuden on myös oltava kalassa riittävän korkea kertymävaiheen lopussa, jotta k_2-arvo voidaan arvioida luotettavasti poistumavaiheessa. Jos kertymä ei ole 28 vuorokauden jälkeen merkittävä, testi voidaan lopettaa.

Poistumavaiheen kesto

Ensimmäisen asteen kinetiikkaa noudattavilla aineilla puolet kertymävaiheesta riittää tavallisesti siihen, että kalaan kertynyt aine vähenee riittävästi (esim. 95 prosenttia) (ks. liite 5, arviointia koskeva selitys). Jos 95 prosentin vähenemiseen pääseminen kestää erittäin kauan, esimerkiksi yli kaksi kertaa kertymävaiheen normaalin kestoajan (eli yli 56 vuorokautta), voidaan hyväksyä lyhyempi aika (esim. kunnes testiaineen pitoisuus on alle 10 prosenttia tasapainotilasta). Jos aineen kertymä ja poistuma ovat monimutkaisempia kuin yhden osaston mallissa, jota voidaan kuvata ensimmäisen asteen kinetiikalla, poistumavaiheen on kuitenkin mahdollisesti oltava pidempi. Jos aineen kinetiikan havaitaan ja/tai ennakoidaan olevan monimutkaisempi, on suositeltavaa pyytää neuvoa biostatistiikan ja/tai farmakokinetiikan asiantuntijalta testiolosuhteiden soveltuvuuden varmistamiseksi. Koska poistumavaihe pitenee, näytteenotossa käytettävien kalojen määrä voi aiheuttaa rajoituksia ja kalojen väliset kasvuerot saattavat vaikuttaa tuloksiin. Vaiheen kestoon vaikuttaa myös se, kuinka kauan testiaineen pitoisuus kalassa pysyy kvantifioinnin analyysirajan yläpuolella.

Testikalojen määrä

Kalojen lukumäärä jokaista testipitoisuutta kohti valitaan siten, että käytettävissä on vähintään neljä kalaa näytteenottopistettä kohti. Kalanäytteet voidaan yhdistää, jos yksittäisten kalojen analysointi ei ole mahdollista. Jos käyrän sovitus (ja siitä johdetut muuttujat) on tarkoitus tehdä erittäin tarkasti tai edellytetään metabolismitutkimusten tekemistä (esimerkiksi metaboliittien ja perusaineen erottelemiseksi radioaktiivisia merkkiaineita käytettäessä), kaloja on oltava enemmän kutakin näytteenottopistettä kohti. Rasvapitoisuus olisi määritettävä samasta biologisesta aineksesta, jota käytetään testiaineen pitoisuuden määrittämisessä. Jos tämä ei ole mahdollista, kaloja tarvitaan mahdollisesti enemmän (ks. 56 ja 57 kohta).

Jos käytetään täysikasvuisia (sukukypsiä) kaloja, kalojen ei pitäisi olla ennen testiä tai sen aikana kutuvaiheessa tai hiljattain kutenut. Lisäksi on ilmoitettava, käytetäänkö testissä koiraita, naaraita vai molempia. Jos käytetään molempia, sukupuolten väliset erot kasvussa rasvapitoisuudessa on kirjattava ei-merkitseviksi ennen altistuksen aloittamista, etenkin jos etukäteen arvioidaan, että koiras- ja naaraskalojen näytteet on yhdistettävä sen varmistamiseksi, että aineen pitoisuudet ja/tai rasvapitoisuus voidaan havaita.

▼M7

Jokaiseen testiin on valittava samanpainoisia kaloja, jolloin pienimpien on painettava vähintään kaksi kolmasosaa suurimpien painosta. Kaikkien pitäisi olla samaa vuosiluokkaa ja peräisin samasta lähteestä. Koska paino ja ikä saattavat joskus vaikuttaa merkittävästi BCF-arvoihin (12), ne on kirjattava tarkasti. Osa näytekaloista on suositeltavaa punnita juuri ennen testin aloittamista keskipainon arvioimiseksi (ks. 61 kohta).

Täyttö

Vesimäärän pitäisi olla suuri suhteessa kalojen määrään, jotta testattavan yhdisteen pitoisuus vedessä laskee mahdollisimman vähän, kun kalat lisätään kammioon testin alussa, eikä liuenneen hapen pitoisuus ei laske. On tärkeää, ettei kaloja lisätä kammioon liian nopeasti. Joka tapauksessa kalojen täyttönopeudeksi suositellaan normaalisti 0,1-1,0 g kalaa (tuorepaino) litraa vettä kohti vuorokaudessa. Kalat voidaan lisätä veteen nopeammin, jos osoitetaan, että testiaineen pitoisuus voidaan pitää ± 20 prosentin rajoissa eikä liuenneen hapen pitoisuus laske alemmaksi kuin 60 prosenttia kyllästyneisyysarvosta (ks. 24 kohta).

Sopivaa täyttötapaa valittaessa on otettava huomioon kalalajin luonnollinen elinympäristö. Esimerkiksi pohjakalat voivat vaatia samaa vesitilavuutta kohti suuremman pohjapinta-alan kuin pelagiset kalalajit.

Ruokinta

Totuttamisvaiheessa ja testin aikana kalojen ravinnossa noudatetaan ruokavaliota, jonka rasvapitoisuus ja valkuaisaineiden kokonaispitoisuus tunnetaan. Ravintoa annetaan riittävästi niin, että kalat pysyvät terveinä ja niiden paino ei pysy samana (pieni kasvu sallitaan). Totuttamisvaiheessa ja testin aikana kaloille päivittäin annettavan ravinnon määrä riippuu valitusta lajista, koeoloista ja ravinnon kaloripitoisuudesta (esimerkiksi kirjolohella päivittäinen määrä on noin 1–2 prosenttia kalan painosta). Ruokkimistaajuus määritetään sellaiseksi, etteivät kalat kasva nopeasti eikä niiden rasvapitoisuus kohoa merkittävästi. Jotta ruokkimistaajuus pysyisi samana, ravinnon määrä pitäisi laskea tarvittaessa uudelleen esimerkiksi kerran viikossa. Tässä laskutoimituksessa kussakin testikammiossa olevien kalojen paino voidaan arvioida viimeksi kyseisestä kammiosta näytteeksi otetun kalan painosta. Kammiossa olevia kaloja ei punnita.

Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet olisi poistettava testikammioista päivittäin hieman (0,5–1 tuntia) ruokinnan jälkeen. Kammiot olisi pidettävä mahdollisimman puhtaina koko testin ajan, jotta orgaanisen aineksen pitoisuus pysyy mahdollisimman alhaisena (ks. 29 kohta), koska orgaaninen hiili saattaa vaikuttaa haitallisesti testiaineen biologiseen hyötyosuuteen (12).

Koska monet rehut on valmistettu kalajauhoista, on varmistettava, ettei rehu vaikuta testituloksiin tai aiheuta haittavaikutuksia esimerkiksi sen takia, että se sisältää torjunta-aineita, raskasmetalleja ja/tai testiainetta (tai niiden jäämiä).

Valo ja lämpötila

Suositeltava valoisa aika on 12–16 tuntia. Lämpötilan pitäisi olla kalalajille sopiva (vaihtelu enintään ± 2 °C) (ks. lisäys 3). Valaistuksen tyyppi ja ominaisuudet on tunnettava. Testiaineen mahdollinen muuntuminen tutkimuksen säteilyolosuhteissa on otettava huomioon. Valaistusolosuhteiden olisi oltava asianmukaiset, ja kalojen altistumista epäluonnolliselle valolle on vältettävä. Joskus voi olla tarpeen suodattaa pois alle 290 nm:n UV-säteily.

▼M7

Testipitoisuudet

Testi on alun perin suunniteltu polaarittomille orgaanisille aineille. Kyseisillä aineilla kalojen altistus yhdelle pitoisuudelle arvioidaan riittäväksi, koska pitoisuusvaikutuksia ei ole odotettavissa. Sovellettavassa säädöskehyksessä saatetaan kuitenkin edellyttää kahta pitoisuutta. Jos testataan kyseiseen tyyppiin kuulumattomia aineita tai tiedossa on viitteitä mahdollisesta pitoisuusriippuvuudesta, testi on suoritettava kahdella tai useammalla pitoisuudella. Jos testataan vain yhtä pitoisuutta, yhden pitoisuuden käyttö on perusteltava (ks. 79 kohta). Testatun pitoisuuden pitäisi myös olla niin alhainen kuin käytännön tai tekniikan puolesta on mahdollista (eli sen ei pidä olla lähellä liukoisuuden raja-arvoa).

Joissakin tapauksissa voidaan ennakoida, että aineen biokertyvyys on riippuvainen vesipitoisuudesta (esimerkiksi metalleilla, joiden kertymistä kaloihin voidaan säännellä ainakin osittain). Tällaisissa tapauksissa on tarpeen testata vähintään kaksi, mutta mieluiten useampi sellainen pitoisuus (ks. 49 kohta), jotka ovat ympäristön kannalta merkityksellisiä. Myös aineilla, joilla testatun pitoisuuden on oltava käytännön syistä lähellä liukoisuuden raja-arvoa, suositellaan vähintään kahden pitoisuuden testaamista, koska siten voidaan saada käsitys altistuspitoisuuksien luotettavuudesta. Testipitoisuudet pitäisi valita siten, että testeihin sisällytetään sekä ympäristön kannalta realistinen pitoisuus että tehtävän arvioinnin kannalta merkityksellinen pitoisuus.

Testiaineen pitoisuus pitäisi valita siten, että se on alhaisempi kuin krooninen vaikutustaso tai yhden prosentin aineen akuutista asymptoottisesta LC_{50}-arvosta. Pitoisuuden on myös oltava ympäristön kannalta merkityksellinen ja suuruusluokaltaan vähintään yhden asteen korkeampi kuin aineen kvantifiointiraja vedessä kyseistä analyysimenetelmää käytettäessä. Korkein sallittu testipitoisuus voidaan myös määrittää jakamalla akuutti 96 tunnin LC_{50}-arvo asianmukaisella akuutti/krooninen-suhteella (tarkoituksenmukaiset suhteet joillekin aineille ovat noin 3, mutta muutamassa tapauksessa yli 100). Jos käytetään toista pitoisuutta, sen eron edelliseen pitoisuuteen on oltava kymmenkertainen. Jos tämä ei ole mahdollista toksisuuskriteereiden takia (kyseiset perusteet rajoittavat korkeamman testipitoisuuden käyttöä) tai määritysrajan takia (kyseinen raja estää alhaisemman testipitoisuuden käytön), voidaan käyttää pienempää kerrointa kuin kymmenen. Tällöin pitäisi myös harkita radioaktiivisen testiaineen käyttöä (sen on oltava mahdollisimman puhdasta, mieluiten yli 98 prosenttista). On varmistettava, ettei yksikään käytetty pitoisuus alita testiaineen liukoisuusrajaa väliaineessa.

Kontrollit

Laimennusvesi tarkastetaan kerran ja tarvittaessa (ks. 30 ja 31 kohta) testisarjan lisäksi tehdään yksi liuotinkontrolli.

Veden laatua koskevien mittausten taajuus

Testin aikana on mitattava liuennut happi, TOC (orgaanisen hiilen kokonaismäärä), pH ja lämpötila kaikista testi- ja kontrolliastioista. Veden kokonaiskovuus ja suolapitoisuus (jos sillä on merkitystä) mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta. Jos testattavia pitoisuuksia on kaksi tai useampi, kyseiset muuttujat mitataan suuremmasta (tai suurimmasta) pitoisuudesta. Liuennut happi ja suolapitoisuus on mitattava (mikäli aiheellista) vähintään kolme kertaa kertymävaiheessa – sen alussa, keski- ja loppuvaiheessa – sekä kerran viikossa poistumavaiheen aikana. TOC on mitattava testin alussa (24 ja 48 tuntia ennen kertymävaiheen alkua), ennen kalojen lisäämistä astiaan ja vähintään kerran viikossa sekä kertymä- että poistumisvaiheen aikana. Lämpötila on mitattava ja kirjattava ylös joka päivä, pH kunkin vaiheen alussa ja lopussa sekä kovuus kerran testin aikana. Lämpötilaa olisi seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä astiassa.

▼M7

Näytteenotto ja mittaukset kaloista ja vedestä

Näytteenottoaikataulu

Testiaineen pitoisuuden määrittämiseen käytetyistä testikammioista olisi otettava vesinäyte ennen kalojen lisäystä sekä kertymä- ja poistumisvaiheen aikana. Vesinäyte pitäisi ottaa ennen ruokintaa kalanäytteiden oton yhteydessä. Tiheämpi näytteenotto voi olla hyödyllistä sen varmistamiseksi, että pitoisuudet pysyvät stabiileina kalojen lisäämisen jälkeen. Kertymävaiheen aikana pitäisi määrittää testiaineen pitoisuudet sen tarkistamiseksi, että hyväksyttävyysperusteet täyttyvät (24 kohta). Jos poistumavaiheen alussa tehtävät vesinäyteanalyysit osoittavat, ettei testiainetta havaita, tätä voidaan käyttää perusteena sille, ettei testiaineen jäämiä mitata testi- ja kontrollivedestä poistumavaiheen loppuaikana.

Kaloista pitäisi ottaa näyte ainakin viidesti kertymävaiheen aikana ja vähintään neljästi poistumavaiheen aikana testiaineen mittaamiseksi. Koska joskus voi olla vaikea laskea riittävän tarkkaa arviota BCF-arvosta tämän näytemäärän perusteella (erityisesti jos näyttää siltä, että kertymä ja poistuma noudattavat muuta kuin yksinkertaista ensimmäisen asteen kinetiikkaa), tiheämpi näytteenotto voi olla suositeltavaa molemmissa vaiheissa (ks. lisäys 4).

Rasvapitoisuus pitäisi määrittää siitä biologisesta aineksesta, jota käytetään testiaineen pitoisuuden määrittämiseen, ainakin kertymävaiheen alussa ja lopussa sekä poistumavaiheen lopussa. Jos tämä ei ole mahdollista, pitäisi ottaa näyte vähintään kolmesta kalayksilöstä rasvapitoisuuden määrittämiseksi jokaisena kolmena ajankohtana. Kalojen määrä kussakin säiliössä kokeen alkaessa pitäisi määrittää tämän mukaisesti ([1]). Jos vertailukaloissa (eli kantapopulaation kaloissa) ei havaita merkittävää määrää testiainetta, vertailukaloista voidaan vaihtoehtoisesti määrittää ainoastaan rasvapitoisuus ja testiaineen pitoisuus (sekä siihen liittyvä kertymävakio ja BCF-arvot) voidaan korjata vertailuryhmän testin aikaisen rasvapitoisuuden mukaisesti ([2]).

Kuolleista tai sairastuneista kaloista ei pitäisi määrittää testiaineen pitoisuutta eikä rasvapitoisuutta.

Hyväksyttävästä näytteenottoaikataulusta on esimerkki lisäyksessä 4. Muunlaiset aikataulut voidaan laskea helposti käyttäen muita oletettuja K_{OW}-arvoja 95 prosentin kertymään tarvittavan altistusajan laskemiseksi (ks. laskentaperusteet lisäyksessä 5).

Näytteenottoa pitäisi jatkaa kertymävaiheessa tasapainotilan saavuttamiseen asti (ks. lisäys 1, määritelmät ja yksiköt) tai kun kertymävaihe päättyy (28 tai 60 vuorokauden kuluttua, ks. 37 ja 38 kohta). Ennen poistumavaiheen aloittamista kalat pitäisi siirtää puhtaisiin astioihin.

Näytteenotto ja näytteiden valmistelu

Vesinäytteet otetaan määritystä varten esimerkiksi lapolla inertin putken/letkun kautta testikammion keskivaiheilla olevasta kohdasta. Suodattamalla tai sentrifugoimalla ei aina pystytä erottamaan testiaineen biologisesti hyödyntämiskelvotonta osaa biologisesti hyödynnettävästä osasta. Jos käytetään erotustekniikkaa,

([1]) Jos rasvapitoisuutta ja testiainetta ei määritetä samoista kaloista, analysoitavien kalojen pitäisi ainakin olla saman painoisia ja samaa sukupuolta (jos sukupuolella on merkitystä).

([2]) Tätä vaihtoehtoa voidaan soveltaa vain siinä tapauksessa, että kalojen määrä on kaikissa testiryhmässä sama, kaloja poistetaan samoin perustein ja niitä ruokitaan samalla tavalla. Näin voidaan varmistaa, että kalojen kasvu on samanlaista kaikissa testiryhmissä, jos testattu pitoisuus jää toksisuusalueen alle. Jos kasvu on samanlaista, myös rasvapitoisuuden odotetaan olevan sama. Erilainen kasvu vertailuryhmässä on viite aineen vaikutuksesta eikä tutkimus olisi validi.

▼M7

valittu tekniikka on aina perusteltava tai validoitava testiraportissa biologiseen hyötyosuuteen liittyvien hankaluuksien takia (25). Erittäin hydrofobisilla aineilla (eli aineilla, joiden log K_{OW} on > 5) (12) (26), jotka saattavat adsorboitua suodatusmatriisiin tai sentrifugointisäiliöihin, näytteitä ei pitäisi käsitellä edellä mainituilla tavoilla. Sen sijaan on huolehdittava siitä, että säiliöt pidetään mahdollisimman puhtaina (ks. 46 kohta), ja orgaanisen hiilen kokonaismäärää on seurattava sekä kertymä- että poistumavaiheessa (ks. 53 kohta). Biologisen hyötyosuuden pienenemiseen liittyvien mahdollisten ongelmien välttämiseksi heikosti liukenevien ja erittäin hydrofobisten aineiden näytteenotossa voidaan käyttää kiinteäfaasimikrouuttoa.

Näytteenotossa käytetyt kalat pitäisi lopettaa välittömästi sopivinta ja inhimillisintä menetelmää käyttäen (kokonaisilla kaloilla tehtävissä kokeissa kalat pitäisi näytteenoton jälkeen vain huuhdella vedellä (ks. 28 kohta) ja kuivata taputtamalla). Kalat punnitaan ja niiltä mitataan kokonaispituus ([1]). Jokaisella näytteeksi otetulla kalalla mitattu paino ja pituus pitäisi liittää niissä määritettyyn ainepitoisuuteen (ja tarvittaessa myös rasvapitoisuuteen) esimerkiksi käyttämällä kustakin kalasta yksilöllistä tunnistetta.

On suositeltavaa tehdä määritykset kaloista ja vedestä heti näytteenoton jälkeen, jotta ei tapahtuisi hajoamista tai muuta ainehävikkiä ja jotta voidaan laskea likimääräiset kertymä- ja poistumavakiot testin edetessä. Kun näytteet määritetään heti, voidaan myös nähdä nopeasti, milloin tasapainotila on saavutettu.

Jos näytteitä ei voi määrittää heti, ne pitäisi säilyttää asianmukaisella tavalla. Ennen testin aloittamista on hankittava tietoja testiaineen oikeasta säilytystavasta, joka voi olla esimerkiksi pakastaminen, säilyttäminen 4 °C:ssa, uuttaminen jne. Säilytysaika pitää valita siten, ettei aineen laatu heikkene varastoinnin aikana.

Analyysimenetelmän laatu

Koska koko menetelmä riippuu olennaisesti testiaineen määritykseen käytettävän menetelmän tarkkuudesta, täsmällisyydestä ja herkkyydestä, on todettava kokeellisesti, että kyseisessä menetelmässä aineen määrityksen tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus samoin kuin testiaineen saanto sekä vedestä että kaloista ovat tyydyttäviä. Tämä pitäisi tehdä alustavien testien yhteydessä. On myös tarkastettava, ettei testiainetta ole laimennukseen käytetyssä vedessä mitattavia määriä. Testissä määritetyt testiaineen pitoisuusarvot vedessä ja kaloissa on tarvittaessa korjattava saantoja ja kontrollien tausta-arvoja varten. Kala- ja vesinäytteitä pitäisi käsitellä koko ajan siten, että kontaminoituminen ja hävikki (joka voi johtua esimerkiksi adsorboitumisesta näytteenottolaitteistoon) ovat mahdollisimman pienet.

Kalanäytteiden analysointi

Jos testissä käytetään radioaktiivisia merkkiaineita, on mahdollista määrittää kokonaisradioaktiivisuus (ts. perusaine ja siitä syntyneet metaboliitit) tai näytteet voidaan puhdistaa siten, että perusaine on mahdollista määrittää erikseen. Jos BCF-arvo määritetään perusaineen perusteella, merkittävien metaboliittien ominaisuudet pitäisi määritellä ainakin kertymävaiheen lopussa (ks. 6 kohta). Merkittäviä metaboliitteja ovat ne, joiden osuus on ≥ 10 prosenttia kalan kudoksissa havaittavista kokonaisjäämistä, joiden osuus on ≥ 5 prosenttia kahdessa perättäisessä näytteenottopisteessä, joiden osuus kasvaa koko kertymävaiheen ajan tai jotka tiedetään myrkyllisiksi. Jos koko kalan BCF-arvo radioaktiivisten jäämien

([1]) Painon lisäksi pitäisi kirjata kokonaispituus, koska testin aikaisen pituuskasvun nopeutta vertaamalla saadaan hyödyllistä tietoa siitä, onko aineella ollut haittavaikutuksia.

▼M7

kokonaismääränä ilmaistuna on ≥ 500, voi olla suositeltavaa – ja tiettyihin luokkiin kuuluvien aineiden, kuten torjunta-aineiden tapauksessa erittäin suositeltavaa – tunnistaa ja kvantifioida merkitykselliset metaboliitit. Jotkut sääntelyviranomaiset myös edellyttävät kyseisten metaboliittien kvantifioimista. Jos kalan kudoksista tunnistettujen ja kvantifioitujen hajoamistuotteiden osuus on ≥ 10 prosenttia radioaktiivisten jäämien kokonaismäärästä, on suositeltavaa tunnistaa ja kvantifioida hajoamistuotteet myös testivedestä. Jos tämä ei ole mahdollista, syyt on selvitettävä testiraportissa.

Testiaineen pitoisuus on tavallisesti määritettävä kustakin yksittäisestä punnitusta kalasta. Jos tämä ei ole mahdollista, näytteet voidaan yhdistää kullakin näytteenottokerralla, mutta näytteiden yhdistäminen rajoittaa kyseisiin tietoihin sovellettavia tilastomenettelyjä. Näin ollen testissä pitäisi varmistaa, että kalojen määrä vastaa haluttua yhdistämistä, tilastomenettelyä ja voimaa. Viitteitä (27) ja (28) voi käyttää johdantona olennaisiin yhdistämismenettelyihin.

BCF pitäisi ilmoittaa normalisoituna viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti (kalan tuorepainoon verrattuna) suoraan tutkimuksesta johdettavan arvon lisäksi (ks. 21 kohta), paitsi jos voidaan esittää, ettei testiaine keräänny ensisijaisesti rasvoihin. Jos mahdollista, kalan rasvapitoisuus olisi määritettävä jokaisella näytteenottokerralla ja mieluiten samasta uutteesta, josta testiaine määritetään, koska rasvat täytyy usein poistaa uutteesta ennen kuin sitä voi käyttää kromatografisessa analyysissa. Testiaineiden analysointi edellyttää kuitenkin usein erityisiä uuttomenetelmiä, jotka saattavat olla ristiriidassa rasvapitoisuuden määrittämiseen käytettävien testimenetelmien kanssa. Tässä tapauksessa (niin kauan kuin käytettävissä ei ole sopivia non-destruktiivisia menetelmiä) kalojen rasvapitoisuuden määrittämisessä on suositeltavaa soveltaa erilaista strategiaa (ks. 56 kohta). Sopivia menetelmiä pitäisi käyttää rasvapitoisuuden määrittämiseksi (20). Kloroformi-metanoliuuttoa (29) voidaan suositella standardimenetelmänä (30), mutta vaihtoehtoisena menetelmänä suositellaan Smedesin menetelmää (31). Jälkimmäinen on uuttomenetelmänä yhtä tehokas, ja se on myös erittäin tarkka, siinä käytetään vähemmän myrkyllisiä orgaanisia liuottimia ja se on myös helppo toteuttaa. Muitakin tarkkuudeltaan suositeltuihin menetelmiin verrattavia menetelmiä voi käyttää, jos käyttö perustellaan asianmukaisesti. Käytetystä menetelmästä on tärkeää toimittaa yksityiskohtaiset tiedot.

Kalojen kasvun mittaaminen

Testin alussa on punnittava erikseen 5–10 kantapopulaation kalaa ja mitattava niiden kokonaispituus. Samoja kaloja voidaan käyttää rasvapitoisuuden määrittämiseen (ks. 56 kohta). Kunkin näytteenottokerran yhteydessä näytteiksi otetuilta testi- ja vertailuryhmien kaloilta on mitattava paino ja pituus ennen kemikaali- ja rasvapitoisuuden määrittämistä. Näytteiksi otettujen kalojen mittoja voidaan käyttää testi- ja kontrollisäiliöihin jäävien kalojen painon ja pituuden arvioinnissa (ks. 45 kohta).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Testiaineen kertymäkäyrä saadaan esittämällä kalassa tai kalan pinnalla (tai määritellyissä kudoksissa) kertymävaiheen aikana olevan aineen pitoisuus ajan funktiona aritmeettisella asteikolla. Jos käyrä osoittaa tasapainotilaa (eli käyrä on suunnilleen asymptoottinen aika-akselin kanssa), tasapainotilan BCF (BCF_{SS}) lasketaan seuraavan kaavan mukaisesti:

$$\frac{C_f \, tasapainotilassa(keskiarvo)}{C_w \, tasapainotilassa(keskiarvo)}$$

▼M7

Kalan kasvu voi vaikuttaa C_f-arvon kehitykseen (ks. 72 ja 73 kohta). Ajan kuluessa tapahtuva vaihtelu vaikuttaa altistuspitoisuuden keskiarvoon (C_w). On odotettavissa, että aikapainotettu keskipitoisuus on bioakkumulaatiotutkimuksissa merkityksellisempi ja täsmällisempi siinäkin tapauksessa, että vaihtelu pysyy asianmukaisella hyväksyttävyysalueella (ks. 24 kohta). Aikapainotettu keskimääräinen pitoisuus vedessä (TWA) voidaan laskea siten kuin esitetään lisäyksen 5 kohdassa 1.

Kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) pitäisi määrittää kahden ensimmäisen asteen kineettisen vakion suhteena (k_1/k_2). Vakiot k_1 ja k_2 sekä BCF_K voidaan määrittää sovittamalla kertymä- ja poistumavaihe samanaikaisesti. Vakiot k_1 ja k_2 voidaan vaihtoehtoisesti määrittää erikseen (ks. kyseisten menetelmien kuvaukset ja vertailu lisäyksessä 5). Poistumavakio (k_2) voidaan joutua korjaamaan kasvun aiheuttaman liukenemisen huomioon ottamiseksi (ks. 72 ja 73 kohta). Jos kertymä- ja/tai poistumakäyrä ei selvästikään noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, pitäisi käyttää monimutkaisempia malleja (ks. lisäyksessä 5 olevat viitteet ja pyydä neuvoa biostatistiikan ja/tai farmakokinetiikan asiantuntijoilta).

Tiedot kalojen painosta ja pituudesta

Yksittäisten kalojen tuorepainot ja kokonaispituudet kaikilla näytteenottoväleillä taulukoidaan erikseen sekä testi- että vertailuryhmässä kertymävaiheessa (koskee myös kantapopulaatiota kertymävaiheen alkaessa) sekä poistumavaiheessa. Kultakin näytteeksi otetulta kalalta mitattu paino ja pituus pitäisi liittää niissä määritettyyn kemikaalipitoisuuteen esimerkiksi käyttämällä kustakin kalasta yksilöllistä tunnistetta. Paino on paras kasvumittari kineettisten BCF-arvojen korjaamiseksi kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan (ks. 73 kohta ja lisäyksessä 5 esitetty menetelmä tietojen korjaamiseksi kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan).

Kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan tehtävät korjaukset ja rasvapitoisuuden normalisointi

Poistumavaiheessa tapahtuva kasvu voi alentaa kaloissa mitattua kemikaalipitoisuutta, minkä johdosta yleinen poistumavakio (k_2) on suurempi kuin pelkistä poistoprosesseista (esim. hengitys, metabolismi ja ulostaminen) johtuva poistumavakio. Kineettiset biokertyvyystekijät pitäisi korjata kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan. Kasvu vaikuttaa myös BCF_{SS}-arvoon, mutta sen korjaamiseksi kasvun mukaan ei ole määritetty yleisesti hyväksyttyä menettelyä. Jos kasvu on merkittävää, pitäisi johtaa myös BCF_K, joka korjataan kasvun mukaan (BCF_{Kg}), koska se voi olla biokertyvyystekijän mittana merkittävämpi. Testikalojen rasvapitoisuus (joka liitetään vahvasti hydrofobisten aineiden bioakkumulaatioon) voi käytännössä vaihdella sen verran, että se on normalisoitava kalan vakiorasvapitoisuuden (5 prosenttia tuorepainosta) mukaisesti, jotta sekä kineettinen että tasapainotilan biokertyvyystekijä voidaan esittää tarkoituksenmukaisesti, paitsi jos voidaan olettaa, ettei testiaine keräänny ensisijaisesti rasvaan (esimerkiksi jotkut perfluoratut aineet saattavat sitoutua proteiineihin). Näitä laskutoimituksia koskevia yhtälöitä ja esimerkkejä esitellään lisäyksessä 5.

Kineettisen BCF:n korjaamiseksi kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan myös poistumavakiota pitäisi korjata kasvun mukaisesti. Kasvukorjattu poistumavakio (k_{2g}) lasketaan vähentämällä kasvuvakio (k_g, joka on saatu punnitustiedoista) yleisestä poistumavakiosta (k_2). Tämän jälkeen lasketaan kasvukorjattu kineettinen biokertyvyystekijä jakamalla kertymävakio (k_1) kasvukorjatulla poistumavakiolla (k_{2g}) (ks. liite 5). Joissakin tapauksissa tämä lähestymistapa aiheuttaa hankaluuksia. Esimerkiksi silloin, kun testataan hyvin hitaasti poistuvia aineita nopeasti kasvavissa kaloissa, johdettu k_{2g} voi olla hyvin pieni, joten kyseisissä

▼M7

kahdessa johtamisessa käytetyssä vakiossa piilevä virhe muuttuu kriittiseksi. Joissakin tapauksissa arvioitu *k*g voi olla suurempi kuin k_2. On olemassa vaihtoehtoinen lähestymistapa, joka ei edellytä korjaamista kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan. Siinä käytetään testiaineen massaa koskevia poistumatietoja kalakohtaisesti (kokonainen kala perusteena) sen sijaan, että testiaineen massaa koskevat tiedot suhteutettaisiin kalan massayksikköä (pitoisuutta) koskeviin tietoihin. Tämä voidaan tehdä helposti, koska kyseisessä testimenetelmässä kudoksissa havaitut pitoisuudet pitäisi liittää yksittäisten kalojen painoon. Tätä koskevaa yksinkertaista menettelyä kuvataan lisäyksessä 5. On huomattava, että k_2 pitää ilmoittaa myös vaihtoehtoista lähestymistapaa sovellettaessa.

Lisäksi pitäisi ilmoittaa kineettinen ja tasapainotilan biokertyvyystekijä kalojen viiden prosentin vakiorasvapitoisuuden (suhteessa tuorepainoon) mukaisesti, paitsi jos voidaan esittää, ettei testiaine keräänny ensisijaisesti rasvaan. Kaloissa mitattuja pitoisuuksia koskevat tiedot tai BCF normalisoidaan viiden prosentin rasvapitoisuuden ja todellisen (yksittäisen kalan) keskimääräisen rasvapitoisuuden (prosenttiosuus tuorepainosta) suhteen mukaisesti (ks. liite 5).

Jos samasta kalasta on määritetty kemikaali- ja rasvapitoisuus, yksittäisen kalan normalisoitua rasvapitoisuutta pitäisi käyttää rasvapitoisuuden mukaan normalisoidun BCF:n laskemisessa. Jos vertailu- ja altistusryhmien kalojen kasvu on samanlaista, rasvapitoisuuden korjaamisessa voidaan vaihtoehtoisesti käyttää ainoastaan vertailukalojen rasvapitoisuutta (ks. 56 kohta). Rasvapitoisuuden mukaan normalisoidun BCF:n laskentamenetelmä kuvataan lisäyksessä 5.

Tulosten tulkinta

Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testiliuoksista mitatut tulokset ovat lähellä analyysimenetelmän havaitsemisrajaa.

Testi- ja vertailuryhmien kalojen keskimääräinen kasvu ei saisi periaatteessa erota merkittävästi, jotta voidaan sulkea pois toksisuus. Kummankin ryhmän kasvuvakioita tai kasvukäyriä pitäisi verrata tarkoitukseen sopivalla menetelmällä ([1])).

Jos kertymä- ja poistumakäyrät ovat selkeitä, biokertyvyystietoja voidaan pitää hyvälaatuisina. Eri vakioiden osalta χ^2-sopivuustestin tulosten pitäisi osoittaa, että bioakkumulaatiomallin sopivuus on hyvä (eli mittavirheiden osuus on pieni (32)), jotta vakioita voitaisiin pitää luotettavina (ks. liite 5). Jos testissä käytetään useampaa kuin yhtä pitoisuutta, testipitoisuuksien välinen kertymä- ja poistumisvakioiden vaihtelu saa olla enintään 20 prosenttia ([2]). Jos näin ei ole, voidaan osoittaa pitoisuusriippuvuus. Jos kertymä-/poistumavakioissa havaitaan merkittäviä eroja käytettyjen testipitoisuuksien välillä, ne on kirjattava ja mahdollisuuksien mukaan myös selitettävä. BCF-arvojen 95 prosentin luotettavuustaso hyvin suunnitelluissa kokeissa on yleensä lähellä ± 20:tä prosenttia johdetusta BCF:stä.

Jos testissä käytetään kahta tai useampaa pitoisuutta, molempien tai kaikkien pitoisuuksien tuloksia käytetään sen määrittämiseksi, ovatko tulokset johdonmukaisia ja

([1]) Kasvuvakioita koskeva *t*-testi voidaan tehdä sen määrittämiseksi, onko vertailu- ja testiryhmien kalojen kasvussa eroja. Vaihtelu voidaan analysoida *F*-testillä. *F*-testiä tai uskottavuusosamäärätestiä voidaan tarvittaessa käyttää apuna sopivan kasvumallin valinnassa (OECD monograph 54, (32).

([2]) Kyseiset prosenttiluvut osoittavat, että analyysimenetelmät ovat luotettavia ja puoliintumisaika on < 14 vuorokautta. Jos analyysimenetelmät eivät ole näin luotettavia tai puoliintumisaika on (huomattavasti) pidempi, luvut ovat suurempia.

▼M7

riippuvatko ne pitoisuudesta. Jos testataan vain yksi pitoisuus eläinten ja/tai resurssien käytön vähentämiseksi, se on perusteltava.

Saatu BCF_{SS} on epäilyttävä, jos BCF_K on huomattavasti sitä suurempi, koska tämä voi olla viite siitä, ettei tasapainotilaa ole saavutettu tai kasvun aiheuttamaa liukenemista ja poistumaprosesseja otettu huomioon. Jos BCF_{SS} on hyvin paljon suurempi kuin BCF_K, johdetut kertymä- ja poistumavakiot olisi tarkistettava mahdollisten virheiden varalta ja arvioitava uudelleen. Erilainen sovitusmenetelmä saattaisi helpottaa BCF_K:n arvioimista (ks. liite 5).

Testiraportti

Kohdassa 3 tarkoitettujen testiaineen tietojen lisäksi testiraportti sisältää seuraavat tiedot:

Testiaine:

Fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— Kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

— Useammasta ainesosasta koostuvien aineiden ja koostumukseltaan tuntemattomien tai vaihtelevien aineiden, kompleksien reaktiotuotteiden tai biologisen materiaalin (UCVB) osalta mahdollisimman kattava kuvaus kunkin yksittäisen ainesosan kemiallisista tiedoista ja osuudesta aineen kokonaismassasta. Tiivistelmä siitä, miten testissä sovellettu analyysimenetelmä vastaa aineen pitoisuuden mittaamista; kaikkia analyysiprosesseja sekä menetelmän sopivuutta, menetelmän havaitsemisrajaa ja kvantifiointirajaa koskevat tiedot pitäisi antaa.

— Jos kyseessä on radioaktiivinen merkkiaine, on ilmoitettava merkatun atomin (merkattujen atomien) tarkka sijainti ja epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden määrä.

— Tiedot testiaineen myrkyllisyydestä kaloille (ideaalitilanteessa testatuille lajeille). Myrkyllisyys pitäisi ilmoittaa akuuttina 96 tunnin LC_{50}-arvona ja kroonisessa tutkimuksessa saatuina NOAEC-arvona (pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) ja LOAEC-arvona (alhaisin havaittavan haittavaikutuksen pitoisuus) (sen mukaan, onko kyseessä varhaiskehitysvaiheen testi vai koko elinkaaren kattava testi, jos tieto on saatavilla).

— Testikemikaalin tai testiaineen varastointiolosuhteet ja stabiliteetti varastoinnin aikana, jos kemikaali tai aine on varastoitu ennen käyttöä.

Testilajit:

Tieteellinen nimi, kanta, lähde, mahdollinen esikäsittely, totuttamistiedot, ikä, sukupuoli (jos merkitystä) koko (paino ja pituus) jne.

Testiolosuhteet:

— Käytetty testimenettely (kuten läpivirtaus tai puolistaattinen järjestelmä), tavallinen tai minimijärjestely (sekä tähän liittyvät syyt ja perustelut).

— Käytetty valaistustyyppi ja valon ominaisuudet sekä valojakso(t).

— Testijärjestelyjen kuvaus (esim. testikammioiden lukumäärä ja koko, veden vaihtumisnopeus, täyttönopeus, rinnakkaisnäytteiden määrä, kalojen lukumäärä kussakin rinnakkaisnäytteessä, testipitoisuuksien lukumäärä, kertymä- ja poistumavaiheiden kesto, kala- ja vesinäytteiden näytteenottotaajuus).

▼M7

— Kantaliuosten valmistus ja niiden uusimistaajuus (liuotusaine ja sen pitoisuus ja osuus testivedessä olevan orgaanisen hiilen kokonaismäärästä on ilmoitettava, jos käytetään liuotusainetta) tai kuvaus vaihtoehtoisesta annostelujärjestelmästä.

— Nimelliset testipitoisuudet, testiastioissa mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat sekä menetelmä, jolla ne on laskettu, ja mittausten taajuus.

— Laimennusveden alkuperä, mahdolliset esikäsittelyt, osoitukset kalojen kyvystä elää tässä vedessä sekä vettä koskevat tiedot: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännöskloorin tasot (jos ne on mitattu), orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus, suspensiossa olevat kiinteät aineet, väliaineen suolapitoisuus (jos aiheellista) ja muut mahdolliset mittaukset.

— Testiastioissa olevan veden laatu, pH, kovuus, TOC, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus; käytetyt menetelmät ja mittaustaajuus.

— Yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. rehutyyppi tai -tyypit, rehun alkuperä ja koostumus (vähintään rasva- ja valkuaisainepitoisuus mahdollisuuksien mukaan), valittu ruokkimistiheys, annetut määrät ja syöttötaajuus).

— Kala- ja vesinäytteiden käsittelyä koskevat tiedot, mukaan lukien testiaineen valmistusta, säilyttämistä, uuttamista ja määritysmenetelmiä (ja niiden täsmällisyyttä) sekä rasvapitoisuutta koskevat tiedot.

— Käsittelyssä käytetyt satunnaistamismenetelmät ja kalojen lajittelu testiastioihin.

— Päivämäärät, jolloin testiorganismit on lisätty testiliuoksiin, sekä testin kesto.

— Kuvaus alueenmäärityskokeista ja niiden tuloksista, jos saatavilla.

Tulokset:

— Mahdollisista esitutkimuksista saadut tulokset.

— Vertailukalojen ja kussakin altistuskammiossa olevien kalojen kuolleisuus sekä mahdollinen tavallisuudesta poikkeava käyttäytyminen.

— Tiedot mahdollisista havaituista haittavaikutuksista.

— Kattava kuvaus kaikista kemikaalien analysoinnissa käytetyistä menettelyistä havaitsemis- ja kvantifiointirajat, vaihtelu ja saanto mukaan luettuina.

— Kalojen rasvapitoisuus ja sen määrittämismenetelmä, ja jos se on johdettu, rasvapitoisuuden normalisointikerroin (L_n, jota käytetään osoittamaan kalan viiden prosentin rasvapitoisuuteen perustuvat tulokset).

— Taulukoidut tiedot kalojen painoista (ja pituuksista) yhdistettyinä yksittäisten kalojen kemikaalipitoisuuksiin (ja tarvittaessa rasvapitoisuuksiin) sekä vertailu- että altistusryhmässä (esimerkiksi käyttämällä kustakin näytteeksi otetusta kalasta yksilökohtaista tunnistetta) ja johdettuun kasvuvakioon (johdettuihin kasvuvakioihin) liittyvät laskutoimitukset.

▼M7

— Taulukoidut tiedot testiaineen pitoisuudesta kaloissa (C_f, liitettyinä yksittäisiin kaloihin) ja vedessä (C_w) (mukaan lukien testi- ja vertailuryhmän keskiarvot, standardipoikkeama ja standardivaihteluväli, jos tarpeen) kaikkina näytteenottoajankohtina (C_f ilmaistuna milligrammoina kiloa kohti kalan kokonaistuorepainosta tai tietyistä kudoksista, esimerkiksi rasvapitoisuus, ja C_w ilmaistuna milligrammoina litraa kohti). C_w-arvot verrokkisarjalle (tausta-arvo on myös ilmoitettava).

— Käyrät (kaikki mittaustiedot mukaan luettuina), joista käyvät ilmi seuraavat tiedot (tarvittaessa pitoisuudet voidaan ilmaista suhteessa kokonaispainoon ja rasvapitoisuus voidaan ilmaista normalisoituna kalan tai sen tiettyjen kudosten viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaan):

  — kasvu, esimerkiksi kalan paino verrattuna aikaan tai luennollisen logaritmin mukaan muutettu paino verrattuna aikaan (johdettu kasvuvakio k_g mukaan luettuna)

  — testiaineen kertymä ja poistuma kaloissa (yhdellä kuvaajalla osoitettuina)

  — tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (jos saavutettu)

  — luonnollisen logaritmin mukaan muutettu pitoisuus verrattuna kertymäaikaan (johdettu kertymävakio k_1 mukaan luettuna)

  — luonnollisen logaritmin mukaan muutettu pitoisuus (lineaarinen konsentraatio) verrattuna poistuma-aikaan (johdettu poistumavakio k_2 mukaan luettuna)

  — kertymä- ja poistumavaiheiden käyrät, jotka osoittavat sekä tiedot että sovitetun mallin.

— Jos käyrissä on silmämääräisesti havaittavissa selviä poikkeamia, poikkeavat arvot voidaan korjata tilastollisen pätevyyden testillä virheellisten datapisteiden poistamiseksi. Poistamiselle on esitettävä perustelut.

— Tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SS}), jos tasapainotila on (melkein) saavutettu.

— Kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ja johdetut kertymä- ja poistumavakiot k_1 ja k_2 sekä k_2-arvon varianssit (kulmakerroin ja leikkauspiste), jos sovelletaan vaiheittaista sovitusta.

— Luottamusvälit, standardi poikkeama (jos saatavilla) sekä kutakin käytettyä testiaineen pitoisuutta koskevien muuttujien laskennassa/analysoinnissa sovelletut menetelmät.

  — Mahdolliset tiedot radioaktiivisten merkkiaineiden metaboliiteista ja niiden kertymisestä.

  — Kasvuvakio(t) (sekä 95 prosentin luottamusväli(t)) ja laskennallinen kasvukorjattu poistumavakio (k_{2g}), puoliintumisaika ja BCF-arvot (BCF_{Kg}).

  — Mahdolliset epätavalliset tapahtumat testin aikana, poikkeamat näistä menettelyistä ja muut mahdolliset asiaan liittyvät tiedot.

  — Yhteenvetotaulukko merkityksellisistä määritetyistä ja laskennallisista tiedoista seuraavasti:

▼M7

Aineen kertymä- ja poistumavakiot ja biokertyvyystekijät (BCF)	
k_g (kasvuvakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
k_1 (yleinen kertymävakio; $l\ kg^{-1}\ vrk^{-1}$):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
k_2 (yleinen poistumavakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
k_{2g} (kasvukorjattu poistumavakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
C_f (kemikaalin pitoisuus kalassa tasapainopainotilassa; mg/kg^{-1}):	Lisää arvo ± SD (2)
C_w (kemikaalin pitoisuus vedessä; mg/l^{-1}):	Lisää arvo ± SD (2)
L_n (rasvapitoisuuden normalisointikerroin):	Lisää arvo (3)
BCF_{SS} (BCF tasapainotilassa; $l\ kg^{-1}$)	Lisää arvo ± SD (2)
BCF_{SS} (rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu BCF tasapainotilassa; $l\ kg^{-1}$)	Lisää arvo (3) ± SD (2)
BCF_K (kineettinen BCF; $l\ kg^{-1}$)	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
BCF_K (kasvukorjattu kineettinen BCF; $l\ kg^{-1}$)	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
$t_{1/2g}$ (kasvukorjattu puoliintumisaika; päivä):	Lisää arvo (95 %:n CI) (1)
BCF_{KL} (rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kineettinen BCF; $l\ kg^{-1}$):	Lisää arvo
BCF_{KLG} (rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kasvukorjattu kineettinen BCF; $l\ kg^{-1}$):	Lisää arvo

(1) CI, Confidence interval: luottamusväli (kun mahdollista arvioida).
(2) SD, Standard deviation: standardi poikkeama (kun mahdollista arvioida).

Ilmoituksia ”ei havaittu/kvantifioitu havaitsemis-/kvantifiointirajalla” pitäisi välttää. Näin ollen menetelmää ja koejärjestelyä on kehitettävä ennen testiä, koska mainitunkaltaisia tuloksia ei voida käyttää nopeusvakioiden laskemisessa.

C.13 – II: **MINIMOITU VESIALTISTUSTESTI KALOILLA**

JOHDANTO

Sekä laboratoriot että sääntelyviranomaiset ovat saaneet koko ajan enemmän kokemusta kattavan testin tekemisestä ja tulkinnasta. Se on osoittanut, että – joitakin poikkeuksia lukuun ottamatta – kertymä- ja poistumavakioiden arvioimisessa voidaan soveltaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Kertymä- ja poistumavakiot voidaan siis arvioida pitämällä näytteenottopisteiden määrä pienempänä ja kineettinen BCF on myös mahdollista johtaa.

Vaihtoehtoisia tapoja järjestää BFC-tutkimukset alettiin tutkia alun perin sen takia, että voitaisiin kehittää kevyempi välivaiheen testi K_{OW}-arvoon ja QSAReihin perustuvien arvioiden hylkäämiseksi tai vahvistamiseksi. Tällöin ei tarvitsisi

▼M7

tehdä kattavaa testiä useilla aineilla, mikä alentaisi kustannuksia ja testieläinten käyttöä, koska näytteenottotarve ja testisekvenssien määrä olisivat pienemmät. Aiempaa testimenetelmää noudatettiin pääpiirteittäin, jotta testitulokset voitaisiin yhdistää aiempien BCF-tietojen kanssa ja testin suorittaminen ja tietojen tulkinta olisi helpompaa. Tavoitteena oli kuitenkin mahdollistaa BCF:n arviointi riittävän tarkasti ja täsmällisesti riskinarviointia koskevien päätösten tekemiseksi. Monia kattavan testin näkökohtia voidaan soveltaa myös minimoidussa testissä. Sellaisia ovat esimerkiksi hyväksyttävyysperusteet (ks. 24 kohta) sekä testin keskeyttäminen, jos kertymävaiheen lopussa havaittava kertymä on mitättömän pieni (ks. 16 ja 38 kohta).

Minimoituun testiin kelpaavia aineita ovat siihen yleiseen ryhmään kuuluvat aineet, jota varten tämä testimenetelmä on kehitetty, eli polaarittomat orgaaniset aineet (ks. 49 kohta). Jos on viitteitä siitä, että testattavaksi aiottu aine saattaisi käyttäytyä eri tavalla (eli poikkeaisi selvästi ensimmäisen asteen kinetiikasta), sääntelyä varten pitäisi tehdä kattava testi.

Minimoidun testin kesto ei tavallisesti ole standardin BCF-testin kestoa lyhyempi, mutta kaloista otetaan vähemmän näytteitä (ks. perustelut lisäyksestä 6). Nopeasti poistuvien aineiden osalta poistumavaihetta voidaan kuitenkin lyhentää, millä vältetään se, että niiden pitoisuudet kaloissa laskevat havaitsemis- tai kvantifiointirajan alapuolelle ennen testin päättymistä. Minimoitu altistustesti, jossa kaloissa testataan vain yhtä pitoisuutta, voidaan käyttää kattavaa testiä koskevan tarpeen arvioimisessa. Jos sen tuloksena saatavat tiedot, joiden perusteella lasketaan nopeusvakiot ja BCF, ovat riittävän luotettavia (ks. 93 kohta), kattavaa testiä ei tarvitse tehdä, koska saatu BCF on kaukana lainsäädännössä asetetuista huolta aiheuttavista arvoista.

Joissakin tapauksissa voi olla hyödyllistä tehdä minimoitu testi esikokeena useammalla kuin yhdellä pitoisuudella sen määrittämiseksi, riippuvatko jotakin ainetta koskevat BCF-arviot pitoisuudesta. Jos minimoidun testin perusteella arvioidut BCF-arvot osoittavat niiden riippuvan pitoisuudesta, on tehtävä kattava testi. Jos minimoidun testin perusteella arvioinut BCF-arvot eivät riipu pitoisuudesta mutta tuloksia ei pidetä lopullisina, sitä mahdollisesti seuraava kattava testi voidaan tehdä vain yhdellä pitoisuudella, jolloin testieläimiä tarvitaan vähemmän kuin kahdessa (tai useammassa) kattavassa testissä.

Minimoituun testiin mahdollisesti kelpaavien aineiden pitäisi täyttää seuraavat edellytykset:

— Ne noudattavat todennäköisesti likimääräisesti ensimmäisen asteen kertymä- ja poistumakinetiikkaa, mikä on päätelty johtamalla arvot samankaltaisten aineiden perusteella.

— Niiden log K_{OW} < 6, paitsi jos oletuksena on nopea metaboloituminen ([1]).

— Niiden on oltava riittävän vesiliukoisia valitun analyysitekniikan huomioon ottaen (ks. 24 kohta).

— Niiden on oltava selvästi kvantifioitavia (eli pitoisuuksien pitäisi olla vähintään yhtä suuruusluokkaa suurempia kuin kvantifiointiraja) sekä kaloissa että vedessä, ja radioaktiivisten merkkiaineiden käyttö on suositeltavaa (ks. 23 kohta).

— Niiden poistumavaihe on pidempi kuin ennustettu puoliintumisaika (ks. laskentamenetelmät lisäyksessä 5), tai poistumavaiheen kesto on mukautettava sen mukaisesti (ks. 91 kohta). Tästä säännöstä voidaan poiketa, jos aineen odotetaan metaboloituvan nopeasti.

([1]) Minimoitua testiä voidaan käyttää nopean metaboloitumisen osoittamiseksi, jos sen tiedetään olevan todennäköistä.

▼M7

NÄYTTEENOTTOAIKATAULU MINIMOIDUSSA TUTKIMUSJÄRJESTELYSSÄ

Kalanäytteiden otto

Kalanäytteitä otetaan vain neljästä näytteenottopisteestä:

— Näytteet otetaan kertymävaiheen keskivaiheessa ja lopussa (viimeksi mainittu on samalla poistumavaiheen alku), eli 14 ja 28 vuorokauden kuluttua (33).

— Näytteet otetaan poistumavaiheen keskivaiheessa ja tutkimuksen päättyessä (kun aineen pitoisuus on < 10 prosenttia enimmäispitoisuudesta tai aineen puoliintumisaika on selvästi ohitettu), eli poistumavaiheen kestettyä seitsemän ja 14 vuorokautta (33). Jos poistuman odotetaan olevan nopea tai se havaitaan nopeaksi, poistumavaihetta voidaan joutua lyhentämään sen välttämiseksi, että pitoisuudet kaloissa laskevat kvantifiointirajan alapuolelle.

— Rasvapitoisuus mitataan samalla tavalla kuin kattavassa testissä.

— Kasvu korjataan samalla tavalla kuin kattavassa testissä.

— BCF lasketaan kineettisenä BCF-arvona.

Vesinäytteiden otto

Minimoidussa testissä vesinäytteet otetaan samalla tavalla kuin kattavassa tutkimuksessa (ks. 54 kohta) tai vähintään viisi kertaa säännöllisin väliajoin kertymävaiheessa ja viikoittain poistumavaiheessa.

Testijärjestelyä koskevat muutokset

Testiaineen ominaisuudet, pätevät QSAR-ennusteet ja tutkimuksen tarkoituksen huomioon ottaen tutkimusjärjestelyihin voidaan tehdä joitakin muutoksia:

— Jos tulosten on oltava tarkempia, kertymävaiheen lopuksi otettavissa näytteissä voidaan käyttää enemmän kaloja (neljän sijasta kuusi tai kahdeksan kalaa).

— Ylimääräistä kalaryhmää käytetään, jos poistuma ei ole 14 vuorokauden kuluttua (tai poistumavaiheen ennustetun päättymisen jälkeen) riittävä asianmukaisen poistuman varmistamiseksi (eli se on > 50 prosenttia). Jos poistumavaihe on ennakoitua lyhyempi tai pidempi kuin 14 vuorokautta, näytteenottoaikataulua muutetaan tämän mukaisesti (eli yksi kalaryhmä analysoidaan poistumavaiheen ennustettuna päättymisajankohtana ja toinen, kun on kulunut puolet poistumaan kuluneesta ajasta).

— Testissä käytetään kahta pitoisuutta mahdollisen pitoisuusriippuvuuden määrittämiseksi. Jos kahdella pitoisuudella tehdyn minimoidun testin tulokset osoittavat, ettei BCF riipu pitoisuudesta (eli ero on alle 20 prosenttia), mahdollisessa kattavassa testissä voidaan testata vain yksi pitoisuus.

— Vaikuttaa todennäköiseltä, että Arnot *et al.*:in (35) ehdottamia bioakkumulaatioprosessien malleja voidaan käyttää apuna kertymä- ja poistumavaiheiden keston suunnittelussa (ks. myös liite 5).

Laskutoimitukset

Tämän lähestymistavan perusteena on, että kattavassa testissä biokertyvyystekijä voidaan määrittää joko tasapainotilan biokertyvyystekijänä (BCF_{SS}) vertaamalla toisiinsa testiaineen pitoisuutta kaloissa ja vedessä tai kineettisenä biokertyvyystekijänä (BCF_K) laskemalla kertymävakion k_1 ja poistumavakion k_2 välinen suhde. BCF_K on pätevä siinäkin tapauksessa, ettei aineen pitoisuudessa saavuteta kertymävaiheen aikana tasapainotilaa, mikäli kertymä ja poistuma noudattavat likimäärin ensimmäisen asteen kineettisiä prosesseja. Kertymä- ja poistumavakioiden arviointi edellyttää aina vähintään kahta datapistettä, joista toinen on kertymävaiheen päättymisajankohta (ja samalla poistumavaiheen alkamisajankohta)

▼M7

ja toinen poistumavaiheen päättymisajankohta (tai ajankohta, jona poistumavaihe on edennyt huomattavan pitkälle). Välinäytteiden ottaminen on suositeltavaa kertymä- ja poistumavaiheen kinetiikan tarkistamiseksi ([1]). Katso laskentamenetelmät liitteistä 5 ja 6.

Tulosten tulkinta

Testin hyväksyttävyyden ja saatujen tietojen arvon arviointi edellyttää, että poistumavaihe on pidempi kuin puoliintumisaika. Lisäksi BCF_{Km}-arvoa (minimoidun testin perusteella johdettu kineettinen BCF) pitäisi verrata minimoituun BCF_{SS}-arvoon. (Viimeksi mainittu on kertymävaiheen lopuksi laskettu BCF_{SS}, mikäli oletuksena on, että tasapainotila on saavutettu. Tämä on vain oletus, koska näytteenottopisteiden määrä ei riitä vahvistamaan tietoa.) Jos BCF_{Km} < minimoitu BCF_{SS}, käytetään mieluummin minimoitua BCF_{SS}-arvoa. Jos BCF_{Km} on pienempi kuin 70 prosenttia minimoidusta BCF_{SS}-arvosta, tulokset eivät ole päteviä ja on tehtävä kattava testi.

Jos minimoidussa testissä määritetty BCF_{Km} vastaa sääntelyn näkökulmasta huolestuttavaa arvoa, on tehtävä kattava testi. Jos tulos on kaukana lainsäädännössä annetuista huolestuttavista arvoista (selvästi niiden ylä- tai alapuolella), kattavaa testiä ei välttämättä tarvita tai kattavassa testissä voidaan käyttää vain yhtä pitoisuutta, jos sovellettavassa sääntelykehyksessä edellytetään kattavaa testiä.

Jos kattava testi katsotaan tarpeelliseksi yhdellä pitoisuudella tehdyn minimoidun testin perusteella, se voidaan tehdä toisella pitoisuudella. Jos tulokset ovat johdonmukaisia, kattavaa testiä ei ole välttämätöntä tehdä erilaisella pitoisuudella, koska kyseisen aineen biokertyvyyden ei odoteta riippuvan pitoisuudesta. Jos minimoidussa testissä on käytetty kahta pitoisuutta eikä kertyvyys ole tulosten perusteella riippuvainen pitoisuudesta, kattavassa testissä voidaan testata vain yksi pitoisuus (ks. 87 kohta).

Testiraportti

Minimoitua testiä koskevan testiraportin pitäisi sisältää kaikki samat tiedot kuin kattavan testin seloste (ks. 81 kohta) lukuun ottamatta tietoja, joita ei ole mahdollista antaa (kuten käyrä, joka osoittaa tasapainotilan saavuttamiseen kuluneen ajan ja tasapainotilan biokertyvyystekijän; viimeksi mainitusta pitäisikin ilmoittaa minimoitu BCF_{ss}). Testiraportin pitäisi lisäksi sisältää perustelut minimoidun testin toteuttamiselle sekä sen perusteella saatu BCF_{Km}-arvo.

C.13 – III: BIOAKKUMULAATION TESTAAMINEN KALOILLA RAVINTOALTISTUKSESSA

JOHDANTO

Tässä osiossa kuvattua menetelmää olisi käytettävä aineilla, joiden testauksessa ei voida soveltaa vesialtistusta (esimerkiksi siksi, ettei vesipitoisuutta voida pitää stabiilina ja mitattavana tai ettei kertymä ole riittävä 60 vuorokauden altistuksessa; katso edeltävät osiot, joissa käsitellään vesialtistusmenetelmää). On kuitenkin ymmärrettävä, että tämän testin lopputuloksena saadaan ennemminkin ravintoon liittyvä biomagnifikaatiokerroin (BMF) kuin biokertyvyystekijä (BCF) ([2]).

Toukokuussa 2001 Madridissa pidetyssä SETAC Europen konferenssissa esiteltiin uusi menetelmä heikosti veteen liukenevien orgaanisten aineiden bioakkumulaation testaamiseksi (36). Menetelmä perustuu lukuisiin kirjallisuudessa käsiteltyihin bioakkumulaatiotutkimuksiin, joissa on käytetty testiainetta sisältävän rehun annostelumenetelmää (esim. (37)). Vuoden 2004 alkupuolella EU:n hitaasti

([1]) Jos testissä käytetään vain kahta datapistettä, BCF_{Km}-arvo voidaan arvioida bootstrap-menetelmien avulla. Jos näytteitä otetaan myös välidatapisteistä, BCF_{Km}:n luottamusvälit voidaan laskea samalla tavalla kuin kattavassa testissä.

([2]) Ks. määritelmät ja yksiköt liitteessä 1.

▼M7

hajoavia, biokertyviä ja myrkyllisiä aineita käsittelevälle työryhmälle esiteltiin pöytäkirjaluonnos (38), jossa käsiteltiin sellaisten vesiliukoisten orgaanisten aineiden bioakkumulaatiopotentiaalin määrittämistä, joiden biokertyvyyttä ei voitu selvittää standardilla vesialtistusmenetelmällä, sekä kyseisen pöytäkirjaluonnoksen valmisteluasiakirjat (39). Kyseisen menetelmän käyttöä perusteltiin lisäksi sillä, että altistuminen tällaisille niukkaliukoisille aineille (joiden log K_{OW} >5) saattaa tapahtua ympäristössä pääosin ravinnon välityksellä (ks. (40) (41) (42) (43) (44)). Näin ollen joissakin julkaistuissa kemikaaliasetuksissa viitataan ravinnon välityksellä tehtäviin altistustesteihin ([1]). Pitäisi kuitenkin huomata, että tässä osiossa kuvatussa menetelmässä vesialtistusvaihe pyritään nimenomaan välttämään, minkä takia tämän testimenetelmän tuloksena saatavaa BMF-arvoa ei voida verrata suoraan kenttätutkimuksessa saatavaan BMF-arvoon (koska niissä voidaan yhdistää sekä veden että ravinnon välityksellä tapahtuva altistus).

Tässä osiossa käsiteltävä testimenetelmä perustuu mainittuun pöytäkirjaan (38). Kyse on uudesta menetelmästä, joka ei ollut mukana testimenetelmän C.13 edellisessä versiossa. Tässä vaihtoehtoisessa testissä ravinnon välityksellä tapahtuvaa altistumista voidaan tutkia suoraan valvotuissa laboratorio-oloissa.

Tutkijoiden pitäisi lukea tämän testimenetelmän kohdat 1–14, joissa annetaan tietoa siitä, milloin ravinnon välityksellä tehtävä altistus voi olla suositeltavampi kuin vesialtistus. Lisäksi annetaan tietoa erilaisista aineisiin liittyvistä näkökohdista, jotka pitäisi ottaa huomioon ennen testin aloittamista.

Radioaktiivisten merkkiaineiden käyttöä voidaan harkita samoin perustein kuin vesialtistusmenetelmässä (ks. 6 ja 65 kohta).

Ravinnon välityksellä tehtävässä altistuksessa voidaan testata kerralla useampaa kuin yhtä ainetta, jos tietyt edellytykset täyttyvät. Näitä edellytyksiä käsitellään tarkemmin 112 kohdassa. Yksinkertaisuuden nimissä tässä kuvataan kyseistä menetelmää vain yhtä ainetta testattaessa.

Ravinnon välityksellä tehtävä altistus on monessa suhteessa samanlainen kuin vesialtistus, mutta altistumisreitti on luonnollisesti eri. Näin ollen tässä kuvattuun menetelmään pätevät monet samat huomiot kuin edellisessä osiossa kuvattuun vesialtistusmenetelmään. Edellisen osion olennaisiin kohtiin on pyritty viittaamaan niin paljon kuin mahdollista, mutta luettavuuden ja ymmärrettävyyden varmistamiseksi kaikkia päällekkäisyyksiä ei ole voitu välttää.

TESTIN PERIAATE

Testissä voidaan käyttää läpivirtausta tai puolistaattista menetelmää (ks. 4 kohta). Läpivirtausmenetelmää suositellaan, jotta vältettäisiin mahdollinen altistuminen veden välityksellä, joka johtuu testiainetta sisältävän rehun lisäämisestä tai ulosteista. Testi on kaksivaiheinen: kertymävaihe (kaloille annetaan testiainetta sisältävää rehua) ja poistumavaihe (annettava rehu on puhdasta ja käsittelemätöntä) (ks. 16 kohta). Kertymävaiheessa testiryhmän kaloja ruokitaan päivittäin tietyllä kaupallisesti saatavalla kalanruoalla, jonka koostumus tunnetaan ja johon on lisätty testiainetta. Ideaalitilanteessa kalat syövät kaiken annetun ruoan (ks. 141 kohta). Poistumavaiheessa kaloja ruokitaan puhtaalla ja käsittelemättömällä kaupallisesti saatavalla kalanruoalla. Kuten vesialtistuksessa, tarvittaessa voidaan käyttää useampaa kuin yhtä testiryhmää, joille annettava ruoka sisältää eri pitoisuuksia testiainetta, mutta erittäin hydrofobisia orgaanisia aineita testattaessa yksi testiryhmä on yleensä riittävä (ks. 49 ja 107 kohta). Jos käytetään puolistaattista

([1]) Kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 (EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1) täytäntöönpanoa varten tätä kysymystä käsitellään tietovaatimuksia ja kemikaaliturvallisuusarviointia koskevissa ohjeissa (Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment), luvuissa R.7 c, R.7.10.3.1, s. 13; R.7.10.4.1, s. 31–32 ja kuvassa R7.10-2, s. 50.

▼M7

menetelmää, kalat pitäisi siirtää uuteen liuokseen ja/tai uuteen testikammioon kertymävaiheen päätyttyä (siltä varalta, että väliaine ja/tai laitteisto on kontaminoitunut testiaineen uuttumisen seurauksena). Testiaineen pitoisuus kaloissa mitataan testin molempien vaiheiden aikana. Testiainetta sisältävää ruokaa saavan kalaryhmän (testiryhmä) lisäksi pidetään vertailuryhmää, jonka kalat elävät täysin samanlaisissa olosuhteissa ja saavat muuten samaa kaupallisesti saatavaa kalanruokaa, paitsi että vertailuryhmän ruokaan ei ole lisätty testiainetta. Vertailuryhmän ansiosta voidaan kvantifioida testiaineen taustapitoisuudet altistamattomilla kaloilla ja testiryhmässä (tai -ryhmissä) mahdollisesti havaittuja käsittelyyn liittyviä haittavaikutuksia voidaan verrata siihen ([1]). Lisäksi sen avulla voidaan verrata ryhmien kasvuvakioita sen tarkistamiseksi, että kalat ovat syöneet saman verran tarjottua ruokaa (mahdolliset erot ravinnon maittavuudessa pitäisi myös huomioida selitettäessä kasvuvakioiden välisiä eroja; ks. 138 kohta). On tärkeää, että testi- ja vertailuryhmiä ruokitaan sekä kertymä- että poistumavaiheessa ravintoarvoltaan samanlaisella ruoalla.

Testimenetelmän kehittäjien saamien kokemusten perusteella kertymävaiheen riittävä kesto on yleensä 7–14 vuorokautta (38) (39). Tämän pituisena kertymävaiheen pitäisi pitää testin toteuttamiskustannukset mahdollisimman pieninä mutta varmistaa kuitenkin useimmilla aineilla riittävä altistuminen. Joissakin tapauksissa kertymävaihetta voidaan kuitenkin jatkaa (ks. 127 kohta). Kertymävaiheessa aineen pitoisuus kaloissa ei ehkä saavuta tasapainotilaa, joten tietojen käsittely ja tällä menetelmällä saatavat tulokset perustuvat tavallisesti kudosjäämien kineettisen analyysin tuloksiin. (Huom. tasapainotilan saavuttamiseen kuluvan ajan arvioinnissa voidaan soveltaa samoja yhtälöitä kuin vesialtistuksessa, ks. liite 5.) Poistumavaihe alkaa, kun kaloille aletaan antaa ruokaa, johon ei ole lisätty testiainetta. Se kestää yleensä enimmillään 28 vuorokautta tai niin kauan, ettei testiainetta enää voida kvantifioida kokonaisesta kalasta, riippuen siitä, kumpi tapahtuu aiemmin. Poistumavaihetta voidaan lyhentää tai jatkaa kauemmin kuin 28 vuorokautta eri vaiheissa mitattua kemikaalipitoisuutta koskevan muutoksen tai kalojen koon perusteella.

Tässä menetelmässä on mahdollista määrittää testiaineelle ainekohtainen puoliintumisaika ($t_{1/2}$, poistumavakiosta k_2), assimilaatioteho (absorboituminen suolistossa; a), ravintoon liittyvä kineettinen biomagnifikaatiokerroin (BMF_K), kasvukorjattu ravintoon liittyvä biomagnifikaatiokerroin (BMF_{Kg}) sekä rasvapitoisuuden mukaan korjattu ([2]) kineettinen biomagnifikaatiokerroin (BMF_{KL}) (ja/tai kasvun ja rasvapitoisuuden mukaan korjattu kineettinen biomagnifikaatiokerroin, BMF_{KgL}) kaloissa. Kuten vesialtistusmenetelmässä, kalan massan kasvaessa testin aikana testiaineen pitoisuus laskee kasvavassa kalassa. Näin ollen (kineettinen) BCF määritetään liian alhaiseksi, jollei sitä korjata kasvun mukaisesti (ks. 162 ja 163 kohta). Jos arvioidaan, että tasapainotila on saavutettu kertymävaiheessa, voidaan lisäksi laskea suuntaa-antava tasapainotilan BMF. Käytettävissä on menetelmiä, joiden avulla voidaan arvioida kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ravintotutkimuksessa saatujen tietojen perusteella (esim. (44) (45) (46) (47) (48). Näiden menetelmien hyviä ja huonoja puolia käsitellään lisäyksessä 8.

([1]) Useimmilla testiaineilla niitä ei pitäisi ideaalitilanteessa löytyä kontrollivedestä. Taustapitoisuuksilla pitäisi olla merkitystä vain luonnossa esiintyvien materiaalien (kuten joidenkin metallien) ja kaikkialla ympäristössä olevien aineiden kannalta.

([2]) Koska BMF määritetään jonkin aineen pitoisuutena organismissa suhteessa saman aineen pitoisuuteen organismin ravinnossa tasapainotilassa, rasvaisuus otetaan huomioon korjaamalla organismin ja ravinnon rasvapitoisuus. Näin ollen se on parempi ilmoittaa ”korjattuna”. Tämä lähestymistapa eroaa ”normalisoinnista” kyseisen organismin normaalin rasvapitoisuuden mukaisesti, mitä käytetään veden välityksellä tehtävässä biokertyvyystestissä.

▼M7

Testi suunniteltiin alun perin niukkaliukoisille polaarittomille orgaanisille aineille, jotka noudattavat likimääräisesti ensimmäisen asteen kertymä- ja poistumakinetiikkaa kaloissa. Jos testataan ainetta, joka ei noudata ensimmäisen asteen kertymä- ja poistumakinetiikkaa, pitäisi käyttää monimutkaisempia malleja (ks. lisäyksessä 5 olevat viitteet) ja pyytää neuvoa biostatistiikan ja/tai farmakokinetiikan asiantuntijoilta.

BMF määritetään tavallisesti analysoimalla testiaine kokonaisesta kalasta (perusteena tuorepaino). Näytteitä voidaan ottaa myös yksittäisistä kudoksista (kuten lihaksista tai maksasta), jos se on tutkimuksen tavoitteiden kannalta olennaista ja kala on jaettu syötävään ja syömäkelvottomaan osaan (ks. 21 kohta). Lisäksi voidaan irrottaa ja analysoida erikseen ruoansulatuskanava, jotta voitaisiin määrittää näytteenottopisteissä mitattujen pitoisuuksien merkitys kokonaisessa kalassa kertymävaiheen lopussa ja juuri ennen poistumavaiheen alkua. Tämä voidaan tehdä myös osana massatasemenetelmää.

Näytteeksi otettujen kokonaisten kalojen rasvapitoisuus pitäisi määrittää siten, että pitoisuudet voidaan korjata rasvapitoisuuden mukaisesti ja ottaen huomioon sekä ravinnon että kalan rasvapitoisuus (ks. 56 ja 57 kohta sekä liite 7).

Näytteeksi otetut kalat pitäisi punnita ja saadut painot kirjata ja liittää kussakin yksilössä mitattuun kemikaalipitoisuuteen (testiraportissa voidaan esimerkiksi käyttää jokaisesta kalasta yksilöllistä tunnistetta). Tämä mahdollistaa testin aikana mahdollisesti tapahtuvan kasvun laskemisen. Kalan kokonaispituus pitäisi mitata aina kuin mahdollista ([1]). Painoa tarvitaan myös arvioitaessa BCF:ää ravintoaltistustestissä saatujen poistumatietojen perusteella.

TESTIAINEEN TIEDOT

Testiaineesta pitäisi olla saatavilla kohdissa 3 ja 22 luetellut tiedot. Analyyttista menetelmää testiaineen pitoisuuden mittaamiseksi vedessä ei yleensä tarvita. Sen sijaan pitoisuudet kalanruoassa ja kalojen kudoksissa on määritettävä riittävän herkillä menetelmillä.

Tässä menetelmässä voidaan testata yhdellä kertaa useampia kuin yksi aine. Testiaineiden pitäisi kuitenkin olla yhteensopivia niin, etteivät ne vaikuta toisiinsa tai muuta toistensa kemiallista koostumusta, kun niitä lisätään kalanruokaan. Tavoitteena on varmistaa, etteivät yhdessä testattujen aineiden mittaustulokset eroaisi merkittävästi tuloksista, jotka saataisiin, jos aineet testattaisiin erikseen. Alustavassa analyysissa pitäisi osoittaa, että kukin aine voidaan erottaa useita testiaineita sisältävästä ravinnosta ja kaloista otetuista kudosnäytteistä siten, että i) saannot ovat suuria (esimerkiksi > 85 prosenttia nimellisarvosta) ja ii) ne ovat riittävän herkkiä testattavaksi. Yhdessä testattavien aineiden kokonaisannostuksen pitäisi olla pienempi kuin se yhdistetty pitoisuus, joka voisi olla myrkyllinen (ks. 51 kohta). Lisäksi testijärjestelyissä pitäisi huomioida mahdolliset haittavaikutukset kaloille ja aineiden mahdolliset yhteisvaikutukset (esimerkiksi metaboliset vaikutukset), jotka liitetään useiden aineiden samanaikaiseen testaamiseen. Ionisoituvien aineiden samanaikaista testaamista pitäisi välttää. Altistumisen näkökulmasta tätä menetelmää voidaan käyttää myös monimutkaisten seosten testaamisessa (ks. 13 kohta), vaikka sitä koskevat samat rajoitukset kuin muissa menetelmissä.

TESTIN VALIDITEETTI

Testi on luotettava, jos seuraavat edellytykset täyttyvät (ks. 24 kohta):

— Veden lämpötilan vaihtelu sekä altistus- että vertailuryhmässä on alle ± 2 °C.

([1]) Kokonaispituus pitäisi myös kirjata testin aikana, koska se on hyvä keino selvittää mahdolliset haittavaikutukset.

▼M7

— Liuenneen hapen pitoisuus ei laske alemmaksi kuin 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta.

— Testiaineen pitoisuus kalanruoassa ennen kertymävaihetta ja sen lopussa on ± 20 prosenttia (vähintään kolmen kumpanakin ajankohtana otetun näytteen perusteella).

— Testiaineen homogeenisuus sitä sisältävässä ruoassa pitäisi osoittaa alustavassa analyysissa; vähintään kolmen testin alussa otetun näytteen perusteella kyseisen aineen pitoisuus ei saisi vaihdella enempää kuin ± 15 prosenttia keskiarvosta.

— Testiainetta ei havaita tai sen pitoisuus vastaa normaalia jäämien tasoa testiainetta sisältämättömässä ruoassa tai vertailukalojen kudoksissa altistetuista kaloista otettuihin näytteisiin verrattuna.

— Sekä vertailu- että testiryhmien kalojen kuolleisuus tai haittavaikutusten/sairauksien määrä on ≤ 10 prosenttia testin lopussa. Jos testin kestoa on jostain syystä jatkettava, haittavaikutusten määrä on ≤ 5 prosenttia kuukaudessa ja ≤ 30 prosenttia kumulatiivisesti. Merkittävä ero testi- ja vertailukalojen keskimääräisessä kasvussa saattaa olla merkki testiaineen toksisuudesta.

VERTAILUAINEET

Jos laboratorio ei ole tehnyt määritystä aikaisemmin tai jos on tehty huomattavia muutoksia (esimerkiksi kalakannan tai toimittajan vaihto, kalalajin vaihtaminen tai merkittävä muutos kalojen koossa, kalojen ruoassa tai testiaineen lisäysmenetelmässä), on syytä tehdä tekninen pätevyystutkimus vertailuainetta käyttäen. Vertailuainetta käytetään pääasiassa sen määrittämiseksi, onko valittu menetelmä testiaineen lisäämiseksi ruokaan sellainen, että sillä voidaan varmistaa mahdollisimman hyvin testiaineiden homogeenisuus ja biologinen hyötyosuus. Polaarittomilla hydrofobisilla aineilla on käytetty esimerkiksi heksaklooribentseenia (HCB), mutta HCB:n vaarallisuuden takia pitäisi harkita muiden sellaisten aineiden käyttöä, joiden kertymisestä ja biomagnifikaatiosta on luotettavaa tietoa ([1]). Jos käytetään vertailuainetta, siitä pitäisi ilmoittaa testiraportissa samat perustiedot kuin testiaineista, eli aineen nimi, puhtaus, CAS-numero, rakenne ja myrkyllisyystiedot (jos saatavilla) (ks. 3 ja 22 kohta).

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

Materiaaleja ja laitteistoa pitäisi käyttää samalla tavalla kuin veden välityksellä tehtävässä altistuksessa (ks. 26 kohta). Testissä pitäisi käyttää läpivirtausmenetelmää tai staattista ajoittaisvaihtoista järjestelmää, jolla varmistetaan laimennusveden riittävä määrä testisäiliöissä. Virtausnopeudet on kirjattava muistiin.

Vesi

Testivettä pitäisi käyttää samalla tavalla kuin vesialtistuksessa (ks. 27–29 kohta). Väliaineen on oltava ominaisuuksiltaan kuvatun kaltaista ja sen pitäisi pysyä laadultaan samana koko testin ajan. Luonnosta peräisin olevien hiukkasten pitoisuuden ja orgaanisen hiilen kokonaismäärän pitäisi olla ennen testin alkamista mahdollisimman alhainen (hiukkasia ≤ 5 mg/l ja orgaanisen hiilen kokonaismäärä ≤ 2 mg/l). Orgaanisen hiilen kokonaismäärä (TOC) mitataan vain ennen testin alkua testiveden ominaisuuksia määritettäessä (ks. 53 kohta).

([1]) HCB mainitaan Tukholman yleissopimuksen liitteissä A ja C sekä pysyvistä orgaanisista yhdisteistä annetun asetuksen (EY) N:o 850/2004 (EUVL L 158, 30.4.2004, s. 7) liitteissä I ja III olevissa luetteloissa.

▼M7

Ruokavalio

Suositeltavaa on antaa kaupallisesti saatavaa kalanruokaa (kelluvat ja/tai hitaasti uppoavat hiutaleet), joka sisältää vähintään valkuaisaineita ja rasvaa. Ruokahiutaleiden pitäisi olla kooltaan yhdenmukaisia ravinnon välityksellä tapahtuvan altistuksen tehokkuuden voimistamiseksi, jotta kalat söisivät enemmän sen sijaan, että syövät vain suuremmat hiutaleet ja jättävät pienemmät syömättä. Hiutaleiden pitäisi olla testin alussa sopivan kokoisia kalojen kokoon nähden (esimerkiksi jos kalojen kokonaispituus on 3–7 cm, hiutaleiden halkaisija voi olla noin 0,6–0,85 mm, ja jos kalojen kokonaispituus on 6–12 cm, hiutaleiden halkaisija voi olla noin 0,85–1,2 mm). Hiutaleiden kokoa voidaan muuttaa kalojen kasvun mukaan poistumavaiheen alkaessa. Sopivasta kaupallisesti saatavasta ruoasta annetaan esimerkki lisäyksessä 7. Tätä menetelmää kehitettäessä käytetyn ruokavalion kokonaisrasvapitoisuus oli 15–20 prosenttia (tuorepaino). Joillakin alueilla ei välttämättä ole saatavilla kalanruokaa, jonka rasvapitoisuus on näin suuri. Tällöin tutkimuksessa käytetään ruokaa, jonka rasvapitoisuus on pienempi, ja tarvittaessa ruokkimistaajuutta muutetaan sen mukaan kalojen terveyden ylläpitämiseksi (alustavan testin perusteella). Testi- ja vertailuryhmien kalojen kokonaisrasvapitoisuus on määritettävä ja kirjattava muistiin ennen testin alkua sekä kertymävaiheen lopussa. Kaupallisen rehun valmistajan ilmoittamat tiedot ruoan sisältämistä ravintoaineista, kosteuspitoisuudesta, kuiduista ja tuhkasta ja mahdollisuuksien mukaan myös kivennäisaineista ja torjunta-ainejäämistä on esitettävä testiraportissa.

Testiainetta on lisättävä ruokaan siten, että ruoka olisi mahdollisimman homogeenista koko testin ajan. Testiryhmälle annettavan ruoan sisältämän testiainepitoisuuden määrittämisessä on huomioitava analyysitekniikan herkkyys, testiaineen myrkyllisyys (NOEC-arvo, jos se on tiedossa) sekä olennaiset fysikaalis-kemialliset tiedot. Jos käytetään vertailuainetta, se pitäisi lisätä testiaineen pitoisuuden ollessa noin 10 prosenttia (tai joka tapauksessa niin pieni kuin on käytännössä mahdollista) riippuen analyysin herkkyydestä (esim. heksakloribentseenin hyväksyttäväksi pitoisuudeksi ruoassa on todettu 1–100 μg/g; lisätietoa HCB:n assimilaatiotehosta on 47 kohdassa).

Testiaine voidaan lisätä kalanruokaan eri tavoin riippuen sen fyysisistä ominaisuuksista ja liukoisuudesta (ks. lisätietoa lisäämismenetelmistä lisäyksestä 7).

— Jos aine on liukenevaa ja sen triglyseridiarvot vakaita, se olisi liuotettava pieneen määrään kalaöljyä tai syötävää kasviöljyä ennen kuin se sekoitetaan kalanruokaan. Tässä vaiheessa pitää olla tarkkana, ettei rasvojen osuus kasva liian suureksi ottaen huomioon testirehun luonnollisen rasvapitoisuuden. Tämä tehdään lisäämällä pienin mahdollinen määrä öljyä, jonka tiedetään varmistavan testiaineen leviäminen ja homogeenisuus ruoassa.

— Aine olisi lisättävä ruokaan käyttämällä sopivaa orgaanista liuotinta, kunhan homogeenisuus ja biologinen hyötyosuus eivät kärsi (testiaineesta saattaa muodostua ruokaan (mikro)kiteitä liuotinaineen haihtuessa, mutta tätä ei ole helppoa osoittaa; ks. (49)).

— Ei-viskoosit nesteet olisi lisättävä kalanruokaan suoraan, mutta ne on sekoitettava hyvin ruoan homogeenisuuden varmistamiseksi ja assimilaation helpottamiseksi. Sekoitustekniikalla pitäisi varmistaa testiainetta sisältävän rehun homogeenisuus.

▼M7

Joissakin tapauksissa, esimerkiksi testattaessa vähemmän hydrofobisia aineita, joita desorboituu ruoasta helpommin, voi olla tarpeen valella valmiit ruokahiutaleet pienellä määrällä maissi- tai kalaöljyä (ks. 142 kohta). Tällöin vertailuruoka on käsiteltävä samalla tavalla ja rasvapitoisuus määritettävä valmiin testirehun avulla.

Jos käytetään vertailuainetta, sitä koskevien tulosten on oltava verrattavissa samanlaisissa olosuhteissa toteutettuja ja samaa ruokkimistaajuutta soveltavia tutkimuksia koskeviin tietoihin (ks. 45 kohta). Tiettyä vertailuainetta koskevien muuttujien pitäisi myös täyttää olennaiset perusteet, jotka mainitaan 113 kohdassa (alakohdat 3, 4 ja 5).

Jos testiaineen lisäämisessä käytetään kantaja-aineena öljyä tai liuotinainetta, samaa kantaja-ainetta olisi sekoitettava sama määrä (ilman testiainetta) vertailuryhmän ruokavalioon, jotta se vastaisi testiainetta sisältävää ruokavaliota. On tärkeää, että testi- ja vertailuryhmiä ruokitaan sekä kertymä- että poistumavaiheessa ravintoarvoltaan samanlaisella ruoalla.

Testiainetta sisältävä ruoka olisi varastoitava siten (esim. kylmässä), että testiaineen pitoisuus pysyy rehuseoksessa vakaana. Varastointiolosuhteet on ilmoitettava testiraportissa.

Kalalajin valinta

Käytettävät kalalajit voivat olla samoja kuin vesialtistuksessa (ks. 32 kohta ja lisäys 3). Ruokavalion välityksellä tehtävissä bioakkumulaatiotutkimuksissa yleisesti käytetyt kalalajit ennen tämän testimenetelmän julkaisua ovat olleet kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*), karppi (*Cyprinus carpio*) ja paksupäämutu (*Pimephales promelas*). Testattavien lajien ruokailutottumusten olisi oltava sellaiset, että kalat syövät nopeasti saamansa ruoka-annoksen, jotta testiaineen pitoisuuteen ruoassa mahdollisesti vaikuttavat tekijät (kuten uuttuminen veteen ja mahdollinen altistuminen veden välityksellä) voitaisiin pitää mahdollisimman vähäisinä. Testissä olisi käytettävä kaloja, joiden koko ja paino ovat suositusten mukaiset (ks. lisäys 3). Kalojen olisi oltava niin suuria, että yksittäisten kalojen analysointi onnistuu helposti. Kalalajien testaaminen nopean kasvun vaiheessa voi hankaloittaa tietojen tulkintaa, ja nopea kasvu voi vaikuttaa assimilaatiotehon laskemiseen ([1]).

Kalojen hoito

Totuttamista, kuolleisuutta ja sairauksia koskevat hyväksyntäperusteet, joita sovelletaan ennen testin suorittamista, ovat samat kuin vesialtistuksessa (ks. 33–35 kohta).

TESTIN SUORITTAMINEN

Tutkimuksen valmistelu ja alueenmääritystesti

Ennen varsinaista tutkimusta on tehtävä analyyseja, joilla osoitetaan testiaineen saannot testiainetta sisältävästä ruoasta / testiainetta sisältävää ruokaa saaneiden kalojen kudoksista. Aina ei ole välttämätöntä tehdä alueenmääritystestiä sen määrittämiseksi, mikä on aineen sopiva pitoisuus ruoassa. Alustavien ruokintakokeiden avulla voidaan osoittaa, ettei haittavaikutuksia ole havaittavissa, arvioida testiainetta sisältävän ruokavalion maittavuutta ja kalojen kudosten ja ravinnon

([1]) Kertymävaiheessa tapahtuvan nopean kasvun takia todellinen ruokkimistaajuus laskee altistuksen alussa määritettyä pienemmäksi.

▼M7

analysoinnissa käytetyn menetelmän herkkyyttä sekä valita sopiva ruokkimistaajuus ja näytteenottovälit poistumavaiheessa. Niiden toteuttaminen ei kuitenkaan ole pakollista. Esitutkimuksesta voi olla hyötyä sen arvioimisessa, minkä verran kaloja näytteenotossa tarvitaan poistumavaiheen aikana. Käytettyjen kalojen määrää voidaan näin vähentää huomattavasti etenkin sellaisten testiaineiden osalta, jotka ovat erityisen alttiita metaboloitumaan.

Altistusolosuhteet

Kertymävaiheen kesto

Kertymävaiheen riittävä kesto on tavallisesti 7–14 vuorokautta, joiden ajan yhdelle kalaryhmälle annetaan päivittäin vertailuruokaa ja toiselle testiruokaa ennalta määrätty annos, jonka suuruus riippuu testattavasta lajista ja kokeen olosuhteista. Esimerkiksi kirjolohella annos on 1–2 prosenttia ruumiinpainosta (tuorepaino). Ruokkimistaajuus määritetään sellaiseksi, etteivät kalat kasva nopeasti eikä niiden rasvapitoisuus kohoa merkittävästi. Kertymävaihetta voidaan tarvittaessa pidentää aiemmista tutkimuksista saatujen kokemusten tai testiaineen (tai sitä vastaavan aineen) kertymistä/poistumista kalassa koskevien tietojen perusteella. Testin katsotaan alkavan, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa. Yksi testivuorokausi alkaa ruokintahetkestä ja päättyy vähän (esimerkiksi tuntia) ennen seuraavaa ruokintaa. Ensimmäinen testivuorokausi alkaa siis siitä, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa, ja päättyy juuri ennen hetkeä, jolloin kaloille annetaan toisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa. Käytännössä kertymävaihe päättyy vähän (esimerkiksi tuntia) ennen sitä, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältämätöntä ruokaa, koska testiainetta sisältävää ruokaa on kalojen ruoansulatusjärjestelmässä ja se absorboituu kaloihin noin 24 tunnin ajan. On tärkeää varmistaa, että testiaineen (ei-myrkyllinen) kertymä kaloissa on riittävän suuri analyysimenetelmään nähden, jotta poistumavaiheessa voidaan mitata vähintään yhden suuruusluokan aleneminen. Erityistapauksissa voidaan soveltaa pidempää kertymävaihetta (enintään 28 vuorokautta), jolloin myös otetaan lisänäytteitä kertymäkinetiikan arvioimiseksi. Pitoisuus kalassa ei välttämättä saavuta tasapainotilaa kertymävaiheen aikana. Tasapainotilan ja samalla hyväksyttävän pitoisuuden saavuttamiseen kuluvan ajan arvioimisessa voidaan käyttää samoja yhtälöitä kuin vesialtistustestissä (ks. liite 5).

Joissakin tapauksissa tiedetään jo etukäteen, ettei ainetta kerry ravinnon välityksellä tarpeeksi 7–14 vuorokaudessa valitulla pitoisuudella riittävän suuren pitoisuuden saavuttamiseksi kaloissa, jotta voitaisiin analysoida vähintään yhden suuruusluokan aleneminen poistumavaiheessa. Tämä voi johtua siitä, ettei analyysitekniikka ole kovin herkkä, tai siitä, että assimilaatioteho on alhainen. Tällöin voi olla järkevää jatkaa ensimmäistä ruokintavaihetta kauemmin kuin 14 vuorokautta tai vaihtoehtoisesti pitäisi harkita, etenkin helposti metaboloituvilla aineilla, pitoisuuden nostamista ravinnossa. On kuitenkin huolehdittava siitä, ettei kalojen kudoksiin kertyneen aineen määrä ylitä kertymävaiheessa sitä (arvioitua) rajaa, jota alempi pitoisuus ei aiheuta havaittavaa kroonista vaikutusta (NOEC) (ks. 138 kohta).

Poistumavaiheen kesto

Poistumavaihe kestää yleensä korkeintaan 28 vuorokautta. Se alkaa, kun testiryhmän kaloille aletaan antaa kertymävaiheen jälkeen käsittelemätöntä ruokaa. Poistumavaihe alkaa, kun kaloille annetaan ensimmäistä kertaa testiainetta sisältämätöntä ruokaa, ei siis heti sen jälkeen, kun kaloille on annettu viimeisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa. Tämä johtuu siitä, että testiainetta sisältävää ruokaa on kalojen ruoansulatusjärjestelmässä ja se absorboituu kaloihin noin 24 tunnin ajan, kuten todetaan 126 kohdassa. Poistumavaiheen ensimmäinen näyte otetaan vähän ennen toista kertaa, kun kaloille annetaan testiainetta sisältämätöntä ruokaa. Edellä mainittu poistumavaiheen kesto on määritelty siten, että voidaan havaita aineet, joiden puoliintumisaika on enintään 14 vuorokautta, kuten biokertyvillä aineilla ([1]). Näin ollen 28 vuorokautta käsittää kyseisillä aineilla

([1]) Veden välityksellä tehtävässä altistustutkimuksessa 14 vuorokauden puoliintumisaika vastaisi BCF-arvoa, joka on noin 10 000 L/kg, kun käytetään noin gramman painoisia kaloja, joiden kertymävakio on noin 500 L/kg/pv (Sijm *et al*:n yhtälön mukaisesti(46)).

▼M7

kaksi puoliintumisaikaa. Erittäin herkästi bioakkumuloituvilla aineilla voi olla hyödyllistä pidentää poistumavaihetta (jos alustava testi antaa viitteitä tästä).

Vaikka aine poistuu hyvin hitaasti eikä puoliintumisaikaa siten voida määrittää tarkasti poistumavaiheessa, tietoa voi olla riittävästi sitä varten, että bioakkumulaation arvioidaan olevan merkittävää. Jos taas aine poistuu niin nopeasti, ettei nollapitoisuuden (pitoisuus kertymävaiheen lopussa / poistumavaiheen alussa, $C_{0,d}$) ajankohtaa ja k_2-arvoa voida johtaa luotettavasti, k_2 voidaan arvioida suuntaa-antavasti (ks. liite 7).

Jos aikaisemmassa vaiheessa (esim. seitsemän tai 14 vuorokauden kuluttua) kaloista tehdyt analyysit osoittavat, ettei aineen poistuma vastaa kvantifiointirajaa ennen 28 vuorokauden täyttä ajanjaksoa, näytteenotto voidaan keskeyttää ja testi päättää.

Joissakin tapauksissa testiainetta ei ehkä ole kertynyt kertymävaiheen lopussa (tai poistumavaiheen toisena näytteenottoajankohtana) mitattavissa olevaa määrää. Jos voidaan osoittaa, että i) kohdassa 113 annetut hyväksyttävyysperusteet täyttyvät eikä ii) kertymän olemattomuus johdu testin toteuttamiseen liittyvistä puutteista (esim. kertymävaihe ei ole riittävän pitkä, testiainetta on lisätty ruokaan puutteellisella tekniikalla, minkä takia biologinen hyötyosuus on huono, analyysimenetelmä ei ole riittävän herkkä, kalat eivät syö ravintoa ja niin edelleen), tutkimus voidaan lopettaa eikä sitä tarvitse tehdä uudelleen soveltaen pidempää kertymävaihetta. Jos alustavat testit osoittavat, että näin saattaisi käydä, voidaan harkita mahdollisuuksien mukaan sulamatta jääneen testiaineen analysoimista ulosteista osana massatasemenetelmää.

Testikalojen määrä

Samoin kuin vesialtistustestissä valittujen kalojen on oltava keskenään suunnilleen samanpainoisia ja -pituisia, eli pienimmän kalan painon on oltava vähintään kaksi kolmasosaa suurimman kalan painosta (ks. 40–42 kohta).

Tutkimuksessa käytettävien kalojen kokonaismäärä on valittava näytteenottoaikataulun mukaan (vähintään yksi näyte kertymävaiheen lopussa ja neljästä kuuteen näytettä poistumavaiheen aikana). Lisäksi on otettava huomioon analyysitekniikan herkkyys, kertymävaiheen lopussa todennäköisesti saavutettava pitoisuus (aiempien tietojen perusteella) sekä poistumavaiheen kesto (jos se voidaan arvioida aiempien tietojen perusteella). Kullakin näytteenottokerralla pitäisi analysoida viidestä kymmeneen kalaa, joiden kasvu (paino ja kokonaispituus) mitataan ennen kemikaali- tai rasvapitoisuuden määrittämistä.

Kalojen koko, kasvuvauhti ja fysiologia vaihtelevat luonnostaan ja kalat syövät saamaansa ravintoa todennäköisesti eri määriä. Näin ollen näytteet pitäisi ottaa kullakin kerralla vähintään viidestä testiryhmän kalasta ja viidestä vertailuryhmän kalasta, jotta keskimääräinen pitoisuus ja sen vaihtelu voitaisiin määrittää asianmukaisesti. Käytettyjen kalojen keskuudessa esiintyvä vaihtelu vaikuttaa todennäköisesti enemmän yleiseen vaihteluun, jota ei voida testissä hallita, kuin käytettyjen analyysimenetelmien välinen luontainen vaihtelu, mikä puoltaa joissakin tapauksissa jopa kymmenen kalan käyttöä yhtä näytteenottopistettä kohti. Jos testiaineen taustapitoisuuksia ei voida mitata poistumavaiheen alussa, kemiallisen analyysin tekeminen viimeisenä näytteenottoajankohtana kahdesta tai kolmesta vertailuryhmän kalasta saattaa riittää, kunhan lopuilta vertailuryhmän kaloilta mitataan paino ja kokonaispituus kaikissa näytteenottopisteissä (siten, että kasvu mitataan yhtä suurelta määrältä testi- ja vertailuryhmän kaloja). Kalat pitäisi varastoida ja punnita yksitellen (vaikka näytteenoton tulokset olisi myöhemmin yhdistettävä), ja niiltä pitäisi mitata kokonaispituus.

▼M7

Standarditestissä, jossa poistumavaihe kestää 28 vuorokautta ja poistumavaiheen aikana otetaan viisi näytettä, tämä esimerkiksi tarkoittaa, että näyte otetaan kaikkiaan 59–120:stä testiryhmän kalasta ja 50–110:stä vertailuryhmien kalasta olettaen, että kyseisen aineen analyysitekniikka mahdollistaa rasvapitoisuuden analysoinnin samoista kaloista. Jos rasvapitoisuutta ja kemikaalipitoisuutta ei voida analysoida samoista kaloista eikä vertailuryhmien kalojen käyttö pelkästään rasvapitoisuuden analysoimiseksi ole mahdollista (ks. 56 kohta), näytteenottoon saatetaan tarvita 15 kalaa enemmän (kolme kalaa kantapopulaatiosta testin alussa, kolme kalaa sekä testi- että vertailuryhmästä poistumavaiheen alussa ja kolme kalaa sekä testi- että vertailuryhmästä kokeen lopussa). Esimerkki näytteenottoaikataulusta ja kalojen määrästä esitetään lisäyksessä 4.

Täyttö

Vesimäärän suhteessa kalojen määrään pitäisi olla sama kuin vesialtistuksessa (ks. 43 ja 44 kohta). Vaikka nopeus, jolla kaloja lisätään veteen, ei vaikuta altistuspitoisuuteen tässä testissä, kalaa on suositeltavaa lisätä 0,1–1,0 g (tuorepaino) vesilitraa kohti päivässä, jotta liuenneen hapen pitoisuus pysyy sopivana ja testiorganismiin kohdistuva stressi on mahdollisimman pieni.

Testiruokavalio ja ruokinta

Totuttamisvaiheessa kaloille annetaan sopivaa ravintoa edellä kuvatulla tavalla (117 kohta). Jos testi tehdään läpivirtausmenetelmällä, virtaus on keskeytettävä kalojen ruokinnan ajaksi.

Testin aikana testiryhmälle annettavassa ruokavaliossa on noudatettava edellä kuvattuja periaatteita (116–121 kohta). Ainekohtaisten tekijöiden, analyysin herkkyyden, luonnonympäristössä odotetun ruokavalioon kertymisen sekä kroonisen myrkyllisyyden/kertymisen lisäksi ruoan sisältämän testiaineen pitoisuuden valinnassa on huomioitava ruoan maittavuus (jotta kalat eivät jätä ruokaa syömättä). Testiraportissa on ilmoitettava testiaineen nimellispitoisuus ruoassa. Kokemuksen perusteella käytännön työn kannalta sopiva testiainepitoisuus ruoassa on 1–1 000 µg/g aineilla, joilla ei ole havaittavissa erityistä toksista mekanismia. Aineilla, joiden vaikutus ei perustu erityiseen mekanismiin, kudosjäämät eivät saa olla yli 5 µmol/g rasvaa, koska tätä suuremmat jäämät saattavat aiheuttaa kroonisia vaikutuksia (19) (48) (50) ([1]). Muiden aineiden osalta on huolehdittava siitä, ettei kumulatiivinen altistus aiheuta haittavaikutuksia (ks. 127 kohta). Tämä pätee erityisesti silloin, kun samanaikaisesti testataan useampaa kuin yhtä ainetta (ks. 112 kohta).

Sopiva määrä testiainetta voidaan lisätä kalanruokaan yhdellä kolmesta tavasta, jotka kuvataan 119 kohdassa ja lisäyksessä 7. Testiraportissa on ilmoitettava menetelmät ja menettelyt, joita on käytetty testiaineen lisäämiseksi rehuun. Vertailuryhmän kaloille annetaan käsittelemätöntä ruokaa, joka sisältää saman verran kantaja-aineena toimivaa öljyä (ilman testiainetta) kuin testiainetta sisältävä rehu, jos sitä on käytetty kertymävaiheessa, tai ruokaa, joka on käsitelty ”puhtaalla” liuotinaineella, jos testiryhmän kaloille annetun ruoan valmistuksessa on käytetty kantaja-aineena liuotinta. Käsitelty ja käsittelemätön ruoka pitäisi analysoida sen sisältämän testiainepitoisuuden määrittämiseksi vähintään kolmeen otteeseen ennen kertymävaiheen alkamista ja sen päättyessä. Kun kalat on altistettu käsitellylle ruoalle (kertymävaihe), niille (kummankin ryhmän kaloille) annetaan käsittelemätöntä ruokaa (poistumavaihe).

Kaloille annetaan ruokaa tietty annos (jonka suuruus riippuu lajista; esimerkiksi kirjolohen päivittäinen ruoka-annos on noin 1–2 prosenttia kalan tuorepainosta). Ruokkimistaajuus määritetään sellaiseksi, etteivät kalat kasva nopeasti eikä niiden

([1]) Koska todellinen sisäinen pitoisuus voidaan määrittää vasta testin tekemisen jälkeen, on arvioitava odotettu sisäinen pitoisuus (esim. odotetun BMF-arvon ja ruoan sisältämän pitoisuuden perusteella; ks. liitteessä 5 esitetty yhtälö A5.8).

▼M7

rasvapitoisuus kohoa merkittävästi. Kokeen aikainen ruokkimistaajuus on kirjattava täsmällisesti ylös. Alkuvaiheen ruokinnassa pitäisi huomioida kantapopulaation suunniteltu punnitus, joka tehdään juuri ennen testin alkamista. Annettavan rehun määrää pitäisi mukauttaa kullakin näytteenottokerralla punnittujen kalojen tuorepainon mukaisesti, jotta voidaan huomioida kalojen kasvu kokeen aikana. Testi- ja vertailusäiliöissä olevien kalojen painot ja pituudet voidaan arvioida kulloinkin näytteeksi otettujen kalojen painojen ja kokonaispituuksien perusteella. Testi- ja vertailusäiliöihin jääviä kaloja ei punnita tai mitata. On tärkeää, että ruokkimistaajuus pidetään koko testin ajan samana.

Ruokintaa pitäisi tarkkailla sen varmistamiseksi, että kalat syövät silmämääräisesti kaiken niille annetun ruoan. Näin voidaan taata, että laskennassa käytetään oikeita syöntimääriä. Ruokkimistaajuus pitäisi määrittää alustavien ruokintakokeiden tai aiemman kokemuksen perusteella, jotta kalat söisivät varmasti päivittäisen ruoka-annoksensa kokonaan. Jos kalat jättävät toistuvasti ruoan syömättä, ruoka kannattaa jakaa useampaan annokseen jokaisena testipäivänä (esimerkiksi puolittamalla päivittäinen annos ja antamalla se kahdesti päivässä yhden sijasta). Jos tämä katsotaan tarpeelliseksi, toinen ruokkimiskerta on järjestettävä aina samaan aikaan ja se on ajoitettava siten, että ennen näytteiden ottamista kuluu mahdollisimman pitkä aika (toinen ruokkimiskerta järjestetään esimerkiksi testivuorokauden ensimmäisen puoliskon aikana).

Vaikka kalat syövät ruoan yleensä nopeasti, on tärkeää varmistaa, että aine säilyy absorboituneena ruokaan. Testiaineen hajoaminen veteen pitäisi estää, jotta kalat eivät altistuisi testiainepitoisuudelle sekä veden että ruokavalion välityksellä. Tämä voidaan varmistaa siten, että syömättä jäänyt ruoka (ja ulosteet) poistetaan testi- ja vertailusäiliöistä viimeistään tunnin, mutta mieluiten puolen tunnin kuluessa ruokinnasta. Lisäksi voidaan käyttää aktiivihiilisuodatukseen perustuvaa järjestelmää, joka puhdistaa veden jatkuvasti absorboimalla veteen mahdollisesti liuenneet epäpuhtaudet. Läpivirtausjärjestelmien avulla ruokahiukkaset ja liuenneet aineet voidaan poistaa vedestä nopeasti ([1]). Joissakin tapauksissa tätä ongelmaa voidaan lievittää muuttamalla hieman testiainetta sisältävän ruoan valmistustekniikkaa (ks. 119 kohta).

Valo ja lämpötila

Samoin kuin vesialtistuksessa (ks. 48 kohta) valojakson pitäisi suositusten mukaan olla 12–16 tuntia ja lämpötila asetetaan testatuille lajeille sopivaksi (± 2 °C) (ks. lisäys 3). Valaistuksen tyyppi ja ominaisuudet on tunnettava ja kirjattava ylös.

Kontrollit

Kontrollia varten pitäisi olla yksi vertailuryhmä, jonka kaloille annetaan samaa rehua kuin testiryhmälle, mutta ilman testiainetta. Jos testiaine on lisätty testiryhmälle annettavaan rehuun käyttämällä kantaja-aineena öljyä tai liuotinta, vertailuryhmälle annettava ruoka on käsiteltävä muuten täysin samalla tavalla, mutta siihen ei lisätä testiainetta. Näin varmistetaan, että testi- ja vertailuryhmien ruokavaliot vastaavat toisiaan (ks. 121 ja 139 kohta).

([1]) Testiainetta saattaa päästä väliaineeseen kalojen ulosteista tai sen uuttuessa ruoasta, mitä ei voida välttämättä täysin estää. Yksi vaihtoehto onkin mitata testiaineen pitoisuus vedessä kertymävaiheen lopussa, etenkin jos käytetään puolistaattista järjestelmää. Näin voidaan tarkistaa, ovatko kalat mahdollisesti altistuneet sille myös veden välityksellä.

▼M7

Veden laatua koskevien mittausten taajuus

Tässäkin olosuhteet ovat samat kuin vesialtistuksessa lukuun ottamatta sitä, että TOC-arvo mitataan vain ennen testiä testiveden ominaisuuksia määritettäessä (ks. 53 kohta).

Näytteenotto ja kalojen ja ruoan analysointi

Ruokanäytteiden analysointi

Testi- ja vertailuryhmille annettavan ruoan testiaine- ja rasvapitoisuudet pitäisi analysoida vähintään kolmeen otteeseen ennen kertymävaiheen alkua ja sen päättyessä. Testiraportissa on ilmoitettava analyysimenetelmät sekä menettelyt, joilla on varmistettu ruoan homogeenisuus.

Testiainepitoisuuden määrittämiseksi otetut näytteet pitäisi analysoida vakiintunutta ja validoitua menetelmää käyttäen. Tutkimusta edeltävä alustava testi on tarpeen kvantifiointirajan, prosenttimääräisen saannon, häiriötekijöiden sekä analyysia koskevan vaihtelun määrittämiseksi suunnitellusta näytematriisista. Radioaktiivista merkkiainetta testattaessa on otettava huomioon samat asiat kuin vesialtistuksessa, mutta veden sijasta analysoidaan rehu (ks. 65 kohta).

Kalanäytteiden analysointi

Kunakin näytteenottoajankohtana näytteeksi otetaan 5–10 kalaa altistus- ja vertailuryhmästä (joissakin tapauksissa pienempi määrä riittää; ks. 134 kohta).

Näytteet pitäisi ottaa kaikkina testipäivinä samaan aikaan (ruokkimisajankohdan mukaan), ja näytteenotto pitäisi myös ajoittaa siten, että todennäköisyys, että kalojen suolistossa on kertymävaiheessa ja poistumavaiheen alussa ruokaa, on mahdollisimman pieni. Tarkoituksena on välttää vääristymät testiaineen kokonaispitoisuudessa. (Näytteeksi otetut kalat on siten poistettava kunkin testivuorokauden päätteeksi ottaen huomioon, että testivuorokausi alkaa ruokintahetkestä ja päättyy seuraavaan ruokintaan, eli noin 24 tuntia myöhemmin. Poistumavaihe alkaa, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältämätöntä ruokaa; ks. 128 kohta). Poistumavaiheen ensimmäinen näyte (joka otetaan vähän ennen kuin kaloille annetaan toisen kerran testiainetta sisältämätöntä ruokaa) on tärkeä, koska tätä mittausta käytetään edellisen päivän tuloksen ekstrapoloinnissa nolla-ajankohdan pitoisuuden arvioimiseksi ($C_{0,d}$, eli pitoisuus kalassa kertymävaiheen lopussa / poistumavaiheen alussa). Vaihtoehtoisesti voidaan irrottaa kalan ruoansulatuskanava ja analysoida se erikseen kertymävaiheen alussa sekä poistumavaiheen ensimmäisenä ja kolmantena päivänä.

Kunakin näytteenottoajankohtana otetaan kaloja kummastakin testiastiasta, ja ne käsitellään samalla tavalla kuin vesialtistuksessa (ks. 61–63 kohta).

Testiainepitoisuus koko kalassa (tuorepainoon verrattuna) määritetään vähintään kertymävaiheen lopussa ja poistumavaiheen aikana sekä vertailu- että testiryhmän kaloista. Poistumavaiheessa on suositeltavaa käyttää neljästä kuuteen näytteenottopistettä (esim. päivät 1, 3, 7, 14 ja 28). On myös mahdollista lisätä yksi näytteenottopiste kertymävaiheen kestettyä 1–3 vuorokautta, jotta voidaan arvioida assimilaatioteho kaloissa kertymävaiheen lineaarisessa osassa, kun altistusvaihe on vasta alussa. Aikataulusta voidaan poiketa pääasiassa kahdessa tapauksessa: i) jos kertymävaihetta pidennetään kertymäkinetiikan tutkimista varten, kertymävaiheessa otetaan yksi lisänäyte, jolloin on myös lisättävä näytteeksi otettavien kalojen määrää (ks. 126), tai ii) jos tutkimus on lopetettava kertymävaiheen jälkeen, koska kertymä on liian vähäinen mitattavaksi (ks. 131 kohta).

▼M7

Näytteeksi otetut kalat on punnittava yksitellen (ja niiden kokonaispituus mitattava), jotta voidaan määrittää kasvuvakio. Testiaineen pitoisuus tietyissä kalan kudoksissa (syötäväksi kelpaavissa ja kelpaamattomissa osissa) voidaan määrittää myös kertymävaiheen lopussa ja vapaavalintaisina ajankohtina poistumavaiheessa. Radioaktiivista merkkiainetta testattaessa on otettava huomioon samat asiat kuin vesialtistuksessa, mutta veden sijasta analysoidaan rehu (ks. 65 kohta).

Jos vertailuainetta käytetään jaksoittain (ks. 25 kohta), pitoisuudet on suositeltavaa mitata testiryhmästä (kokonaisista kaloista) kertymävaiheen lopussa sekä kaikkina kyseiselle testiaineelle määritettyinä ajankohtina poistumavaiheessa. Vertailuryhmässä pitoisuus analysoidaan (kokonaisista kaloista) vain kertymävaiheen lopussa. Tietyissä tilanteissa (jos esimerkiksi testiaineeseen ja vertailuaineeseen sovellettavat analyysitekniikat ovat keskenään epäsopivia, jolloin näytteenottoaikataulun noudattaminen edellyttäisi suurempaa määrää kaloja) voidaan soveltaa jotain muuta lähestymistapaa, jolla voidaan pitää tarvittavien lisäkalojen määrä mahdollisimman pienenä. Vertailuaineen pitoisuus mitataan poistumavaiheessa ainoastaan päivinä 1 ja 3 sekä kahdessa muussa näytteenottopisteessä, jotka valitaan siten, että niiden perusteella voidaan arvioida luotettavasti vertailuaineen pitoisuus nolla-ajankohtana ($C_{0,d}$) sekä k_2-arvo.

Yksittäisten kalojen rasvapitoisuus pitäisi määrittää mahdollisuuksien mukaan kaikkina näytteenottoajankohtina tai vähintään kertymävaiheen alussa ja lopussa sekä poistumavaiheen lopussa (ks. 56 ja 67 kohta). Analyysimenetelmästä riippuen (ks. 67 kohta ja lisäys 4) samaa kalaa voidaan mahdollisesti käyttää sekä rasvapitoisuuden että testiainepitoisuuden määrittämisessä. Tämä on suositeltavaa, jotta tarvittavien kalojen määrä pysyisi mahdollisimman pienenä. Jos tämä ei kuitenkaan ole mahdollista, voidaan soveltaa samaa lähestymistapaa kuin vesialtistuksessa (ks. rasvapitoisuuden määrittämiseen sopivat vaihtoehtoiset keinot 56 kohdassa). Rasvapitoisuuden laskennassa käytetty menetelmä on ilmoitettava testiraportissa.

Analyysimenetelmän laatu

Kokeelliset tarkastukset ovat tarpeen, jotta voidaan varmistaa ainekohtaisen analyysitekniikan tarkkuus, oikeellisuus, täsmällisyys ja toistettavuus sekä taata testiaineen saanto ruoasta ja kaloista.

Kalojen kasvun mittaaminen

Testin alussa on punnittava osa kantapopulaation kaloista (ja mitattava niiden kokonaispituus). Kyseiset kalanäytteet pitäisi ottaa vähän (esim. tuntia) ennen kuin kaloille aletaan antaa testiainetta sisältävää ruokaa. Kyseessä on testipäivä 0. Tähän näytteeseen pitäisi ottaa saman verran kaloja kuin testin aikana otettaviin näytteisiin. Osa kaloista voi olla samoja kuin ne, joita käytetään rasvapitoisuuden analysoinnissa ennen kertymävaiheen alkua (ks. 153 kohta). Kullakin näytteenottokerralla kalat punnitaan ja niiden pituus mitataan ensin. Jokaisella näytteeksi otetulla kalalla mitattu paino ja pituus pitäisi liittää niissä määritettyyn kemikaalipitoisuuteen (ja tarvittaessa myös rasvapitoisuuteen) esimerkiksi käyttämällä kustakin kalasta yksilöllistä tunnistetta. Näytteiksi otettujen kalojen mittoja voidaan käyttää testi- ja kontrollisäiliöihin jäävien kalojen painon ja pituuden arvioinnissa.

Kokeellinen arviointi

Kuolleisuutta pitäisi tarkkailla ja se pitäisi kirjata muistiin päivittäin. Lisäksi pitäisi määrittää ja kirjata haittavaikutukset, kuten epätavallinen käytös tai pigmenttimuutokset. Kala katsotaan kuolleeksi, jos se ei hengitä eikä reagoi vähäiseen mekaaniseen ärsykkeeseen. Kuolleet tai selvästi kuolemaisillaan olevat kalat on poistettava.

▼M7

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Tuloksia käytetään poistumavakion (k_2) määrittämisessä kalojen kokonaistuorepainon funktiona. Kasvuvakio (k_g) lasketaan kalojen painon keskimääräisen nousun perusteella, ja sitä käytetään tarvittaessa kasvukorjatun poistumavakion (k_{2g}) määrittämisessä. Lisäksi pitäisi ilmoittaa assimilaatioteho (a; absorboituminen suolistosta), kineettinen biomagnifikaatiokerroin (BMF_K) (tarvittaessa annetaan kasvukorjattu arvo, eli BMF_{Kg}), rasvapitoisuuden mukaan korjattu BMF-arvo (BMF_{KL} tai BMF_{KgL}, jos arvo on korjattu kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan) sekä ruokkimistaajuus. Jos kertymävaiheessa tasapainotilan saavuttamiseen kuluva aika voidaan arvioida (esim. 95 prosenttia tasapainotilasta tai t_{95} = 3,0/k_2), voidaan ilmoittaa myös tasapainotilan arvioitu BMF (BMF_{SS}) (ks. 105 ja 106 kohta sekä lisäys 5) edellyttäen, että tasapainotila on t_{95}-arvon perusteella mahdollisesti saavutettu. BMF_{SS}-arvo korjataan rasvapitoisuuden mukaan käyttäen samaa menetelmää kuin kineettisesti johdetulla BMF:llä (BMF_K), jotta siitä voidaan ilmoittaa rasvapitoisuuden mukaan korjattu arvo BMF_{SSL} (huomaa, ettei tasapainotilan BMF:n korjaamiseksi kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan ole yleisesti hyväksyttyä menettelyä). Kaavoja ja laskentaesimerkkejä esitellään liitteessä 7. Käytettävissä on menetelmiä, joiden avulla voidaan arvioida kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ravintotutkimuksessa saatujen tietojen perusteella. Asiaa käsitellään liitteessä 8.

Tiedot kalojen painosta ja pituudesta

Eri ajankohtina saadut yksittäisten kalojen tuorepainot ja pituudet taulukoidaan erikseen testi- ja vertailuryhmittäin kertymävaiheen kaikilta näytteenottopäiviltä (kantapopulaation kaloista taulukoidaan kertymävaiheen alussa otetut mitat; vertailu- ja testiryhmien kaloista kertymävaiheen lopussa ja tarvittaessa kertymävaiheen alussa, esimerkiksi kertymävaiheen päivinä 1–3, sekä poistumavaiheessa esimerkiksi päivinä 1, 2, 4, 7, 14 ja 28, otetut mitat). Kasvua seurataan mieluiten painon perusteella kasvun aiheuttaman liukenemisen huomioon ottamiseksi. Tietojen korjaamisessa kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan sovellettava(t) menetelmä(t) esitellään jäljempänä (162 ja 163 kohta) sekä liitteessä 5.

Tiedot testiaineen pitoisuudesta kaloissa

Tiedot sekä testi- että vertailuryhmien yksittäisistä kaloista mitatuista testiaineen jäämistä (tai jos jäämiä ei voida mitata yksittäisistä kaloista, kalanäytteiden yhdistetyt tiedot) ilmoitetaan pitoisuutena suhteessa tuorepainoon ja taulukoidaan kultakin näytteenottoajankohdalta. Jos rasvapitoisuus on määritetty erikseen jokaisesta näytekalasta, voidaan johtaa ja taulukoida yksilökohtaiset rasvapitoisuuden mukaan korjatut pitoisuudet (rasvapitoisuus suhteessa tuorepainoon).

— Poistumavaiheessa yksittäisistä kaloista mitatut testiainejäämät (tai jos niitä ei voida mitata yksittäisistä kaloista, kalanäytteiden yhdistetyt jäämät, ks. 66 kohta) muunnetaan luonnollisiksi logaritmeiksi ja esitetään ajan funktiona (vuorokausi). Jos käyrissä on silmämääräisesti havaittavissa selviä poikkeamia, poikkeavat arvot voidaan korjata tilastollisen pätevyyden testillä virheellisten datapisteiden poistamiseksi. Poistamiselle on esitettävä perustelut.

— Lineaarinen pienimmän neliösumman kerroin lasketaan suhteuttamalla ln(konsentraatio) eli lineaarinen konsentraatio poistuma-ajan (vuorokausi) tietoihin. Suoran kulmakerroin ja leikkauspiste ilmoitetaan yleisenä poistumavakiona (k_2) ja johdetun nolla-ajankohdan pitoisuuden luonnollisena logaritmina ($C_{0,d}$) (ks. lisätietoa liitteistä 5 ja 7). Jos tämä ei ole mahdollista, koska pitoisuudet jäävät poistumavaiheen toisessa näytteessä kvantifiointirajan alle, k_2 -arvo voidaan arvioida suuntaa-antavasti (ks. lisäys 7).

— Suoran kulmakertoimen ja leikkauspisteen varianssit lasketaan soveltamalla standardeja tilastomenetelmiä sekä 90 prosentin (tai 95 prosentin) luottamusväliä arvioituihin ja esitettyihin tuloksiin.

▼M7

— Lisäksi lasketaan kertymävaiheen viimeisenä päivänä kaloista mitattujen pitoisuuksien keskiarvo (mitattu nolla-ajankohdan pitoisuus $C_{0,m}$), jota verrataan johdettuun arvoon $C_{0,d}$. Jos johdettu arvo on pienempi kuin mitattu arvo, se saattaa olla merkki siitä, että kalojen suolistossa on sulamatonta ruokaa. Jos taas johdettu arvo on paljon suurempi kuin mitattu arvo, poistumakaudella saatujen tietojen lineaarisen regression perusteella johdettu arvo voi olla virheellinen ja se on arvioitava uudelleen (ks. lisäys 7).

Poistumavakio ja biomagnifikaatiokerroin

Biomagnifikaatiokertoimen laskeminen saatujen tietojen perusteella edellyttää, että ensin määritetään assimilaatioteho (testiaineen absorboituminen suolistossa, α). Tässä pitäisi soveltaa liitteessä 7 esitettyä yhtälöä A7.1, jota varten tiedossa on oltava johdettu pitoisuus kalassa poistumavaiheen nolla-ajankohtana ($C_{0,d}$), (yleinen) poistumavakio (k_2), pitoisuus ruoassa (C_{ruoka}), ruoan imeytymisvakio (I) ja kertymävaiheen kesto (t). Ln(konsentraation) ja poistuma-ajan välisen lineaarisen suhteen kulmakerroin ja leikkauspiste ilmoitetaan yleisenä poistumavakiona (k_2 = kulmakerroin) ja nolla-ajankohdan pitoisuutena ($C_{0,d} = e^{intercept}$), kuten edellä esitetään. Johdettujen arvojen biologinen paikkansapitävyys pitäisi tarkistaa (assimilaatiotehon osuus ei esimerkiksi voi olla suurempi kuin 1). *(I)* lasketaan jakamalla ruoan massa päivittäin ruokittujen kalojen massalla (jos ruoan määrä on 2 prosenttia ruumiinpainosta, I on 0,02). Laskennassa sovellettavaa ruokkimistaajuutta saatetaan kuitenkin joutua muuttamaan kalojen kasvun mukaisesti (mikä voidaan tehdä käyttämällä tiedossa olevaa kasvuvakiota kalojen painon arvioimiseksi kunakin kertymävaiheen ajankohtana; ks. lisäys 7). Jos k_2- ja $C_{0,d}$-arvoja ei voida johtaa esimerkiksi sen takia, että pitoisuudet laskevat alle havaitsemisrajan poistumavaiheen toiseen näytteenottokertaan mennessä, k_2-arvo ja BMF_k-arvon yläraja voidaan arvioida suuntaa-antavasti (ks. lisäys 7).

Kun assimilaatioteho (α) on saavutettu, biomagnifikaatiokerroin voidaan laskea kertomalla α ruoan imeytymisvakiolla (I) ja jakamalla tulo (yleisellä) poistumavakiolla (k_2). Kasvukorjattu biomagnifikaatiokerroin lasketaan muuten samalla tavalla, mutta laskennassa käytetään kasvukorjattua poistumavakiota (k_{2g}; ks. 162 ja 163 kohta). Assimilaatioteholle voidaan myös johtaa vaihtoehtoinen arvio, jos kertymävaiheen alkupuolella lineaarisessa vaiheessa näytteeksi otetuille kaloille on tehty kudosanalyysi (ks. 151 kohta ja lisäys 7). Kyseessä on riippumaton arvio assimilaatiotehosta pääasiassa altistamattomissa organismeissa (eli kalat ovat juuri aloittamassa kertymävaiheen). Poistumatietojen perusteella arvioitua assimilaatiotehoa käytetään tavallisesti BMF:n johtamisessa.

Korjaaminen rasvapitoisuuden ja kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan

Poistumavaiheessa tapahtuva kasvu voi alentaa kaloissa mitattua kemikaalipitoisuutta, minkä johdosta yleinen poistumavakio k_2 on suurempi kuin pelkkien poistoprosessien (esim. metabolismi ja ulostaminen) seurauksena syntyvä vakio (ks. 72 kohta). Testikalojen rasvapitoisuus (joka on selvästi sidoksissa hydrofobisten aineiden bioakkumulaatioon) sekä ruoan rasvapitoisuus voivat käytännössä vaihdella sen verran, että niitä on korjattava, jotta biomagnifikaatiokertoimet voidaan esittää tarkoituksenmukaisesti. Biomagnifikaatiokerroin pitäisi korjata kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan (kuten kineettinen BCF vesialtistuksessa) sekä ruoan rasvapitoisuuden mukaan suhteessa kalan rasvapitoisuuteen (rasvapitoisuuden korjauskerroin). Näitä laskutoimituksia koskevia yhtälöitä esitellään liitteessä 5 ja esimerkkejä liitteessä 7.

Kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan tehtävää korjausta varten on laskettava kasvukorjattu poistumavakio k_{2g} (ks. yhtälöt liitteessä 5). Kasvukorjattua

▼M7

poistumavakiota (k_{2g}) käytetään kasvukorjatun biomagnifikaatiokertoimen laskennassa, kuten esitetään 73 kohdassa. Joissakin tapauksissa tämä lähestymistapa ei ole mahdollinen. On olemassa vaihtoehtoinen lähestymistapa, joka ei edellytä korjaamista kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan. Siinä käytetään testiaineen massaa koskevia poistumatietoja kalakohtaisesti (kokonainen kala perusteena) sen sijaan, että testiaineen massaa koskevat tiedot suhteutettaisiin kalan massayksikköä (pitoisuutta) koskeviin tietoihin. Tämä voidaan tehdä helposti, koska kyseisessä testimenetelmässä kudoksissa havaitut pitoisuudet pitää liittää yksittäisten kalojen painoon. Tätä koskevaa yksinkertaista menettelyä kuvataan liitteessä 5. On huomattava, että k_2 pitää arvioida ja raportoida myös vaihtoehtoista lähestymistapaa sovellettaessa.

Jos kaikista näytteeksi otetuista kaloista ei ole analysoitu rasvapitoisuutta, ruoan ja kalan rasvapitoisuuden mukainen korjaaminen edellyttää, että sekä kaloille että ruoalle johdetaan keskimääräiset rasvaosuudet (tuorepainoon verrattuna) ([1]). Rasvapitoisuuden korjauskerroin (L_c) lasketaan tämän jälkeen jakamalla kalan keskimääräinen rasvaosuus ruoan keskimääräisellä rasvaosuudella. Biomagnifikaatiokerroin, tarvittaessa kasvukorjattuna, jaetaan rasvapitoisuuden korjauskertoimella rasvapitoisuuden mukaan korjatun biomagnifikaation laskemiseksi.

Jos kemikaali- ja rasvapitoisuudet on analysoitu kaikissa näytteenottopisteissä samoista kaloista, yksittäisten kalojen kudoksista saatuja ja rasvapitoisuuden mukaan korjattuja tietoja voidaan käyttää suoraan rasvapitoisuuden mukaan korjatun BMF:n laskennassa (ks. 37 kohta). Rasvapitoisuuden mukaan korjatun pitoisuuskäyrän tiedot osoittavat rasvapitoisuuteen perustuvan $C_{0,d}$-arvon sekä k_2-arvon. Tämän jälkeen voidaan tehdä matemaattinen analyysi käyttäen liitteessä 7 esitettyjä yhtälöitä, mutta assimilaatioteho (a) lasketaan käyttäen rasvapitoisuuden mukaan normalisoitua ruoan imeytymisvakiota (I_{rasva}) ja rasvapitoisuuteen perustuvaa pitoisuutta ruokavaliossa ($C_{ruoka\text{-}rasva}$). Rasvapitoisuuden mukaan korjattuja muuttujia käytetään samalla tavalla BMF:n laskemisessa (huomaa, että rasvaosuuteen pitäisi myös soveltaa mieluummin korjattua kasvuvakiota kuin kalan tuorepainoa rasvapitoisuuden ja kasvun mukaan korjatun BMF_{KgL}-arvon laskemiseksi).

Tulosten tulkinta

Testi- ja vertailuryhmien kalojen keskimääräinen kasvu ei saisi periaatteessa erota merkittävästi, jotta voidaan sulkea pois toksisuus. Kummankin ryhmän kasvuvakioita tai kasvukäyriä pitäisi verrata tarkoitukseen sopivalla menetelmällä ([2])).

Testiraportti

Tutkimuksen päätyttyä laaditaan loppuseloste, joka sisältää tiedot *testiaineesta*, *testatuista lajeista* sekä *testiolosuhteista*, kuten mainitaan 81 kohdassa (samat tiedot kuin vesialtistuksessa). Lisäksi on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— Kaikki tiedot testiaineen stabiiliudesta käsitellyssä ruoassa.

([1]) Tämä lähestymistapa koskee vain ravinnon välityksellä tehtävää tutkimusta, joten menettely on erilainen kuin vesialtistuksessa. Sekaannusten välttämiseksi käytetään siksi ”normalisoinnin” sijasta mieluummin käsitettä ”korjaaminen”. Ks. myös alaviite kappaleessa 106.

([2]) Kasvuvakioita koskeva *t*-testi voidaan tehdä sen määrittämiseksi, onko vertailu- ja testiryhmien kalojen kasvussa eroja. Vaihtelu voidaan analysoida *F*-testillä. *F*-testiä tai uskottavuusosamäärätestiä voidaan tarvittaessa käyttää apuna sopivan kasvumallin valinnassa (OECD monograph 54, (32).

▼M7

Testiolosuhteet:

— Aineen nimellinen pitoisuus ruoassa, testiaineen lisäämisessä käytetty tekniikka, testiaineen lisäämisessä käytetyn kantaja-aineen (rasvan) määrä (tarvittaessa), testiainetta sisältävässä ruoassa olevaa testiaineen pitoisuutta koskevat mittaustiedot kultakin analysointikerralta (tiedot mitataan vähintään kolmeen otteeseen ennen tutkimuksen alkamista sekä kertymävaiheen lopussa) sekä keskimääräiset arvot.

— Jos testiaineen lisäämisessä ruokaan on käytetty kantaja-aineena öljyä tai liuotinta, sen tyyppi ja laatu (laatuluokka, toimittaja ja niin edelleen).

— Käytetyn ruoan tyyppi (suuntaa-antava analyysi ([1]), laatuluokka tai toimittaja ja niin edelleen), ruokkimistaajuus kertymävaiheessa, annetun ruoan määrä ja ruokkimistiheys (sekä tiedot niihin näytekalojen painon perusteella mahdollisesti tehdyistä muutoksista).

— Ajankohta, jona kalat kerättiin ja tainnutettiin kemikaalien analysointia varten kussakin näytteenottopisteessä (esim. tuntia ennen seuraavan päivän ruokintaa).

Tulokset:

— Mahdollisista esikokeista saadut tulokset.

— Tiedot mahdollisista havaituista haittavaikutuksista.

— Kattava kuvaus kaikista kemikaalien analysoinnissa käytetyistä menettelyistä havaitsemis- ja kvantifiointirajat, vaihtelu ja saanto mukaan luettuina.

— Ruoassa (sekä testiainetta sisältävä että vertailuruokavalio) mitatut rasvapitoisuudet, keskiarvot ja standardit poikkeamat.

— Taulukoidut tiedot kalojen painosta (ja pituudesta) liitettyinä yksittäisten kalojen tietoihin sekä vertailu- että altistusryhmässä (esimerkiksi käyttämällä kustakin kalasta yksilökohtaista tunnistetta) sekä niitä koskevat laskutoimitukset, johdettu kasvuvakio (tai johdetut kasvuvakiot) ja 95 prosentin luottamusväli(t).

— Taulukoidut tiedot kaloissa todetusta testiainepitoisuudesta, mitattujen pitoisuuksien keskiarvo kertymävaiheen lopussa ($C_{0,m}$), johdettu (yleinen) poistumavakio (k_2), pitoisuus kaloissa poistumavaiheen alussa ($C_{0,d}$) sekä mainituissa arvoissa esiintyvä vaihtelu (kulmakerroin ja leikkauspiste).

— Taulukoidut tiedot kalojen rasvapitoisuudesta (lueteltuina suhteessa tiettyjen aineiden pitoisuuksiin, jos mahdollista) sekä testi- ja vertailuryhmän keskiarvot testin alussa, kertymävaiheen lopussa ja poistumavaiheen lopussa.

— Käyrät (kaikki mittaustiedot mukaan luettuina), jotka osoittavat seuraavat seikat (tarvittaessa pitoisuudet voidaan ilmaista suhteessa kalan kokonaispainoon tai tiettyihin kudoksiin):

  — kasvu (eli kalan painon ja pituuden kehitys tiettynä aikana) tai luonnollisen logaritmin mukaan muunnettu paino aikaan suhteutettuna

([1]) Elintarvikkeiden sisältämän proteiinin, rasvan, raakakuidun ja tuhkan analyysitekniikka. Tämän tiedon saa tavallisesti rehun toimittajalta.

▼M7

— testiaineen poistuma kaloista

— luonnollisen logaritmin mukaan muunnettu pitoisuus (lineaarinen pitoisuus) suhteessa poistuma-aikaan (mukaan luettuina johdettu poistumavakio k_2 sekä luonnollisen logaritmin mukaan johdettu pitoisuus kaloissa poistumavaiheen alkaessa, $C_{0,d}$).

— Jos käyrissä on silmämääräisesti havaittavissa selviä poikkeamia, poikkeavat arvot voidaan korjata tilastollisen pätevyyden testillä virheellisten datapisteiden poistamiseksi. Poistamiselle on esitettävä perustelut.

— Laskettu ja kasvukorjattu poistumavakio ja kasvukorjattu puoliintumisaika.

— Laskettu assimilaatioteho (α).

— ”Suoraan saatu” ravintoon liittyvä BMF, rasvapitoisuuden ja kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan korjattu kineettinen BMF (”suoraan saatu” ja rasvapitoisuuden mukaan korjattu suhteessa kokonaisen kalan tuorepainoon sekä kudoskohtainen BMF, jos se on tiedossa).

— Mahdolliset tiedot radioaktiivisten merkkiaineiden metaboliiteista ja niiden kertymisestä.

— Mahdolliset epätavalliset tapahtumat testin aikana, poikkeamat näistä menettelyistä ja muut mahdolliset asiaan liittyvät tiedot.

— Yhteenvetotaulukko merkityksellisistä määritetyistä ja laskennallisista tiedoista seuraavasti:

Aineen poistumavakiot ja biomagnifikaatiokertoimet (BMF_K)	
k_g (kasvuvakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) ([1])
k_2 (yleinen poistumavakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI)
k_{2g} (kasvukorjattu poistumavakio; vrk^{-1}):	Lisää arvo (95 %:n CI) ([1])
$C_{0,m}$ (nolla-ajankohtana mitattu pitoisuus, pitoisuus kaloissa kertymävaiheen lopussa) (µg/g):	Lisää arvo ± SD ([2])
$C_{0,d}$ (poistumavaiheen nolla-ajankohtana johdettu pitoisuus; µg/g):	Lisää arvo ± SD ([2])
I (määritetty rehun imeytymisvakio; g ruokaa / g kalaa / vrk):	Lisää arvo
I_g (todellinen ruokkimistaajuus kasvun mukaan mukautettuna; g ruokaa / g kalaa / vrk) ([2]):	Lisää arvo ± SD ([2])
C_{ruoka} (kemikaalipitoisuus ruoassa; µg/g):	Lisää arvo ± SD ([2])
α (aineen assimilaatioteho):	Lisää arvo ± SD ([2])
BMF_K (ravintoon liittyvä kineettinen BMF):	Lisää arvo (95 %:n CI) ([1])
BMF_{Kg} (ravintoon liittyvä kasvukorjattu kineettinen BMF):	Lisää arvo (95 %:n CI) ([1])

▼M7

Aineen poistumavakiot ja biomagnifikaatiokertoimet (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (kasvukorjattu puoliintumisaika vuorokausina):	Lisää arvo ± SD ([2])
Lc (rasvapitoisuuden korjauskerroin):	Lisää arvo
BMF_{KgL} (rasvapitoisuuden ja kasvun mukaan korjattu kineettinen BMF):	Lisää arvo
$BMF_{SS\text{-}L}$ (suuntaa-antava rasvapitoisuuden mukaan korjattu tasapainotilan BMF) ([2]):	Lisää arvo ± SD ([2])

([1]) CI, Confidence interval: luottamusväli (kun mahdollista arvioida).
([2]) SD, Standard deviation: standardipoikkeama (kun mahdollista arvioida).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Tässä liitteessä oleva C.13 luku, *Biokertyvyys: läpivirtaustesti kaloilla*.

(2) Tässä liitteessä oleva A.6 luku, *Vesiliukoisuus*

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031–2035

(4) Tässä liitteessä oleva A.8 luku, Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi): Ravistuspullomenetelmä.

(5) *Tässä liitteessä oleva A.24 luku, Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi), korkean suorituskyvyn nestekromatografia (hplc-menetelmä).*

(6) *Tässä liitteessä oleva A.23 luku, Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi), hitaan sekoituksen menetelmä.*

(7) *Tässä liitteessä oleva C.7 luku, Hydrolyysi pH:n funktiona.*

(8) (OECD (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) *Tässä liitteessä oleva A.5 luku, Pintajännitys.*

(10) *Tässä liitteessä oleva A.4 luku, Höyrynpaine.*

(11) *Tässä liitteessä oleva C.4 luku, Biohajoavuuden määritys.*

(12) *Tässä liitteessä oleva C.29 luku, Biohajoavuus – CO_2 suljetuissa astioissa*

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117–156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29–39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097–4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058–2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206–218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139–155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436–2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) Tässä liitteessä oleva C.47 luku, Toksisuustesti kaloilla niiden varhaiskehitysvaiheessa.

(23) Tässä liitteessä oleva C.15 luku, Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

(24) Tässä liitteessä oleva C.14 luku, Fish, Juvenile Growth Test.

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911–917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099–1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711–1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168–1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775–1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study – Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173–189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829–833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699–707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219–229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624–637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769–2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130–135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951–961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503–2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718–1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I – Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II – Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Altistus- eli kertymävaihe tarkoittaa ajanjaksoa, jona kalat altistetaan testiaineelle.

Assimilaatioteholla (α) mitataan suolistosta organismiin absorboituvan aineen suhteellista määrää (assimilaatioteholla ei ole yksikköä, mutta se ilmaistaan usein mieluummin prosentteina kuin fraktiona).

Bioakkumulaatiolla tarkoitetaan tavallisesti prosessia, jonka aikana aineen pitoisuus organismissa ylittää hengityksen mahdollistavassa elementissä (esim. kaloilla vedessä ja nisäkkäillä ilmassa), ruoassa tai kummassakin vallitsevan tason(1).

Biokertyvyys (biokonsentraatio) on organismissa tai sen pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa tai kudoksen pinnalla) olevan testiainepitoisuuden lisääntymistä, joka liittyy testiaineen pitoisuuteen väliaineessa.

Biokertyvyystekijä (bioconcentration factor BCF tai K_B) osoittaa minä tahansa tämän akkumulaatiotestin kertymävaiheen ajankohtana testiaineen pitoisuuden kalassa (kalan pinnalla) tai tietyssä kalan kudoksessa (C_f, mg/kg) jaettuna kyseisen aineen pitoisuudella väliaineessa (C_w, mg/l). BCF:n yksikkö on l kg^{-1}. Huomaa, että kasvun ja/tai standardin rasvapitoisuuden mukaan tehtyjä korjauksia ei oteta huomioon.

Biomagnifikaatio on organismissa tai sen pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa tai kudoksen pinnalla) olevan testiainepitoisuuden lisääntymistä, joka liittyy testiaineen pitoisuuteen ruoassa.

Biomagnifikaatiokerroin (BMF) ilmaisee aineen pitoisuuden petokalassa suhteessa petokalan saaliiseen (tai ruokaan) tasapainotilassa. Tässä osiossa kuvatussa menetelmässä vesialtistusvaihe pyritään nimenomaan välttämään, minkä takia tämän testimenetelmän tuloksena saatavaa BMF-arvoa ei voida verrata suoraan kenttätutkimuksissa saatavaan BMF-arvoon (koska niissä voidaan yhdistää sekä veden että ravinnon välityksellä tapahtuva altistus).

Kemikaali on aine tai seos.

Kertymävakio (k_1) on numeerinen arvo, joka määrittelee testiaineen pitoisuuden lisääntymisen nopeuden kaloissa tai kalojen pinnalla (tai niiden tietyissä kudoksissa), kun kalat altistetaan kyseiselle aineelle (k_1:n yksikkö on l kg^{-1} vuorokausi-).

Kiinteäfaasiuutto (SPME) on laimennusjärjestelmiä varten kehitetty analyysitekniikka, jossa ei käytetä liuotinaineita. Tässä menetelmässä polymeereillä valeltu kuitu altistetaan kaasu- tai nestefaasille, joka sisältää kiinnostuksen kohteena olevaa analyyttia. Yleensä analyysille määritetään vähimmäiskesto, jotta kiinteän ja nestemäisen vaiheen välille voidaan määrittää tasapainotila määrityksen kohteena olevasta lajista riippuen. Kiinnostuksen kohteena olevan analyytin pitoisuus voidaan tämän jälkeen tekniikasta riippuen määrittää joko suoraan kuidusta tai kun se on uutettu kuidusta liuotinaineeseen.

Kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_K) ilmaisee kertymävakion k_1 suhteessa poistumavakioon k_2 (k_1/k_2; ks. tässä liitteessä annetut määritelmät). Tämän arvon pitäisi periaatteessa olla verrattavissa BCF_{SS}-arvoon (ks. määritelmä edellä), mutta poikkeamia saattaa esiintyä, jos tasapainotilan saavuttamisesta ei ole varmuutta tai kineettistä BCF:ää on korjattu kasvun mukaan.

Liuennut orgaaninen hiili (DOC) on mitta, joka ilmaisee liuenneista orgaanisista lähteistä peräisin olevan hiilen pitoisuuden väliaineessa.

▼M7

Lyhenne UCVB tarkoittaa koostumukseltaan tuntemattomia tai vaihtelevia aineita, kompleksien reaktiotuotteita tai biologista materiaalia (Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products and Biological materials).

Oktanoli-vesi-jakautumiskerroin (K_{OW}) on aineen n-oktanoliliukoisuuden ja vesiliukoisuuden suhde tasapainotilassa (menetelmät A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)), josta käytetään myös merkintää P_{OW}. K_{OW}:n logaritmia käytetään merkitsemään aineen biokertyvyyttä vesieliöissä.

Orgaanisen hiilen kokonaismäärä (TOC) on mitta, joka ilmaisee kaikista orgaanisista lähteistä peräisin olevan hiilen pitoisuuden väliaineessa partikkelimuodossa olevat ja liuenneet lähteet mukaan luettuina.

Partikkelimuodossa oleva orgaaninen hiili (POC) on mitta, joka ilmaisee suspendoituneista orgaanisista lähteistä peräisin olevan hiilen pitoisuuden väliaineessa.

Poistumavaihe tai altistuksen jälkeinen vaihe on ajanjakso, joka alkaa, kun testattavat kalat on siirretty testiainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta, ja jonka aikana tutkitaan kyseisen aineen (netto)poistumaa testattavista kaloista (tai niiden tietyistä kudoksista).

Poistumavakio (k_2) on numeerinen arvo, joka kuvaa testiaineen pitoisuuden alenemisen nopeutta kaloissa (tai niiden tietyssä kudoksessa), kun kalat on siirretty testiainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta (k_2:n yksikkö on vuorokausi^{-1}).

Rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kasvukorjattu kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_{KgL}) normalisoidaan kalan viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaan ja korjataan kasvun perusteella tutkimuksen aikana, kuten kuvataan liitteessä 5.

Rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kineettinen biokertyvyystekijä (BCF_{KL}) normalisoidaan kalan viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti.

Rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SSL}) normalisoidaan kalan viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti.

Ravintoon liittyvä biomagnifikaatiokerroin: Tässä testimenetelmässä käytetään ilmaisua ravintoon liittyvä biomagnifikaatiokerroin (ravintoon liittyvä BMF) kuvattaessa ravinnon välityksellä tapahtuvaa altistusta, jossa vesialtistusvaihe pyritään nimenomaan välttämään, minkä takia tämän testimenetelmän tuloksena saatavaa ruoan BMF-arvoa ei voida verrata suoraan kenttätutkimuksissa saatavaan BMF-arvoon (koska niissä voidaan yhdistää sekä veden että ravinnon välityksellä tapahtuva altistus).

Ruoan imeytymisvakio (I) tarkoittaa kunkin kalan päivittäin syömän ruoan keskiarvoa suhteessa kokonaisen kalan arvioituun ruumiinpainoon (yksikkönä g ruokaa / g kalaa / vuorokausi).

Tasapainotila saavutetaan kalassa esiintyvän testiaineen määrää (Ct) ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä Ct-määritystä ovat samat ± 20 prosenttia eikä Ct ole kasvanut merkittävästi ensimmäisen ja viimeisen perättäisen määrityksen välisenä aikana. Yhdistettyjä näytteitä määritettäessä vaaditaan vähintään neljä perättäistä määritystä. Kun testataan aineita, joiden kertyminen kudoksiin tapahtuu hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta.

Tasapainotilan biokertyvyystekijä (BCF_{SS}) ei muutu merkittävästi pitkällä aikavälillä, kun testiaineen pitoisuus väliaineessa on vakio tänä aikana (ks. tasapainotilan määritelmä).

▼**M7**

Testikemikaali on mikä tahansa tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Useista ainesosista koostuvat aineet määritellään REACH-asetuksessa aineiksi, jotka koostuvat useammasta kuin yhdestä sellaisesta pääainesosasta, jonka pitoisuus on 10–80 prosenttia (tuorepainosta).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments, Integr. Environ. Assess. Manag. 5: s. 624–637

(2) Tässä liitteessä oleva A.8 luku: *Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi) – ravistuspullomenetelmä*.

(3) Tässä liitteessä oleva A.24 luku: *Jakaantumiskerroin (n-oktanoli/vesi) – HPLC-menetelmä*.

(4) Tässä liitteessä oleva A.23 luku: *Jakaantumiskerroin (1-oktanoli/vesi) – hidassekoitusmenetelmä*.

▼**M7**

Lisäys 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Ainesosa	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
Alumiini	1 µg/l
Arseeni	1 µg/l
Kromi	1 µg/l
Koboltti	1 µg/l
Kupari	1 µg/l
Rauta	1 µg/l
Lyijy	1 µg/l
Nikkeli	1 µg/l
Sinkki	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Elohopea	100 ng/l
Hopea	100 ng/l

▼M7

Lisäys 3

KALALAJIT, JOITA SUOSITELLAAN KÄYTETTÄVÄKSI TESTISSÄ

Suositeltu laji	Suositeltu lämpötila-väli (°C)	Suositeltu koe-eläimen kokonaispituus (cm) ([2])
Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Seeprakala	20–25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Paksupäämutu	20–25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karppi	20–25	8,0 ± 4,0 ([3])
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck ja Schlegel) Medaka	20–25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poecilliidae) (Peters) engl. Guppy	20–25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei Centrarchidae) (Rafinesque) Isoaurinkoahven	20–25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei Salmonidae) (Walbaum) Kirjolohi	13–17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Kolmipiikki	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer *et al.* (1)

([2]) Olisi otettava huomion, että itse testissä pidetään painoa parempana yksikkönä koon mittaamisessa ja kasvuvakion johtamisessa. Yleisesti kuitenkin tunnustetaan, että pituus on käytännöllisempi mittari, jos kalat on valittava kokeen alussa silmämääräisesti (kantapopulaatiosta).

([3]) Tämä pituuden vaihteluväli määritetään Japanin kemikaalivalvontalakiin perustuvissa uusia kemikaaleja jne. koskevissa testimenetelmissä.

Erilaisia suisto- ja merikalalajeja on käytetty vähemmän. Esimerkkejä:

Puoliraitarummuttaja (*Leiostomus xanthurus*)

Loistohammaskarppi (*Cyprinodon variegatus*)

Hopeakylki (*Menidia beryllina*)

Shiner perch *(engl.)* (*Cymatogaster aggregata*)

Kielikampela (*Parophrys vetulus*)

Simppu (*Leptocottus armatus*)

Kolmipiikki (*Gasterosteus aculeatus*)

Meribassi (*Dicentracus labrax*)

Salakka (*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Edellä olevassa taulukossa lueteltuja makean veden kaloja on helppo kasvattaa ja/tai niitä on helposti saatavissa läpi vuoden, kun taas meri- tai suistokalalajeja on lähinnä saatavissa tiettyjä meriä ja suistoja ympäröivissä maissa. Niitä voidaan kasvattaa joko kalanviljelylaitoksissa tai laboratorioissa, joissa voidaan torjua tauteja ja loisia niin, että saadaan terveitä koe-eläimiä, joiden alku/sukuperä tunnetaan. Näitä kaloja on saatavissa eri puolilla maailmaa.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231–236.

▼M7

Lisäys 4

NÄYTTEENOTTOAIKATAULUT VEDEN JA RAVINNON VÄLITYKSELLÄ TEHTÄVISSÄ ALTISTUSTESTEISSÄ

1. **Teoreettinen esimerkki näytteenottoaikataulusta kattavassa vesialtistukseen perustuvassa biokertyvyystestissä aineilla, joiden log K_{OW} = 4.**

Kalanäytteiden otto	Näytteenottoaikataulu		Vesinäytteiden lukumäärä (1)	Kalojen lukumäärä näytettä kohti (1)
	Vaadittu vähimmäistaajuus (vrk) (2)	Lisänäytteiden otto (vrk) (2)		
Kertymävaihe				
1	– 1		2 (3)	4 (4)
	0		(2)	(3 (6))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 (5)
				(3 (6))
Poistumavaihe				Kalojen siirto veteen, jossa ei ole testiainetta
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 – 8 (5)
		17,5		(4 + 3 (6))
YHTEENSÄ				40–72 (48 – 80) (5)

(1) Suluissa olevat luvut osoittavat mahdollisten lisänäytteiden (vesi/kala) määrän.
(2) Ennen testiä tehty arvio k_2-arvosta, kun log K_{OW} 4,0 on 0,652 vrk^{-1}. Koko kokeen kesto on 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 vrk, eli 14 vuorokautta. T_{SS}-arvon arviointia varten katso lisäys 5.
(3) Vedestä otetaan näyte, kun kammioon on lisätty vähintään 3 kammion tilavuutta vettä.
(4) Nämä kalat valitaan näytettä varten kantapopulaatiosta.
(5) Jos testin on oltava tarkempi tai on tutkittava metaboloituminen, jolloin tarvitaan enemmän kaloja, näytekalat on valittava kertymävaiheen ja poistumavaiheen lopussa (ks. 40 kohta).
(6) Rasvapitoisuuden analysointiin saatetaan tarvitaan vähintään kolme kalaa enemmän, jos samoja kaloja ei voida käyttää ainepitoisuuden määrittämiseen testin alussa, kertymävaiheen lopussa ja poistumavaiheen lopussa. Huomaa, että monissa tapauksissa kolme vertailuryhmän kalaa saattaa riittää (ks. 56 kohta).

▼M7

2. **Teoreettinen esimerkki näytteenottoaikataulusta testattaessa aineen bioakkumulaatiota ravinnon välityksellä, kun kertymävaihe kestää 10 vuorokautta ja poistumavaihe 42 vuorokautta.**

Näytteenotto	Näytteenottoaikataulu		Ravintonäytteiden määrä	Kalojen määrä näytettä kohti	
	Päivä ko. vaiheessa	Ylimääräisten kalanäytteiden tarve		Testiryhmä	Vertailuryhmä
Kertymävaihe					
1	0	Mahdollinen (1) (2)	3 – testiryhmä	0	5–10
			3 – vertailuryhmä (1)		(8–13) (2)
1A (3)	1–3			5–10	5–10
2	10	Kyllä (4)	3 – testiryhmä	10–15 (4)	5–10
			3 – vertailuryhmä (1)	(13–18) (5)	(8–13) (5)
Poistumavaihe					
3	1	Kyllä (4)		10–15 (4)	5–10
4	2			5–10	5–10
5	4			5–10	5–10
6	7	Kyllä (4)		10–15 (4)	5–10
7	14			5–10	5–10
8	28			5–10	5–10
9	42	Kyllä (4)		10–15 (4) (13–18) (5)	5–10 (8–13) (5)
YHTEENSÄ				59–120 (63–126) (4) (5)	50–110 (56–116) (4) (5)

(1) Vertailu- ja testiryhmässä otetaan kummassakin kolme rehunäytettä, joista analysoidaan testiaine- ja rasvapitoisuudet.
(2) Näytteeksi otettava kalat valitaan kantapopulaatiosta mahdollisimman lähellä testin alkamista. Kantapopulaatiosta valitaan vähintään kolme kalaa, joista mitataan rasvapitoisuus.
(3) Kertymävaiheen alussa voidaan (valinnaisesti) ottaa näyte, josta lasketaan testiaineen assimiloituminen ravinnon kautta, ja näitä tuloksia verrataan poistumavaiheen tietojen perusteella laskettuun assimilaatiotehoon.
(4) Kudoskohtaista analyysia varten voidaan ottaa näytteeksi viisi ylimääräistä kalaa.
(5) Rasvapitoisuuden analysointiin saatetaan tarvitaan vähintään kolme kalaa enemmän, jos samoja kaloja ei voida käyttää ainepitoisuuden määrittämiseen testin alussa, kertymävaiheen lopussa ja poistumavaiheen lopussa. Huomaa, että monissa tapauksissa kolme vertailuryhmän kalaa saattaa riittää (ks. 56 ja 153 kohta).

Huomioita eri vaiheita ja näytteenottoa koskevista aikatauluista: Kertymävaihe alkaa, kun kaloille annetaan ensimmäisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa. Testivuorokausi alkaa ruokinnasta ja päättyy juuri ennen seuraavaa ruokintaa 24 tuntia myöhemmin. Ensimmäinen näyte (nro 1 taulukossa) pitäisi ottaa juuri ennen (esimerkiksi tuntia ennen) ensimmäistä ruokintaa. Tutkimuksen aikana näyte otetaan mieluiten juuri ennen seuraavan päivän ruokintaa (eli noin 23 tuntia edellisen näytepäivän ruokinnan jälkeen). Kertymävaihe päättyy juuri ennen hetkeä, jona kaloille annetaan ensimmäistä kertaa ruokaa, joka ei sisällä testiainetta, ja jolloin poistumavaihe alkaa (testiainetta saattaa olla testiryhmän kalojen ruoansulatusjärjestelmässä 24 tunnin ajan sen jälkeen, kun niille on annettu viimeisen kerran testiainetta sisältävää ruokaa). Näin ollen kertymävaiheen viimeinen näyte pitäisi ottaa juuri ennen kuin kaloille annetaan ruokaa, joka ei sisällä testiainetta, ja poistumavaiheen ensimmäinen näyte noin 23 tuntia tämän jälkeen.

▼M7

Lisäys 5

YLEISET LASKUTOIMITUKSET

1. Johdanto

2. Kertymävaiheen keston arvioiminen

3. Poistumavaiheen keston arvioiminen

4. Vaiheittainen menetelmä: poistumavakion k2 määrittäminen

5. Vaiheittainen menetelmä: kertymävakion k1 määrittäminen (vain veden välityksellä tehtävässä altistuksessa)

6. Kertymä- ja poistumavakioiden laskennassa sovellettava samanaikaismenetelmä (vain veden välityksellä tehtävä altistus)

7. Kineettisen BCF:n ja BMF:n korjaaminen kasvun mukaan

8. Rasvapitoisuuden normalisointi viiden prosentin rasvapitoisuuden mukaisesti (koskee ainoastaan vesialtistusmenetelmää)

1. JOHDANTO

Veden välityksellä tapahtuvan biokertyvyyden yleinen malli voidaan kuvata kaloilla kertymä- ja poistumaprosesseina ruoan kautta tapahtuvasta kertymästä välittämättä. Kaloissa olevien pitoisuuksien ($mg \cdot kg^{-1} \cdot vrk^{-1}$) muutosvakiota koskeva erotuskaavio (dC_f/dt) saadaan seuraavasti (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Yhtälö A5.1]}$$

Tässä yhtälössä:

k_1 = ensimmäisen asteen kertymävakio kaloissa ($l \cdot kg^{-1} \cdot vrk^{-1}$).

k_2 = ensimmäisen asteen poistumavakio kaloista (vrk^{-1}).

k_g = ensimmäisen asteen kasvuvakio kaloilla (”kasvun aiheuttama liukeneminen”) (vrk^{-1})

k_m = ensimmäisen asteen metabolinen vaikutus (vrk^{-1})

k_e = ensimmäisen asteen uloste-eritys (vrk^{-1})

C_w = pitoisuus vedessä ($mg \cdot l^{-1}$).

C_f = pitoisuus kaloissa ($mg \cdot kg^{-1}$ tuorepainosta).

Biokertyvillä aineilla on odotettavissa, että aikapainotettu keskiarvo osoittaa parhaiten hyväksyttävän vaihteluvälin rajoissa olevan altistuspitoisuuden vedessä (C_w) (ks. 24 kohta). Pitoisuuksien aikapainotettu keskiarvo (TWA) vedessä on suositeltavaa laskea testimenetelmän C.20 liitteessä 6 esitettyä menettelyä noudattaen (2). On huomattava, että vesipitoisuuden lineaarinen muutos on sopiva, kun uusiutumiskausien välissä on odotettavissa eksponentiaalista hajoamista, kuten puolistaattisessa testijärjestelmässä. Läpivirtausjärjestelmässä altistuspitoisuuksien lineaarinen muutos ei välttämättä ole tarpeellinen. Jos aikapainotetut keskiarvot vedessä on johdettu, ne on ilmoitettava ja niitä on käytettävä myöhemmissä laskelmissa.

Standardissa kaloilla tehtävässä BCF-testissä kertymä ja poistuma voidaan kuvata kahden ensimmäisen asteen kineettisen prosessin mukaisesti.

▼M7

$ertymä = k_1 \times C_w$ [Yhtälö A5.2]

$kokonaispoistuma = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Yhtälö A5.3]

Tasapainotilassa kasvun ja metaboloitumisen arvioinnilla ei ole merkitystä (k_g- ja k_m-arvoja ei voida erottaa nollasta) ja kertymävakio vastaa poistumavakiota, joten yhtälöt A5.2 ja A5.3 osoittavat yhdistettyinä seuraavan suhteen:

$$BCF = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Yhtälö A5.4]

Tässä:

$C_{f\text{-}SS}$ = pitoisuus kaloissa tasapainotilassa (mg kg^{-1} tuorepaino).

$C_{w\text{-}SS}$ = pitoisuus vedessä tasapainotilassa (mg l^{-1}).

k_1:n ja k_2:n suhde on kineettinen BCF (BCF_K), jonka pitäisi vastata tasapainotilan BCF-arvoa (BCF_{SS}), joka saadaan vertaamalla tasapainotilan pitoisuutta kaloissa vastaavaan pitoisuuteen vedessä. Poikkeamia voi kuitenkin esiintyä, jos tasapainotilan saavuttaminen ei ole varmaa tai kineettistä BCF:ää on korjattu kasvun mukaan. BCF_K-arvon johtaminen ei kuitenkaan edellytä tasapainotilan saavuttamista, koska $k_1$ja k_2 ovat vakioita.

Tässä lisäyksessä esitetään kyseisiin ensimmäisen asteen yhtälöihin perustuvat yleiset laskelmat, joita tarvitaan sekä veden että ravinnon välityksellä tehtävissä altistuksissa biokertyvyyden määrittämiseksi. Osat 5, 6 ja 8 koskevat vain veden välityksellä tehtävää altistusta, mutta ne ovat tässä mukana ”yleisinä” tekniikoina. Vaiheittaisilla menetelmillä (osat 4 ja 5) ja samanaikaismenetelmillä (osa 6) voidaan laskea kertymä- ja poistumavakiot, joita käytetään kineettisten BCF-arvojen laskennassa. Vaiheittainen menetelmä k_2:n määrittämiseksi (osa 4) on tärkeä ravintoaltistusmenetelmässä, koska sitä tarvitaan sekä assimilaatiotehon että BMF:n laskemisessa. Ravintoaltistusta soveltavassa menetelmässä tarvittavat erityislaskelmat esitetään yksityiskohtaisesti lisäyksessä 7.

2. KERTYMÄVAIHEEN KESTON ARVIOIMINEN

Ennen testin suorittamista voidaan arvioida k_2 ja määrittää jokin prosenttimäärä tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittavasta ajasta k_2:n ja n-oktanolivesi -jakautumiskertoimen (K_{OW}) tai k_1:n ja BCF:n välisten empiiristen suhteiden perusteella. On kuitenkin pidettävä mielessä, että tässä osassa esitellyt yhtälöt soveltuvat vain silloin, kun kertymä ja poistuma noudattavat ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos näin ei selvästikään ole ja kertymävaiheesta halutaan antaa ennusteita, kannattaa pyytää neuvoa biostatistiikan ja/tai farmakokinetiikan asiantuntijoilta.

Arvo k_2 (vrk^{-1}) voidaan arvioida monella eri menetelmällä. Ensisijaisesti voidaan käyttää esimerkiksi seuraavaa empiiristä suhdetta ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); Yhtälö A5.5]

tai

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [Yhtälö A5.6]

Jossa: $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (aineet, joiden $\log K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); Yhtälö A5.7]

([1]) Kuten kaikissa empiirisissä suhteissa, tässäkin on varmistettava, että testiaineeseen voidaan soveltaa kyseistä suhdetta.

▼M7

ja$BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot \log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5); Yhtälö A5.8]

W = käsiteltyjen kalojen keskipaino (grammaa tuorepainona) kertymävaiheen lopussa / poistumavaiheen alussa ([1])

Muista olennaisista suhteista *ks.* (6). K_2:n arvioinnissa voi olla hyödyllistä käyttää monimutkaisempia malleja, jos esimerkiksi merkittävä metaboloituminen on todennäköistä (7) (8). Mitä monimutkaisempaa mallia käytetään, sitä huolellisempi on oltava ennusteiden tulkinnassa. Esimerkiksi nitroryhmien esiintyminen voi olla merkki nopeasta metaboloitumisesta, mutta aina näin ei ole. Käyttäjän pitäisikin arvioida ennustemenetelmällä saatuja tuloksia kemiallisen rakenteen ja muiden olennaisten tietojen (kuten alustavien tutkimusten tulosten) perusteella tutkimuksen aikataulua suunnitellessaan.

Aika, joka tarvitaan tietyn prosenttiasteisen tasapainotilan saavuttamiseksi, voidaan laskea arvioidun k_2:n perusteella yleisestä kertymä- ja poistumavaihetta kuvaavasta yhtälöstä (ensimmäisen asteen kinetiikka) olettaen, että kasvu ja metaboloituminen ovat vähäisiä. Jos kalat kasvavat merkittävästi tutkimuksen aikana, alla kuvatut arviot eivät ole luotettavia. Tällaisissa tapauksissa on parempi soveltaa kasvukorjattua arvoa k_{2g}, kuten esitetään jäljempänä (ks. tämän liitteen osa 7):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Yhtälö A5.9]}$$

tai jos C_w on vakio:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Yhtälö A5.10]}$$

Kun lähestytään tasapainotilaa ($t \to \infty$), yhtälö A5.10 voidaan muuttaa (ks. (9) (10)) seuraavasti:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Yhtälö A5.11]}$$

tai

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Yhtälö A5.12]}$$

Tällöin BCF × C_w on lähellä pitoisuutta kalassa tasapainotilassa ($C_{f\text{-}SS}$). Huomautus: Samaa lähestymistapaa voidaan soveltaa arvioitaessa tasapainotilan BMF:ää ravinnon välityksellä tehtävässä testissä. Tällöin edellä esitetyissä yhtälöissä korvataan BCF BMF:llä ja C_w ruoassa mitatulla pitoisuudella C_{ruoka}.

Yhtälö A5.10 voidaan kirjoittaa seuraavasti:

$$C_f = C_{f-SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Yhtälö A5.13]}$$

tai

$$\frac{C_f}{C_{f-SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Yhtälö A5.14]}$$

Soveltamalla yhtälöä A5.14 voidaan arvioida aika, joka vaaditaan jonkin prosenttiasteen tasapainotilan saavuttamiseksi, kun k_2 on arvioitu ensin soveltamalla yhtälöä A5.5 tai A5.6.

Tilastollisesti paras kertymävaiheen kesto tilastollisesti hyväksyttävien tulosten saamiseksi (BCF_K) on aika, joka tarvitaan, jotta kalassa olevan testiainepitoisuuden logaritmia lineaarisen ajan funktiona kuvaava käyrä osoittaa vähintään 50-prosenttisen tasapainotilan (eli 0,69/k_2), mutta ei saavuta enempää

([1]) Kalojen paino kertymävaiheen lopussa voidaan arvioida aiempien tutkimustulosten perusteella tai sen mukaan, miten testattavan lajin tiedetään kasvavan tavanomaisen kertymävaiheen (jonka kesto on esimerkiksi 28 vuorokautta) aikana verrattuna normaalipainoon testin alussa.

▼M7

kuin 95 prosenttia tasapainotilasta (eli $3,0/k_2$) (11). Jos akkumulaatio saavuttaa yli 95 prosenttisesti tasapainotilan, voidaan laskea BCF_{SS}.

Aika, joka tarvitaan 80-prosenttisen tasapainotilan saavuttamiseen on (yhtälö A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Yhtälö A5.15]}$$

tai

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{[Yhtälö A5.16]}$$

Samaten aika, joka tarvitaan 95-prosenttisen tasapainotilan saavuttamiseen, on:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{[Yhtälö A5.17]}$$

Esimerkiksi kertymävaiheen kesto (eli aika, joka tarvitaan tietyn prosenttiosuuden saavuttamiseksi tasapainotilasta, esim. t_{80} tai t_{95}) aineella, jonka log K_{OW} = 4, olisi seuraava (kun käytetään yhtälöitä A5.5, A5.16 ja A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ vrk}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \textit{ days} \text{ (59 tuntia)}$$

tai kun käytetään $t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60$vrk (110 tuntia)

vaihtoehtoisesti seuraavaa yhtälöä:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (}\textit{tuntia}\text{)} \qquad \text{[Yhtälö A5.18]}$$

tosiasiallisen tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittavan ajan (t_{eSS}) laskemiseen (12). Aineella, jonka log K_{OW} = 4, tulos on seuraavanlainen:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \textit{ tuntia}$$

3. POISTUMAVAIHEEN KESTON ARVIOIMINEN

Ennakkoarvio ajasta, joka tarvitaan kertymän laskemiseksi tiettyyn prosenttimäärään alkupitoisuudesta, voidaan myös saada kertymä- ja poistumavaihetta kuvaavasta yleisestä yhtälöstä (kun oletuksena on ensimmäisen asteen kinetiikka, ks. yhtälö A5.9) (1) (13).

Poistumavaiheen C_w-arvoksi (tai C_{ruoka}-arvoksi, jos on kyse ravintoaltistustestistä) oletetaan nolla. Yhtälö voidaan tällöin esittää seuraavasti:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Yhtälö A5.19]}$$

tai

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Yhtälö A5.20]}$$

jossa $C_{f,0}$ on pitoisuus poistumavaiheen alussa.

Siten saavutetaan 50 prosentin poistuma ajankohtana (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

tai

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Samaten 95 prosentin poistuma saavutetaan seuraavana ajankohtana:

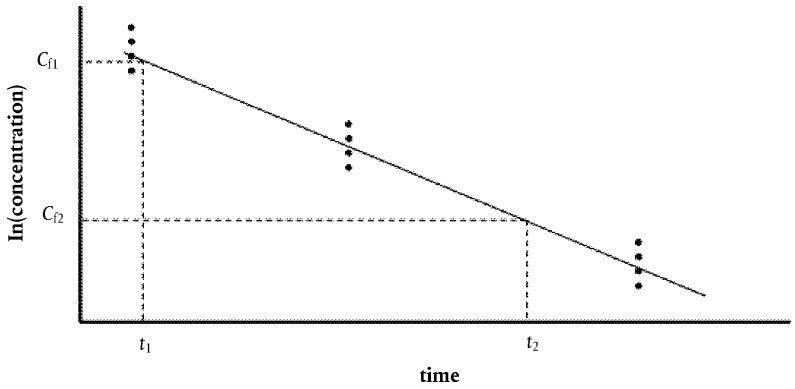
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Jos 80 prosentin kertymää käytetään ensimmäisessä vaiheessa ($1{,}6/k_2$) ja 95 prosentin poistumaa poistumavaiheessa ($3{,}0/k_2$), niin poistumavaihe on suunnilleen kaksi kertaa niin pitkä kuin kertymävaihe.

On huomattava, että arviot perustuvat oletukseen, että kertymä- ja poistumavaihe noudattavat ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos ne eivät selvästikään noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, nämä arviot eivät päde.

4. VAIHEITTAINEN MENETELMÄ: POISTUMAVAKION K_2 MÄÄRITTÄMINEN

Biokertyvyystietojen on yleensä oletettu noudattavan ”kohtuullisesti” yksinkertaista kahden osaston ja kahden muuttujan mallia. Sen osoittaa suora kuvaaja, joka vastaa kalassa poistumavaiheessa havaittuja pitoisuuksia (lineaarisella asteikolla).



On huomattava, että poikkeamat suorasta viivasta voivat viitata siihen, että poistuma noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa monimutkaisempaa mallia. Graafista menetelmää voidaan käyttää sellaisten poistumatyyppien selvittämiseen, jotka poikkeavat ensimmäisen asteen kinetiikasta.

Jos halutaan laskea k_2 eri (näytteenotto-)ajankohtina, tehdään lineaarinen regressio, jossa verrataan ln(konsentraatiota) aikaan. Regressiosuoran kulmakerroin osoittaa arvioidun poistumavakion k_2 ([1]). Keskimääräinen pitoisuus kaloissa poistumavaiheen alussa ($C_{0,d}$, joka vastaa keskimääräistä pitoisuutta kaloissa kertymävaiheen lopussa) voidaan laskea helposti leikkauspisteestä (myös virhemarginaali huomioitu) ([1]):

([1]) Useimmissa lineaarisen regression mahdollistavissa ohjelmissa saadaan myös keskivirhetaso ja luottamusväli. Tämä onnistuu esimerkiksi Microsoft Excelissä käyttämällä data-analysoinnin työkalupakettia.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \qquad \text{[Yhtälö A5.21]}$$

Jos näytteenottoajankohtia on vain kaksi (kuten minimoidussa testissä), k_2 lasketaan korvaamalla kaksi keskimääräistä pitoisuutta seuraavassa yhtälössä:

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{f1})\ -\ \ln\ (C_{f2})}{t_2\ -t_1} \qquad \text{[Yhtälö A5.22]}$$

jossa $\ln(C_{f1})$ on pitoisuuden luonnollinen logaritmi ajankohtana t_1 ja $\ln(C_{f2})$ ajankohtana t_2 ja jossa t_2 ja t_1 osoittavat, minä ajankohtina kaksi poistumavaiheen alussa otettua näytettä on otettu ([1]).

5. VAIHEITTAINEN MENETELMÄ: KERTYMÄVAKION K_1 MÄÄRITTÄMINEN (VAIN VEDEN VÄLITYKSELLÄ TEHTÄVÄSSÄ ALTISTUKSESSA)

K_1:n arvon määrittämiseksi kertymävaiheen tiettyinä ajankohtina mitattuja pitoisuuksia koskevien tietojen perusteella käytetään tietokoneohjelmaa seuraavan mallin sovittamiseksi:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad \text{[Yhtälö A5.23]}$$

Jos k_2 on saatu aiemmassa laskutoimituksessa, $C_f\ (t)$ osoittaa pitoisuuden kaloissa ja $C_w\ (t)$ vedessä ajankohtana t.

Jos näytteenottopisteitä on vain kaksi (kuten minimoidussa testissä), k_1:n laskemisessa sovelletaan seuraavaa kaavaa:

$$k_1 = \frac{C_{\ f} \cdot k_2}{C_w(1\ -e^{\ -k_2 t})} \qquad \text{[Yhtälö A5.24]}$$

jossa k_2 saadaan aiemmasta laskutoimituksesta, C_f on pitoisuus kalassa poistumavaiheen alkaessa ja C_w on keskimääräinen pitoisuus vedessä kertymävaiheen aikana ([2]).

Sovituksen oikeellisuutta voidaan arvioida vertaamalla silmämääräisesti k_1:n ja k_2:n kulmakertoimia näytteenottopisteestä saatuihin mittaustietoihin. Jos käy ilmi, että vaiheittaisen menetelmän mukaan tehty arvio k_1:stä on heikko, k_1 ja k_2 pitäisi laskea samanaikaismenetelmällä (ks. seuraava osa 6). Tässäkin on verrattava saatuja kulmakertoimia mitattuihin tietoihin, jotta sovituksen oikeellisuus voidaan tarkastaa silmämääräisesti. Jos sovituksen oikeellisuus on edelleen heikko, se voi olla merkki siitä, ettei ensimmäisen asteen kinetiikka päde, jolloin pitäisi soveltaa monimutkaisempia malleja.

6. KERTYMÄ- JA POISTUMAVAKIOIDEN LASKENNASSA SOVELLETTAVA SAMANAIKAISMENETELMÄ (VAIN VEDEN VÄLITYKSELLÄ TEHTÄVÄ ALTISTUS)

Tietokoneohjelmien avulla voidaan määrittää k_1 ja k_2-arvot peräkkäisiä ajankohtia koskevia pitoisuustietoja ja seuraavaa mallia soveltaen:

$$C_f = C_w\ \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö A5.25]}$$

$$C_f = C_w\ \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{\ \ -k_2(t-t_c)}\ \ - e^{\ -k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö A5.26]}$$

joissa

t_c = aika, jolloin kertymävaihe loppuu.

Tässä lähestymistavassa k_1- ja k_2-arvioiden keskivirhetaso voidaan määrittää suoraan. Jos k_1/k_2 korvataan BCF:llä (ks. yhtälö A5.4) yhtälöissä A5.25 ja

([1]) Sen sijaan lineaarisessa regressiomenetelmässä tämän kaavan avulla ei voida määrittää k2:n keskivirhetasoa.

([2]) Sen sijaan lineaarisessa sovitusmenetelmässä k1:n arvioitua arvoa koskevaa keskivirhetasoa tai luottamusväliä ei yleensä voida määrittää tällä tavalla.

▼M7

A5.26, voidaan arvioida myös BCF:n keskivirhetaso ja 95 prosentin luottamusväli. Tästä on erityistä hyötyä verrattaessa arvioita, jotka eroavat toisistaan tietojen muuntamisen takia. Riippuva muuttuja (pitoisuus kaloissa) voidaan sovittaa lineaarisen muutoksen kanssa tai ilman sitä, ja tuloksena saatava BCF:n epävarmuus voidaan arvioida.

Koska muuttujien k_1 ja k_2 välillä on voimakas korrelaatio, jos ne on arvioitu samanaikaisesti, voi olla kannattavaa laskea ensin k_2 pelkästään poistumatietojen perusteella (ks. edellä). Useimmissa tapauksissa k_2 voidaan arvioida poistumakäyrästä suhteellisen tarkasti. Tämän jälkeen voidaan laskea k_1 kertymätietojen perusteella käyttämällä ei-lineaarista regressiota ([1]). Tiedot on suositeltavaa muuntaa samalla tavalla vaiheittaisessa sovittamisessa.

Sovituksen oikeellisuutta voidaan arvioida vertaamalla silmämääräisesti laskettuja kulmakertoimia näytteenottopisteestä saatuihin mittaustietoihin. Jos käy ilmi, että tämän menetelmän mukaan tehty arvio k_1:stä on heikko, k_1 ja k_2 voidaan laskea samanaikaismenetelmällä. Tässäkin tapauksessa sovitetun mallin sopivuus pitäisi tarkistaa silmämääräisesti vertaamalla sitä mittaustietoihin. Lisäksi pitäisi vertailla keskenään eri sovitustyypeille arvioituja k_1- ja k_2-muuttujia ja saatua BCF:ää sekä niiden keskivirhetasoa ja luottamusväliä.

Sovituksen heikkous saattaa tarkoittaa, ettei ensimmäisen asteen kinetiikka päde, jolloin on käytettävä monimutkaisempia malleja. Yksi yleisimmistä ongelmista on kalojen kasvu testin aikana.

7. KINEETTISEN BCF:N JA BMF:N KORJAAMINEN KASVUN MUKAAN

Tässä osassa esitellään standardi menetelmä arvojen korjaamiseksi kalojen kasvun mukaan (niin kutsuttu kasvun aiheuttama liukeneminen). Sitä voidaan soveltaa vain silloin, kun ensimmäisen asteen kinetiikka pätee. Jos vaikuttaa siltä, ettei ensimmäisen asteen kinetiikka päde, on suositeltavaa pyytää neuvoa biostatistiikan asiantuntijalta, jotta kasvun aiheuttama liukeneminen voidaan huomioida oikein korjaamisessa tai jotta voidaan käyttää massaperusteista lähestymistapaa, joka esitellään jäljempänä.

Joissakin tapauksissa tämä kasvun aiheuttamaan liukenemiseen perustuva korjausmenetelmä on epätarkka tai se ei toimi. (Näin on esimerkiksi silloin, kun testiaine poistuu hyvin hitaasti mutta kalojen kasvu on nopeaa, jolloin kasvun aiheuttaman liukenemisen perusteella korjattu johdettu poistumavakio k_{2g} saattaa olla hyvin pieni ja virhe sen johtamisessa käytetyissä vakioissa on kriittinen. Joissakin tapauksissa arvioitu k_g saattaa olla suurempi kuin k_2.) Tällöin voidaan soveltaa vaihtoehtoista (eli massaperusteista) lähestymistapaa, joka toimii myös silloin, kun ensimmäisen asteen kinetiikka ei päde. Tällöin ei tarvitse tehdä korjauksia. Tätä lähestymistapaa käsitellään osan lopussa.

Kasvuvakion vähennysmenetelmä korjaamiseksi kasvun mukaan

Standardimenetelmässä yksittäisten kalojen painot ja pituudet muunnetaan luonnollisiksi logaritmeiksi ja sekä käsittely- että vertailuryhmien ln(paino)- tai ln(l/paino)-arvoja verrataan erikseen aikaan (vrk). Kertymä- ja poistumavaiheen tiedot käsitellään samalla tavalla erikseen. Kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan tehtävässä korjauksessa on tavallisesti parempi käyttää koko

([1]) On huomattava, että k2-arvioon liittyvää epävarmuutta ei hyödynnetä kunnolla biokertyvyysmallissa, jos se luokitellaan pääasiassa vakioksi sovitettaessa k1:tä vaiheittaisen sovituksen malliin. Näin ollen BCF:lle saatu epävarmuus on erilainen riippuen siitä, sovelletaanko samanaikaista vai vaiheittaista sovitusmenetelmää.

▼M7

tutkimuksen ajalta saatuja painotietoja poistumavakion (k_g) johtamiseksi. Jos kertymä- ja poistumavaiheita varten johdetuissa kasvuvakioissa on tilastollisesti suuria eroja, voi olla tarpeen käyttää poistumavakiota. Vesitutkimuksissa saatuja testi- ja vertailuryhmien yleisiä kasvuvakioita voidaan käyttää käsittelyn mahdollisten vaikutusten tarkistamiseksi.

Lineaarinen pienin neliösumma lasketaan, jotta saadaan lineaarinen eli ln(kalojen paino) vuorokautta kohti (tai ln(1/paino) vuorokautta kohti) kussakin ryhmässä (testi- ja vertailuryhmissä ja yksilökohtaisten tietojen perusteella, ei päivittäisten keskiarvojen mukaan) koko testiajalta. Kertymä- ja poistumavaiheiden osalta käytetään standardeja tilastomenetelmiä. Suorien leikkauspisteiden varianssit lasketaan, ja niitä käytetään leikkauspisteiden välisten erojen (kasvuvakiot) tilastollisen merkityksen arvioimiseksi (p = 0,05) Studentin t-testillä (tai ANOVA-testillä, jos testataan useampia pitoisuuksia). Kasvun mukaan tehtävässä korjaamisessa suositaan yleisesti painotietoja. Pituustiedot käsitellään samalla tavalla, ja niitä voidaan hyödyntää vertailtaessa käsittelystä johtuvia vaikutuksia vertailu- ja testiryhmissä. Jos painotiedoissa ei analyysin mukaan ole tilastollisesti merkittävää eroa, testi- ja vertailuryhmien tiedot voidaan yhdistää ja koko tutkimusta varten laskea kalojen yleinen kasvuvakio (k_g) lineaarisen korrelaation yleisestä kaltevuudesta. Jos havaitaan tilastollisesti merkittäviä eroja, kunkin kalaryhmän ja/tai tutkimusvaiheen kasvuvakiot ilmoitetaan erikseen. Kunkin käsitellyn ryhmän kasvuvakioita käytetään kyseisen ryhmän osalta kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan tehtävässä korjaamisessa. Jos kertymä- ja poistumavakioissa havaitaan tilastollisesti merkittäviä eroja, käytetään poistumavaiheen johdettuja kasvuvakioita.

Laskettu kasvuvakio (k_g ilmaistuna vrk^{-1}) voidaan vähentää yleisestä poistumavakiosta (k_2), jolloin saadaan poistumavakio k_{2g}.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Yhtälö A5.27]}$$

Kertymävakio jaetaan kasvukorjatulla poistumavakiolla, jolloin saadaan kasvukorjattu kineettinen BCF, eli BCF_{Kg} (tai BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Yhtälö A5.28]}$$

Ravinnon välityksellä tehtävää tutkimusta varten johdettua kasvuvakiota käytetään myös yhtälössä A7.5 kasvukorjatun BMF_{Kg}:n määrittämiseksi (*ks.* lisäys 7).

Massaperusteinen menetelmä kasvun mukaan korjaamisessa

Seuraavassa kuvattua menetelmää voidaan käyttää edellä kuvatun ”kasvuvakion vähennysmenetelmän” sijasta, jolloin arvoja ei tarvitse korjata kasvun takia. Periaatteena on, että poistumatietoja käytettäessä huomioidaan kokonaisten kalojen massa pitoisuuden sijasta.

Poistumavaiheessa kudoksista mitatut pitoisuudet (testiaineen massa / kalojen massayksikkö) muunnetaan testiaineen massaksi suhteessa kaloihin. Sitten pitoisuudet ja yksittäisten kalojen painot yhdistetään taulukkoon (esimerkiksi tietokonepohjaista laskentataulukkoa käyttäen) ja jokainen pitoisuus kerrotaan kyseisellä mittauskerralla saadulla kalojen yhteispainolla, jolloin saadaan testiaineen massa suhteessa kaloihin kaikissa poistumavaiheen näytteissä.

Tuloksena saatua testiaineen massatietojen luonnollista logaritmia verrataan kokeen ajankohtaan (poistumavaihe), kuten yleensäkin.

▼M7

Vesialtistusmenetelmässä kertymävakio johdetaan rutiininomaisesti (ks. osat 4 ja 6). On huomattava, että ”normaalia” k_2-arvoa pitäisi käyttää käyrien sovitusyhtälöissä k_1-arvon osalta ja johtaa poistumavakio edellä mainituista tiedoista. Poistumavakioksi saatava arvo ei ole riippuvainen kasvusta, koska se on johdettu massaperusteisesti kokonaisten kalojen painon perusteella. Näin ollen sen tunnuksena on k_{2g},ei k_2.

8. RASVAPITOISUUDEN NORMALISOINTI VIIDEN PROSENTIN RASVAPITOISUUDEN MUKAISESTI (KOSKEE AINOASTAAN VESIALTISTUSMENETELMÄÄ)

Vesialtistustesteissä saadut (kineettiset ja tasapainotilan) BCF-tulokset pitäisi myös ilmoittaa suhteessa kalojen viiden prosentin vakiorasvapitoisuuteen (tuorepainosta), paitsi jos voidaan esittää, ettei testiaine keräänny ensisijaisesti rasvaan (esimerkiksi jotkut perfluoratut aineet saattavat sitoutua proteiineihin). Pitoisuus kaloissa, tai BCF, on muunnettava vastaamaan viiden prosentin rasvapitoisuutta tuorepainoon nähden. Jos testiaineen pitoisuus ja rasvapitoisuus on mitattu samoista kaloista kaikissa näytteenottopisteissä, jokainen yksittäiseltä kalalta mitattu pitoisuus on korjattava kyseisen kalan rasvapitoisuuden mukaan.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Yhtälö A5.29]}$$

jossa

$C_{f,L}$ = rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu pitoisuus kaloissa (mg kg^{-1} tuorepaino)

L = rasvan osuus (tuorepainon perusteella)

C_f = testiaineen pitoisuus kaloissa (mg kg^{-1} tuorepaino)

Jos rasvapitoisuutta ei ole analysoitu kaikista näytteeksi otetuista kaloista, BCF normalisoidaan keskimääräisen rasvapitoisuuden perusteella. Tasapainotilan BCF määritetään kertymävaiheen lopussa käsittelyryhmän kaloille kirjatun keskiarvon perusteella. Kineettisen BCF:n normalisoinnissa saatetaan joissakin tapauksissa tarvita toisenlaista lähestymistapaa. Näin on esimerkiksi silloin, kun rasvapitoisuus on muuttunut huomattavasti joko kertymä- tai poistumavaiheen aikana. Ruokkimistaajuuden pitäisi kuitenkin aina olla sellainen, ettei rasvapitoisuudessa juuri tapahdu dramaattisia muutoksia.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Yhtälö A5.30]}$$

jossa

BCF_{KL} = rasvapitoisuuden mukaan normalisoitu kineettinen BCF (L kg^{-1})

L = rasvan keskimääräinen osuus (tuorepainon perusteella)

BCF_K = kineettinen BCF (L kg^{-1})

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Arnot J.A. ja Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355

(2) Tässä liitteessä oleva C.20 luku, Lisääntymistesti vesikirpulla (Daphnia magna)

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309–320.

▼**M7**

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130–135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29–39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168–1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2′,4,4′ tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243–255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614–622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3–19.

▼M7

Lisäys 6

YHTÄLÖT VESIALTISTUSTESTISSÄ: MINIMOITU TESTIJÄRJESTELY

Tämän lähestymistavan perusteena on, että kattavassa testissä biokertyvyystekijä voidaan määrittää joko tasapainotilan biokertyvyystekijänä (BCF_{SS}) vertaamalla toisiinsa testiaineen pitoisuutta kaloissa ja vedessä tai kineettisenä biokertyvyystekijänä (BCF_K) laskemalla kertymävakion k_1 ja poistumavakion k_2 välinen suhde. BCF_K on pätevä siinäkin tapauksessa, ettei aineen pitoisuudessa saavuteta kertymävaiheen aikana tasapainotilaa, mikäli kertymä ja poistuma noudattavat likimäärin ensimmäisen asteen kineettisiä prosesseja.

Jos testiaineen pitoisuus kudoksissa (C_{f1}) mitataan altistuksen päättyessä (t_1) ja sama pitoisuus mitataan uudelleen (C_{f2}) tietyn ajan kuluttua (t_2), poistumavakio (k_2) voidaan arvioida soveltamalla lisäyksessä 5 kuvattua yhtälöä A5.22.

Tämän jälkeen kertymävakio k_1 voidaan määrittää matemaattisesti soveltamalla liitteessä 5 esitettyä yhtälöä A5.23 (jossa C_f on sama kuin C_{f1} ja t sama kuin t_1) (1). Minimoidussa testijärjestelyssä kineettinen biokertyvyystekijä (jota kuvataan tunnuksella BCF_{Km} sen erottamiseksi muilla menetelmillä määritetyistä kineettisistä biokertyvyystekijöistä) on seuraavanlainen:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Yhtälö A6.1]}$$

Pitoisuudet tai tulokset on korjattava kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan ja normalisoitava kalojen viiden prosentin rasvapitoisuuden perusteella, kuten todetaan liitteessä 5.

Minimoidussa testijärjestelyssä BCF_{SS} vastaa kertymävaiheen lopussa mitattua BCF:ää kun oletuksena on, että tasapainotila on saavutettu. Tämä on vain oletus, koska näytteenottopisteiden määrä ei riitä vahvistamaan tietoa.

$$\text{minimoitu } BCF_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[Yhtälö A6.2]}$$

jossa

$C_{f\text{-}minSS}$ = pitoisuus kaloissa oletetussa tasapainotilassa kertymävaiheen lopussa (mg kg^{-1} tuorepaino).

$C_{w\text{-}minSS}$ = pitoisuus vedessä oletetussa tasapainotilassa kertymävaiheen lopussa (mg l^{-1}).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. ja Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280

▼M7

Lisäys 7

YHTÄLÖT RAVINTOALTISTUSTESTISSÄ

1. Esimerkki sopivan kaupallisesti saatavan kalanruoan eri ainesosien määristä

2. Esimerkkejä tekniikoista testiaineen lisäämiseksi ruokaan

3. Assimilaatiotehon ja biomagnifikaatiokertoimen laskeminen

4. Korjaaminen rasvapitoisuuden mukaan

5. Nolla-ajankohdan mitatun pitoisuuden (C0,m) ja nolla-ajankohdan johdetun pitoisuuden (C0,d) välisten erojen arviointi

6. Ohjeita testiaineille, joilla poistuma on hyvin nopeaa

1. ESIMERKKI SOPIVAN KAUPALLISESTI SAATAVAN KALANRUOAN ERI AINESOSIEN MÄÄRISTÄ

Pääainesosa	Kalajauho
Raakavalkuainen	≤ 55,0 %
Raakarasva	≤ 15,0 % ([1])
Raakakuitu	≥ 2,0 %
Kosteuspitoisuus	≥ 12 %
Tuhka	≥ 8 %

([1]) Joillain alueilla saatavilla on mahdollisesti vain kalanruokaa, jonka rasvapitoisuus on kaukana tästä ylärajasta. Tällöin tutkimuksessa käytetään ruokaa, jonka rasvapitoisuus on pienempi, ja ruokkimistaajuutta muutetaan asianmukaisesti kalojen terveyden ylläpitämiseksi. Ruokavalion rasvapitoisuutta ei kasvateta keinotekoisesti öljyä lisäämällä.

2. ESIMERKKEJÄ TEKNIIKOISTA TESTIAINEEN LISÄÄMISEKSI RUOKAAN

Yleistä

Vertailuryhmälle annettava ruoka pitäisi valmistaa muuten täysin samalla tavalla kuin testiainetta sisältävä ruoka, mutta siihen ei lisätä testiainetta.

Käsitellyn ruoan pitoisuuden tarkistamiseksi ruoka-annoksesta otetaan kolme näytettä soveltuvalla talteenottomenetelmällä ja niistä mitataan testiaineen pitoisuus tai radioaktiivisuus. On osoitettava suuri saanto analyysia varten (> 85 %) siten, että näytteiden välinen vaihtelu on pientä (testiaineen pitoisuus kolmessa ennen testin alkua otetussa näytteessä ei saisi poiketa enemmän kuin ± 15 prosenttia keskiarvosta).

Ravintoaltistustestissä pitäisi kerätä analysoitavaksi kolme näytettä päivänä 0 sekä kertymävaiheen lopussa, jotta voidaan määrittää testiaineen pitoisuus ruoassa.

Kalanruoan valmistaminen testimateriaalin ollessa nestemäistä (puhdasta)

Käsitellylle kalanruoalle määritetään nimellinen tavoitearvo testiaineen pitoisuutta varten. Se voi olla esimerkiksi 500 µg testiainetta grammassa ruokaa. Sopiva määrä (moolimassana tai tietyn radioaktiivisuuden perusteella) puhdasta testiainetta lisätään tiettyyn määrään kalanruokaa lasipurkissa tai pyöröhaihdutuspullossa. Kalanruoan massan pitäisi olla sellainen, että se riittää poistumavaiheen ajaksi (ottaen huomioon, että annosmäärää pitää kasvattaa

▼M7

jokaisella ruokintakerralla kalojen kasvun mukaisesti). Kalanrehun ja testiaineen pitäisi antaa sekoittua keskenään yön yli hitaasti pyörivässä sekoittimessa (esimerkiksi pyörivän sekoittimen tai rotaatiomenetelmän avulla, jos käytössä on pyöröhaihdutuspullo). Testiainetta sisältävä ruoka pitäisi varastoida ennen käyttöä siten (esim. kylmässä), että testiaineen pitoisuus pysyy rehuseoksessa vakaana käyttöön asti.

Kalanruoan valmistaminen, kun kantaja-aineena käytetään maissi- tai kalaöljyä

Kiinteät testiaineet jauhetaan morkkelissa hienoksi jauheeksi. Nestemäiset testiaineet voidaan lisätä suoraan maissi- tai kalaöljyyn. Testiaine liuotetaan tiettyyn määrään maissi- tai kalaöljyä (esim. 5–15 ml). Öljyannos siirretään kvantitatiivisesti sopivan kokoiseen pyöröhaihdutuspulloon. Öljyannoksen valmistelussa käytetty pullo pitäisi huuhdella kahdella pienellä öljyalikvootilla, jotka lisätään pulloon sen varmistamiseksi, että liuennut testiaine saadaan siirrettyä kokonaisuudessaan. Jotta aine liukenisi tai hajoaisi varmasti öljyyn (tai jos testataan useampaa kuin yhtä ainetta), käytetään lisäksi mikrosekoitinta, pullo suljetaan ja seosta sekoitetaan nopealla tahdilla yön yli. Testin kannalta sopiva määrä kalanruokaa (yleensä pelletteinä) lisätään pulloon ja pullon sisältö sekoitetaan tasalaatuiseksi pyörittämällä pulloa yhtäjaksoisesti vähintään 30 minuutin ajan, kuitenkin mieluiten yön yli. Tämän jälkeen testiainetta sisältävä ruoka varastoidaan asianmukaisesti (esim. kylmässä) sen varmistamiseksi, että testiaineen laatu pysyy ruoassa vakaana käyttöön asti.

Kalanruoan valmistaminen, kun käytetään orgaanista liuotinta

Riittävä määrä testiainetta (moolimassan tai erityisen radioaktiivisuuden mukaan) tavoitellun annoksen saamiseksi liuotetaan sopivaan orgaaniseen liuottimeen (esim. sykloheksaanilla tai asetonilla määrä on 10–40 ml; tarvittava määrä voi olla suurempi riippuen siitä, mihin määrään ruokaa testiainetta on tarkoitus lisätä). Liuoksen alikvootti tai liuos kokonaisuudessaan (riippuen lisätystä annoksesta) sekoitetaan sellaiseen massaan kalanruokaa, joka riittää testissä vaaditun nimellisen annoskoon saamiseksi. Ruoka ja testiaine voidaan sekoittaa keskenään ruostumattomassa sekoitusmaljassa ja tuoreena annosteltu kalanruoka voidaan jättää laboratoriokaappiin kahdeksi vuorokaudeksi (välillä sekoittaen) ylimääräisen liuottimen haihduttamiseksi, tai ne voidaan sekoittaa pyöröhaihdutuspullossa jatkuvalla rotaatiolla. Ylimääräinen liuotin voidaan tarvittaessa ”puhaltaa” pois ilmavirran tai typpikaasun avulla. Tällöin on varmistettava, ettei testiaine kiteydy liuottimen haihtuessa. Testiainetta sisältävä ruoka pitäisi varastoida siten (esim. kylmässä), että testiaineen pitoisuus pysyy rehuseoksessa vakaana käyttöön asti.

3. ASSIMILAATIOTEHON JA BIOMAGNIFIKAATIOKERTOIMEN LASKEMINEN

Assimilaatiotehon laskemista varten on ensin arvioitava yleinen poistumavakio liitteen 5 osassa 4 kuvatulla tavalla (vaiheittaista menetelmää eli standardia lineaarista regressiota soveltaen) ja käyttäen poistumavaiheessa otettujen näytteiden keskipitoisuutta. Ruokkimistaajuusvakio I ja kertymävaiheen kesto t ovat tiedossa olevat tutkimusparametrit. C_{ruoka}, eli testiaineen keskimääräinen pitoisuus ruoassa on muuttuja, jota tutkimuksessa mitataan. $C_{0,\text{d}}$, eli testiaineen pitoisuus kaloissa kertymävaiheen lopussa, johdetaan tavallisesti ln(konsentraation) ja poistumavaiheen kyseisen päivän leikkauspisteestä.

Aineen assimilaatioteho (a, testiaineen absorboituminen suolistossa) lasketaan seuraavasti:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{ruoka}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Yhtälö A7.1]}$$

jossa

$C_{0,d}$ = johdettu pitoisuus kaloissa poistumavaiheen nolla-ajankohtana (mg kg^{-1})

▼M7

k_2 = yleinen (ei kasvukorjattu) poistumavakio (vrk^{-1}), joka on laskettu liitteen 5 osassa 3 esitettyjen yhtälöiden mukaisesti

I = ruoan imeytymisvakio (g ruokaa g^{-1} kalaa vrk^{-1})

C_{ruoka} = pitoisuus ruoassa (mg kg^{-1} ruokaa)

t = ruokintajakson kesto (vrk)

Laskennassa käytettyä ruokkimistaajuutta I voidaan kuitenkin joutua korjaamaan kalan kasvun mukaan tarkan assimilaatiotehon a määrittämiseksi. Jos kalat kasvavat merkittävästi testin kertymävaiheen aikana (eikä annettuja rehumääriä korjata valitun ruokkimistaajuuden ylläpitämiseksi), todellinen ruokkimistaajuus pienenee kertymäajan edetessä asetettuun määrään nähden, jolloin ”todellinen” assimilaatioteho on suurempi. (Huomaa, ettei tällä ole merkitystä BMF:n yleisessä laskennassa, koska I kumoaa tosiasiassa yhtälöiden A7.1 ja A7.4 keskinäisen vaikutuksen.) Kasvun aiheuttaman liukenemisen mukaan korjattu keskimääräinen ruokkimistaajuus I_g voidaan johtaa useilla eri tavoilla, mutta yksinkertaisin ja perusteellisin tapa on käyttää tiedossa olevaa kasvuvakiota (k_g) testikalojen painon arvioimiseksi kertymävaiheen eri ajankohtina:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Yhtälö A7.2]}$$

jossa

$W_f(t)$ = kalojen keskipaino kertymävaiheen päivänä t

$W_{f,0}$ = kalojen keskipaino kokeen alkaessa.

Näin voidaan arvioida (vähintään) kalojen keskipaino altistuksen viimeisenä päivänä ($W_{f,altistuksen\ loppu}$). Koska ruokkimistaajuuden määritysperusteena on ollut $W_{f,0}$, todellinen ruokkimistaajuus kunakin kertymävaiheen päivänä voidaan laskea kyseisten kahden painon arvon perusteella. Kasvukorjattu ruokkimistaajuus I_g (g ruokaa g^{-1} kalaa vrk^{-1}), jota on käytettävä I:n sijasta, jos kalat kasvavat nopeasti kertymävaiheessa, voidaankin laskea seuraavasti:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,altistuksen\ loppu}} \qquad \text{[Yhtälö A7.3]}$$

Kun assimilaatioteho on määritetty, BMF voidaan laskea kertomalla se ruokkimistaajuusvakiolla I (tai I_g, jos se on α:n laskentaperusteena) ja jakamalla tulo yleisellä poistumavakiolla k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Yhtälö A7.4]}$$

Kasvukorjattu biomagnifikaatiokerroin pitäisi laskea samalla tavalla käyttäen kasvukorjattua poistumavakiota (joka on johdettu liitteen 5 osassa 7 kuvatulla tavalla). Jos α:n laskentaperusteena on ollut I_g, sitä pitäisi tässäkin käyttää I:n sijasta:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Yhtälö A7.5]}$$

jossa

α = assimilaatioteho (testiaineen absorboituminen suolistossa)

k_2 = yleinen (ei kasvukorjattu) poistumavakio (vrk^{-1}), joka on laskettu liitteen 5 osassa 3 esitettyjen yhtälöiden mukaisesti

▼M7

k_{2g} = kasvukorjattu poistumavakio (vrk^{-1})

I = ruoan imeytymisvakio (g ruokaa g^{-1} kalaa vrk^{-1})

Kasvukorjattu puoliintumisaika ($t_{1/2}$) lasketaan seuraavasti:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Yhtälö A7.6]}$$

Testiaineen assimilaatioteho ruoassa voidaan myös arvioida, jos kudoksissa todetaan jäämiä kertymävaiheen lineaarisessa vaiheessa (vuorokausien 1 ja 3 välisenä aikana). Tällöin assimilaatioteho (α) voidaan määrittää seuraavasti:

$$\alpha = \frac{C_{kala}(t)}{I \times C_{ruoka} \times t} \qquad \text{[Yhtälö A7.7]}$$

jossa

C_{kala} *(t)* = testiaineen pitoisuus kaloissa ajankohtana t (mg kg^{-1} tuorepainosta).

4. KORJAAMINEN RASVAPITOISUUDEN MUKAAN

Jos rasvapitoisuus on kaikilla näytteenottoväleillä mitattu samoista kaloista, joille on tehty myös kemiallinen analyysi, yksittäiset pitoisuudet korjataan rasvapitoisuuden mukaan ja (rasvapitoisuuden mukaan korjattua) lineaarista konsentraatiota verrataan poistuma-ajankohtaan (vrk), jolloin voidaan määrittää $C_{0,d}$ ja k_2. Tämän jälkeen assimilaatioteho (yhtälö A7.1) voidaan laskea rasvapitoisuuden perusteella käyttämällä rasvapitoisuuteen perustuvaa arvoa C_{ruoka} (eli C_{ruoka} kerrotaan ruoan sisältämän rasvan keskiarvolla). Tämän jälkeen laskennassa käytettävät yhtälöt A7.4 ja A7.5 antavat suoraan tulokseksi rasvapitoisuuden (ja kasvun aiheuttaman liukenemisen) mukaan korjatun BMF:n.

Muutoin rasvan keskimääräinen osuus (tuorepainosta) kaloissa ja ruoassa johdetaan sekä käsittely- että vertailuryhmissä (ruoan ja vertailuryhmän kalojen osalta tavallisesti mittaustiedoista, jotka on saatu altistuksen alkaessa ja päättyessä; käsittelyryhmän kaloilla tavallisesti vain mittaustiedoista, jotka on saatu altistuksen päättyessä). Joissakin tutkimuksissa kalojen rasvapitoisuus voi nousta selvästi. Tällöin on parempi käyttää kalojen keskimääräistä rasvapitoisuutta, joka on laskettu altistusvaiheen ja poistumavaiheen lopussa mitatuista arvoista. Molempien rasvaosuuksien johtamisessa käytetään tavallisesti vain käsittelyryhmästä saatuja tietoja.

Rasvapitoisuuden korjauskerroin (L_c) lasketaan seuraavasti:

$$L_C = \frac{L_{kala}}{L_{ruoka}} \qquad \text{[Yhtälö A7.8]}$$

jossa L_{kala} on keskimääräinen rasvaosuus kaloissa ja L_{ruoka} on keskimääräinen rasvaosuus ruoassa.

Rasvapitoisuuden korjauskerrointa käytetään rasvakorjatun biomagnifikaatiokertoimen (BMF_L) laskennassa:

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Yhtälö A7.9]}$$

5. NOLLA-AJANKOHDAN MITATUN PITOISUUDEN ($C_{0,M}$) JA NOLLA-AJANKOHDAN JOHDETUN PITOISUUDEN ($C_{0,D}$) VÄLISTEN EROJEN ARVIOINTI

Nolla-ajankohdan mitattua pitoisuutta ($C_{0,m}$) ja nolla-ajankohdan johdettua pitoisuutta ($C_{0,d}$) pitäisi verrata toisiinsa. Jos ne ovat keskenään hyvin samanlaiset, poistumakauden muuttujat kannattaa johtaa käyttäen ensimmäisen asteen mallia.

▼M7

Joissakin tutkimuksissa nolla-ajankohdan johdettu arvo $C_{0,d}$ saattaa poiketa selvästi nolla-ajankohdan mitatusta keskipitoisuudesta $C_{0,m}$ (ks. tätä testimenetelmää käsittelevän 159 kohdan viimeinen luetelmakohta). Jos $C_{0,d}$ on paljon pienempi kuin $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), se voi olla merkki siitä, ettei testiainetta sisältävä ruoka ole vielä kokonaan sulanut suolistossa. Tämä voidaan myös tarkistaa kokeellisesti irrottamalla suolisto ja analysoimalla se erikseen, jos kertymävaiheen päättyessä on otettu näytteeksi ylimääräisiä (kokonaisia) kaloja ja ne varastoitu. Jos poistumavaiheen lineaariseen regressioon sovellettu tilastollisesti pätevä poikkeamatesti osoittaa, että poistumavaiheen ensimmäisen näytteenottopisteen tulos on liian korkea, voi olla suositeltavaa soveltaa lineaarista regressiota k_2:n johtamisessa mutta jättää ensimmäinen poistumavaiheessa mitattu pitoisuus huomioimatta. Jos lineaariseen regressioon liittyvä epävarmuus vähenee huomattavasti ja on selvää, että poistumavaihe noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa, assimilaatiotehon laskennassa voi olla hyvä käyttää tuloksena saatuja arvoja $C_{0,d}$ ja k_2. Tämä on perusteltava kattavasti testiraportissa. On myös mahdollista, että poistumavaihe noudattaa muuta kuin ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos tämä on todennäköistä (eli luonnolliseksi logaritmiksi muunnetut tiedot näyttävät noudattavan käyrää verrattuna vaakasuoraan lineaariseen regressioon), k_2- ja $C_{0,d}$-arvojen laskutoimitukset eivät todennäköisesti päde ja olisi pyydettävä neuvoa biostatistiikan asiantuntijalta.

Jos $C_{0,d}$ on hyvin paljon suurempi kuin mitattu arvo ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), se voi olla merkki jostakin seuraavista: aine on poistunut hyvin nopeasti (eli näytteenottopisteet ovat lähellä sovelletun analyysimenetelmän kvantifiointirajaa jo hyvin varhain poistumavaiheessa, ks. osa 6 jäljempänä), poistuma poikkeaa ensimmäisen asteen kinetiikasta, k_2:n ja $C_{0,d}$:n johtamisessa käytetty lineaarinen regressio on virheellinen tai mitatuissa pitoisuuksissa on ollut ongelmia joinakin näytteenottoajankohtina. Tällöin lineaarinen regressiokäyrä on tarkistettava osoittamalla näytteet, jotka ovat kvantifiointirajalla tai lähellä sitä, poikkeamat sekä käyrän selvä kaarevuus (jolloin voidaan olettaa, ettei ensimmäisen asteen kinetiikka päde). Nämä asiat on myös mainittava testiraportissa. Jos lineaarinen regressio arvioidaan uudelleen arvoja koskevien arvioiden parantamiseksi, tämä toimenpide on kuvattava ja perusteltava. Jos havaitaan, että poikkeama ensimmäisen asteen kinetiikasta on merkittävä, lasketut k_2 ja $C_{0,d}$ eivät todennäköisesti päde ja on pyydettävä neuvoa biostatistiikan asiantuntijalta.

6. OHJEITA TESTIAINEILLE, JOILLA POISTUMA ON HYVIN NOPEAA

Kuten tämän testimenetelmän 129 kohdassa todetaan, jotkut aineet poistuvat niin nopeasti, ettei nolla-ajankohdan pitoisuutta $C_{0,d}$ ja k_2-arvoa voida johtaa luotettavasti, koska testiainetta ei enää havaita (pitoisuudet ovat kvantifiointirajalla) poistumavaiheen varhaisessa vaiheessa otetuissa näytteissä (eli toisesta poistumavaiheen näytteestä alkaen). Tämän testimenetelmän tueksi tehdyssä yhteistutkimuksessa havaittiin, että bentso[a]pyreenilla tilanne oli tällainen. Tämä esitetään myös menetelmän validointiselosteessa. Tällöin lineaarista regressiota ei voida tehdä luotettavasti, koska se antaa todennäköisesti epärealistisen korkean arvion $C_{0,d}$-arvosta, jolloin assimilaatioteho näyttää olevan paljon suurempi kuin 1. Tällaisissa tapauksissa on mahdollista laskea k_2 ja BMF:n yläarvo suuntaa-antavasti.

Käyttämällä niitä poistumavaiheen datapisteitä, joissa pitoisuus mitattiin – mukaan lukien ensimmäinen piste, jossa pitoisuus oli ”ei-havaittava” (eli kvantifiointirajalla) –k_2 voidaan arvioida lineaarisen regression perusteella (käyttämällä luonnolliseksi logaritmiksi muunnettua pitoisuustietoa suhteutettuna aikaan). Tällaisissa tapauksissa kyseeseen tulee todennäköisesti vain kaksi datapistettä (esim. poistumavaiheen näytteenottopäivät 1 ja 2) ja k_2 voidaan sitten arvioida soveltamalla liitteessä 5 kuvattua yhtälöä A5.22. Arvioitua k_2-arvoa voidaan käyttää assimilaatiotehon arvioimiseksi yhtälön A7.1 mukaan korvaamalla $C_{0,d}$-arvo yhtälössä mitatulla nolla-ajankohdan pitoisuudella ($C_{0,m}$) tapauksissa, joissa $C_{0,d}$ on selvästi arvioitu suuremmaksi kuin

▼**M7**

mitä testissä olisi ollut mahdollista saavuttaa. Jos $C_{0,m}$-arvoa ei voitu mitata, pitäisi käyttää kalojen kudoksiin sovellettavaa havaitsemisrajaa. Jos joissakin tapauksissa saadaan tällöin tulokseksi $\alpha > 1$, assimilaatiotehon oletetaan ”pahimmassa tapauksessa” olevan 1.

Sitten voidaan arvioida suurin mahdollinen BMF_K käyttämällä yhtälöä A7.4, ja se pitäisi ilmoittaa ”paljon pienempi kuin” -arvona (<<). Jos tutkimuksen ruokkimistaajuus on 3 prosenttia, poistumavaiheen puoliintumisaika on vähemmän kuin kolme vuorokautta ja α on ”pahimmassa tapauksessa” 1, BMF_K on todennäköisesti alle 0,13. Kun otetaan huomioon tämän arvioinnin tarkoitus sekä se, että arvot ovat luonteeltaan suuntaa-antavia, niitä ei ole tarpeen korjata kasvun aiheuttaman liukenemisen tai kalan ja ruoan rasvapitoisuuden mukaan.

▼M7

Lisäys 8

LÄHESTYMISTAVAT ALUSTAVIEN BCF-ARVOJEN ARVIOIMISEKSI RAVINTOALTISTUSTESTISSÄ KERÄTTYJEN TIETOJEN PERUSTEELLA

Ravintoaltistusta käytetään osana tätä testimenetelmää sellaisten aineiden bioakkumulaation määrittämiseksi, joita ei voida käytännössä testata vesialtistusmenetelmällä. Vesialtistusmenetelmän avulla saadaan biokertyvyystekijä, kun taas ravintoaltistusmenetelmässä saadaan suoraan tietoa ravintoon liittyvästä biomagnifikaatiopotentiaalista. Monissa kemikaaliturvallisuutta koskevissa järjestelmissä edellytetään tietoa biokertyvyydestä vedessä (kuten riskiarvioinnissa ja kemikaalien maailmanlaajuisesti yhdenmukaistetussa luokitus- ja merkintäjärjestelmässä). Näin ollen ravintotutkimuksessa saatuja tietoja tarvitaan biokertyvyystekijän arvioimiseksi siten, että sitä voidaan verrata vesialtistusmenetelmän mukaan tehtyihin testeihin ([1]). Tässä osassa käsitellään lähestymistapoja, jotka mahdollistavat edellä mainitun mutta tunnustavat arviointiin luontaisesti liittyvät puutteet.

Ravintotutkimuksessa mitataan poistuma poistumavakion k_2 määrittämiseksi. Jos kertymävakio voidaan arvioida saatavilla olevien tietojen perusteella silloin, kun kalat on altistettu testiaineelle veden välityksellä, voidaan arvioida myös kineettinen BCF.

Vesialtistuksessa testiaineen kertymävakiota koskeva arvio perustuu monilta osin olettamuksiin, jotka kaikki lisäävät arvion epävarmuustekijöitä. Kun tätä lähestymistapaa käytetään BCF:n arvioinnissa, oletuksena on, ettei yleinen poistumavakio (mukaan lukien siihen vaikuttavat tekijät, kuten leviäminen kehossa ja yksittäiset poistumisprosessit) ole riippuvainen altistustekniikasta, jota on käytetty testiaineen kertymän osoittamisessa.

Arvioihin perustuvan lähestymistavan pääolettamat voidaan tiivistää seuraavassa esitetyllä tavalla.

Ravintoaltistuksen kertymävaihetta seuraava poistuma noudattaa tietyllä aineella samaa kaavaa kuin vesialtistuksessa.

Vedestä saatava kertymä noudattaa mahdollisesti ensimmäisen asteen kinetiikkaa.

Kertymän arvioinnissa sovelletusta menetelmästä riippuen

— kertymä voi korreloida ainoastaan kalojen painon kanssa

— kertymä voi korreloida ainoastaan kyseessä olevan aineen oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen kanssa

— kertymä voi korreloida sekä kalojen painon että kyseisen aineen oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen kanssa

— tekijät, jotka käytännössä vaikuttavat kertymään vesialtistustutkimuksessa, kuten aineen biologinen hyötyosuus, absorboituminen laitteistoon, molekyylikoko ja niin edelleen, vaikuttavat vain vähän

— ja ratkaisevaa on, että

kertymän arviointimenetelmän kehittämisessä käytetty tietokanta (”harjoitussarja”) antaa edustavan kuvan tutkimuksen kohteena olevasta aineesta.

Useissa kaikille avoimesta kirjallisuudesta löytyvissä julkaisuissa esitellään johdettuja yhtälöitä, joissa liitetään veden välityksellä tapahtuva kertymä kalan kiduksissa aineen oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimeen, kalojen painoon (1) (2) (3) (4), määrään ja/tai rasvapitoisuuteen, limakalvojen läpäisevyyteen/diffuusioon niiden kautta (5) (6), kalojen ilmanvaihtovolyymiin (7) fugasiteettiin tai massaan

([1]) Luonnossa suurin mahdollinen altistus vesiympäristössä tapahtuu todennäköisesti imeytymisen kautta hyvin hydrofobisilla aineilla. Näin ollen arvioitu BCF ei kuvaa täysin tarkasti tällaisen aineen biokertyvyyspotentiaalia.

▼M7

perustuvassa lähestymistavassa (8) (9) (10). Kyseisten menetelmien käyttöä tässä yhteydessä arvioidaan yksityiskohtaisesti Crookesin & Brooken teoksessa (11). Barberin julkaisu (12), jossa käsitellään bioakkumulaation mallintamista ravinnon välityksellä tapahtuvassa kertymässä, on myös hyödyllinen tässä yhteydessä, koska siinä esitellään kudosten kautta tapahtuvaa kertymää koskevia malleja. Vuonna 2014 julkaistun ravintoprotokollan (13) tausta-asiakirjassa yksi osa oli myös varattu kokonaan tämän näkökulman käsittelyyn.

Useimmat näistä malleista on ilmeisesti johdettu käyttäen apuna rajallisia tietokantoja. Sellaisten mallien osalta, joiden muodostamisessa käytettyjen tietokantojen tarkat tiedot ovat saatavilla, näyttää siltä, että käytettyjen ainetyyppien rakenne ja luokitus ovat usein samankaltaisia (esim. toimivuuden kannalta, kuten orgaanisilla klooreilla). Tämä lisää epävarmuutta silloin, kun käytetään jotakin mallia tyypiltään erilaisen aineen kertymävakion ennustamisessa testikohtaisten piirteiden, kuten muun muassa lajien ja lämpötilan, ohella.

Käytössä olevien tekniikoiden tarkastuksen yhteydessä (11) kävi ilmi, ettei mikään menetelmä ole muita ”oikeampi”. Näin ollen valittu malli on perusteltava selkeästi. Jos tarjolla on useita menetelmiä, joiden käyttö on perusteltavissa, kannattaa mahdollisesti esittää useita arvioita k_1-arvosta (ja BCF:stä) tai k_1-arvojen (ja BCF:n) vaihteluväli useiden kertymään sovellettavien arviointimenetelmien mukaisesti. Koska mallien tyypit ja niissä käytetyt tietosarjat eroavat toisistaan, eri tavalla johdettujen arvioiden keskiarvoa ei ole tarkoituksenmukaista käyttää.

Jotkut tutkijat ovat esittäneet, että tämän kaltaiset BCF-arviot on korjattava biologisen hyötyosuuden perusteella, jotta voidaan ottaa huomioon aineen absorboituminen liuenneeseen orgaaniseen hiileen (DOC) vesialtistuksessa. Näin arvio voidaan mukauttaa vesialtistustutkimusten tuloksiin (esim. (13) (14)). Tämä korjaus ei kuitenkaan aina ole tarkoituksenmukaista, koska vesialtistustutkimuksessa tarvittavan orgaanisen hiilen taso ”pahimmassa tapauksessa” -arviota varten on niin alhainen (biologisesti hyödynnettävän aineen osuus suhteessa liuoksessa mitattuun aineeseen). Erittäin hydrofobisilla aineilla kudosten pinnan lähellä tapahtuvan passiivisen diffuusion taso saattaa rajoittaa kudosten kautta tapahtuvaa kertymää. Tällöin on mahdollista, että korjaus on oleellisempaa tämän vaikutuksen kannalta kuin sen vaikutuksen kannalta, jota varten se on alun perin suunniteltu.

On suositeltavaa keskittyä menetelmiin, jotka edellyttävät syötteitä, joille on jo saatavissa tietoa tässä kuvatun ravintotutkimuksen mukaisesti testattavista aineista (kuten log K_{OW}, kalojen paino). Monimutkaisempia syötteitä edellyttäviä menetelmiä voidaan myös soveltaa, mutta niissä on mahdollisesti tehtävä testin aikana suurempi määrä mittauksia tai niissä tarvitaan sellaista yksityiskohtaista tietoa testiaineesta tai kalalajista, joka ei ole vielä yleisesti saatavilla. Lisäksi mallin valinnassa saattavat vaikuttaa sen validointitaso ja soveltamisala (ks. (11) eri menetelmien tarkistamisesta ja vertailusta).

On pidettävä mielessä, että saatava k_1-arvio sekä arvioitu BCF ovat epävarmoja ja ne on arvioitava todistusnäyttöön perustuvan lähestymistavan sekä johdetun BMF:n ja aineen muuttujien (kuten molekyylikoko) perusteella, jotta saataisiin kokonaiskuva kyseisen aineen bioakkumulaatiopotentiaalista. Näiden muuttujien tulkinta ja käyttö saattavat riippua sovellettavasta säädöskehyksestä.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1–14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325–341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130–135.

▼**M7**

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963–1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304–315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699–707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399–1420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577–583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337–345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755–777

(13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189–231.

▼B

C.14. **KALANPOIKASILLA TEHTÄVÄ KASVUTESTI**

1. **MENETELMÄ**

Tämä kasvun mittaukseen perustuva myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 215 (2000).

1.1 JOHDANTO

Testin tarkoituksena on arvioida vaikutukset, jotka pitkäaikaisella altistuksella kemikaaleille on kalanpoikasten kasvuun. Testi perustuu Euroopan unionissa kehitettyyn ja rengastestattuun (1) (3) menetelmään, jolla arvioidaan kemikaalien vaikutus kirjolohen poikasen *(Oncorynchus mykiss)* kasvuun läpivirtausolosuhteissa. Muitakin hyvin dokumentoituja lajeja voidaan käyttää. Kokemusta on esimerkiksi seeprakalalla *(Danio rerio*) (2) (4) (5) ja medakalla (*Oryzias latipes)* (6) (7) (8) tehdyistä kasvutesteistä.

Ks. myös osan C Yleisjohdanto.

1.2 MÄÄRITELMÄT

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testiaineen testattu pitoisuus, jolla aineen havaitaan aiheuttavan merkitsevän vaikutuksen (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kuitenkin kaikilla LOEC-tasoa suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä haitallinen vaikutus kuin LOEC-tasolla.

NOEC (No Observed Effect Concentration, vaikutukseton pitoisuus): Välittömästi LOEC-tasoa pienempi testipitoisuus.

EC_X: tässä testimenetelmässä se testiaineen pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin muutoksen kalan kasvunopeudessa verrattuna kontrolleihin.

Lastaustiheys: kalojen märkäpaino tilavuusyksikköä kohti.

Varastotiheys: kalojen lukumäärä tilavuusyksikköä kohti.

Yksittäisen kalan spesifinen kasvunopeus: yksittäisen kalan kasvunopeus verrattuna sen alkupainoon.

Tankkikohtainen keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: tankin populaation keskimääräinen kasvunopeus yhdessä pitoisuudessa.

Spesifinen pseudokasvunopeus: yksittäisen kalan kasvunopeus verrattuna tankkipopulaation keskimääräiseen alkupainoon.

▼B

1.3 TESTIN PERIAATE

Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevat kalanpoikaset punnitaan ja pannaan testiastioihin, jossa ne altistetaan useille veteen liuotettujen testiaineiden subletaaleille pitoisuuksille mieluiten läpivirtausolosuhteissa, tai jos se ei ole mahdollista, sopivissa puolistaattisissa (staattinen järjestelmä, jossa liuokset vaihdetaan) olosuhteissa. Testin kesto on 28 vuorokautta. Kalat ruokitaan päivittäin. Rehun määrä suhteutetaan kalojen alkupainoon, ja se voidaan laskea uudelleen 14 vuorokauden kuluttua. Testin lopussa kalat punnitaan uudelleen. Vaikutukset kasvunopeuteen analysoidaan käyttämällä regressiomallia sen pitoisuuden estimoimiseksi, joka aiheuttaisi x prosentin vaikutuksen kasvunopeuteen, ts. EC_X (esim. EC_{10},$EC_{,20}$ tai EC_{30}). Vaihtoehtoisesti tuloksia voidaan verrata kontrolliarvoihin pienimmän havaittavan vaikutuksen aiheuttavan pitoisuuden arvioimiseksi ja siitä edelleen sen pitoisuuden arvioimiseksi, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Välittömän myrkyllisyyden testin (ks. menetelmä C.l), joka on mieluiten tehty tähän testiin valitulla lajilla, tulosten pitäisi olla käytettävissä. Tämä tarkoittaa sitä. että testiaineen vesiliukoisuus ja höyrvnpaine tunnetaan, että käytettävissä on luotettava analyyttinen menetelmä aineen kvantifioimiseksi testiliuoksissa ja että menetelmän tarkkuus ja detektioraja tunnetaan ja ne on raportoitu.

Hyödyllisiä tietoja ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilisuus vedessä ja valossa, pK_a, P_{OW}. ja nopean biohajoavuuden testin tulokset (ks. menetelmä C.4).

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos

— kontrollien kuolleisuus ei ole suurempi kuin 10 % testin lopussa,

— kontrollikalojen keskimääräinen paino on noussut niin paljon, että voidaan osoittaa merkitseväksi katsottu kasvunopeuden minimivaihtelu. Rengastestissä (2) on osoitettu, että kirjolohelle kontrollikalojen keskimää räisen painon on noustava 28 vuorokaudessa vähintään puolella (ts. 50 %) verrattuna niiden alkupainoon. Esim: alkupaino: 1 g/kala (= 100 %), loppupaino 28 vuorokauden kuluttua: ≥ 1,5 g/kala (≥ 150 %),

— liuenneen hapen pitoisuus on vähintään 60 % ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.

— veden lämpötila vaihtelee enintään 1 °C testiastioiden välillä milloin tahansa testin aikana ja poikkeaa enintään 2 °C siitä lämpötila-alueesta, joka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäys 1).

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Laitteet ja tarvikkeet**

Tavallisia laboratoriolaitteita ja erityisesti seuraavat:

— a) happi- ja pH-mittarit:

▼B

— b) laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen;

— c) asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan;

— d) tankkeja, jotka ovat kemiallisesti inerttiä materiaalia ja riittävän suuria suhteessa suositeltuun lastaus- ja varastotiheyteen (ks. kohta 1.8.5 ja lisäys 1);

— e) riittävän tarkka vaaka (ts. ± 0,5 %).

1.6.2 **Vesi**

Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji elää ja kasvaa sopivan kauan. Veden laadun pitäisi pysyä vakiona testin ajan. Veden pH:n olisi oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin 0,5 pH-yksikköä. Suositeltava veden kovuus on yli 140 mg/l ($CaCO_3$). Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta), näytteitä olisi otettava säännöllisin väliajoin määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca, Mg, Na. K, C1, SO_4), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esim. kuuden kuukauden välein). Lisäyksessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden ominaisuuksia.

1.6.3 **Testiliuokset**

Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla.

Varastoliuos valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä tai ultraääntä. Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voidaan käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi.

Liuottimien tai liuotusapuaineiden (dispergointiaineiden) käyttö voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Sopivia liuottimia ovat esimerkiksi asetoni, etanoli, metanoli, dimetyylisulfoksidi, dimenyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sopivia dispergointiaineita ovat esimerkiksi Cremophor RH40, Tween 80, 0,01-prosenttincn metyyliselluloosa ja HCO-40. Helposti biohajoavia aineita (kuten asetonia) ja/tai helposti haihtuvia aineita käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa ongelmia bakteerikasvuston takia läpivirtaustesteissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta kalojen kasvuun eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia kalanpoikasiin. Se on osoitettava ainoastaan liuotinta sisältävän kontrollin avulla.

▼B

Läpivirtaustesteissä on käytettävä testiaineen varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) eri pitoisuuksia sisältävien näytteiden annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 % koko testin aikana. Rengastestissä (3) on osoitettu, että hyväksyttävä vedenvaihtotaajuus on kirjolohelle 6 litraa grammaa kalaa kohti päivässä (ks. kohta 1.8.2.2).

Puolistaattisissa (joissa liuokset vaihdetaan) testeissä kasvatusnesteen vaihtoväli riippuu testiaineen stabiilisuudesta, mutta vaihtoa suositellaan kerran päivässä, jos alustavista stabiilisuustesteistä (ks. kohta 1.4) tiedetään, ettei testiaineen pitoisuus pysy vakiona (ts. se ei ole välillä 80–120 % nimellisarvosta tai se laskee alle 80 prosenttiin mitatusta alkupitoisuudesta) vaihtojen välillä, olisi harkittava läpivirtaustestiä.

1.6.4 **Kalalajin valinta**

Kirjolohi *(Oncorhynchus mykiss*) on suositeltava laji tähän testiin, koska rengastestissä on eniten kokemusta siitä (1) (3). Muutakin hyvin dokumentoitua lajia saa käyttää, mutta testimenetelmää on mahdollisesti mukautettava, jotta testiolosuhteet olisivat sopivat. Kokemusta on esim. seeprakalasta *(Danio rerio)* (4) (5) ja medakasta *(Oryzias latipes)* (6) (7) (8). Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen.

1.6.5 **Kalojen hoito**

Testikalat on valittava yhdestä populaatiosta, mieluiten samasta poikueesta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuisessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä. Kaloille olisi annettava ravintoa vähintään 2 % ja mieluiten 4 % elopainoa kohti päivässä niiden kasvatus-aikana ja testin aikana.

Kalojen kuolleisuus rekisteröidään 48 tunnin sopeutumisajanjakson jälkeen. Tämän jälkeen sovelletaan seuraavia perusteita:

— jos kuolleisuus on yli 10 % populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: koko erä hylätään,

— jos kuolleisuus on välillä 5-10 % populaatiosta: kaloja totutetaan vielä seitsemän päivää. Jos kuolleisuus on yli 5 % näiden toisten seitsemän päivän aikana, koko erä hylätään,

— jos kuolleisuus on alle 5 % populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: erä hyväksytään.

Kaloille ei saisi antaa mitään hoitoa sairautta varten testiä edeltävien kahden viikon aikana eikä testin aikana.

▼B

1.7 TESTIN SUUNNITTELU

”Testin suunnittelu” tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, tankkien lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja kalojen lukumäärää tankkia kohti. Testi pitäisi suunnitella mieluiten niin, että otetaan huomioon

— a) tutkimuksen tarkoitus;

— b) käytettävä tilastollisen analyysin menetelmä;

— c) kokeessa tarvittavien resurssien saatavuus ja kustannukset.

Tavoitteita ilmoitettaessa olisi mahdollisuuksien mukaan spesifioitava, millä tilastollisella teholla tietynsuuruinen ero (esim. kasvunopeudessa) on osoitettava tai vaihtoehtoisesti millä tarkkuudella EC_X (esim. kun x = 10, 20 tai 30, ja mieluiten vähintään 10) on estimoitava. Muuten tutkimuksen kokoa ei voida määritellä tarkasti.

On tärkeää huomata, että suunnitelma, joka on optimaalinen (hyödyntää resurssit parhaiten) yhdelle tilastoanalyysimenetelmälle, ei ole välttämättä optimaalinen toiselle menetelmälle. LOEC/NOEC-arvon estimoinnille suositeltava suunnitelma ei siis olisi sama kuin regressioanalyysiä varten suositeltava.

Useimmissa tapauksissa regressioanalyysi on parempi kuin varianssianalyysi. Syitä ovat käsitelleet Stephan ja Rogers (9). Jos kuitenkaan ei löydetä sopivaa regressiomallia ($r^2 < 0,9$), olisi käytettävä NOEC|LOEC-menetelmää.

1.7.1 **Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma**

Regressioanalyysillä käsiteltävän testin suunnitelmassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— a) Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. $EC_{10,\ 20,\ 30}$) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta. Tarkkuus, jolla vaikutuspitoisuuksien estimaatit voidaan tehdä, on paras, kun vaikutuspitoisuus sijoittuu testattujen pitoisuuksien keskialueelle. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa.

— b) Jotta tilastollinen mallitus olisi mahdollista, testissä pitäisi olla vähintään yksi kontrollitankki ja viisi muuta tankkia, joissa on eri pitoisuudet. Jos käytetään liuotusapuaineita, on testisarjan lisäksi määritettävä yksi kontrolli, joka sisältää liuotusapuainetta suurimmassa testipitoisuudessa (ks. kohdat 1.8.3 ja 1.8.4),

— c) Sopivaa geometrista tai logaritmista sarjaa (10) (ks. lisäys 3) voidaan käyttää. On suositeltavaa tehdä pitoi suuksista logaritminen sarja.

▼B

— d) Jos käytettävissä on enemmän kuin kuusi tankkia, lisätankit olisi käytettävä joko rinnakkaismäärityksiin tai niissä olevat pitoisuudet olisi sijoitettava koko pitoisuusalueen yli, jotta pitoisuuksien eroja voidaan pie nentää. Kumpikin tapa on yhtä hyvä.

1.7.2 **Varianssianalyysillä (ANOVA) käsiteltävälle NOEC/LOEC-menetelmälle suositeltava testisuunnitelma**

Kullekin pitoisuudelle pitäisi olla mieluiten rinnakkaiset tankit, ja tilastollinen analyysi pitäisi tehdä tankkien tasolla (11). Ilman rinnakkaisia tankkeja ei voida tehdä korjauksia tankkien välisen vaihtelun ottamiseksi huomioon sen vaihtelun lisäksi, joka johtuu yksittäisistä kaloista. Kokemus on kuitenkin osoittanut (12), että tankkien välinen vaihtelu on erittäin pieni verrattuna tankin sisäiseen (ts. kalojen väliseen) vaihteluun. Suhteellisen hyväksyttävä vaihtoehto on siksi tehdä tilastollinen analyysi yksittäisten kalojen tasolla.

Tavanomaisesti käytetään vähintään viittä testipitoisuutta geometrisessa sarjassa, jolloin kerroin ei mielellään saa ylittää arvoa 3,2.

Yleensä kun testeissä on rinnakkaisia tankkeja, rinnakkaisten kontrollitankkien lukumäärän ja siten kalojen määrän pitäisi olla kaksi kertaa niiden määrä kussakin testipitoisuudessa, joiden pitäisi olla samansuuruiset (13) (14) (15). Jos sen sijaan ei käytetä rinnakkaisia tankkeja, kontrolliryhmän kalojen lukumäärän olisi oltava sama kuin niiden lukumäärä kussakin testipitoisuudessa.

Jos ANOVA-analyysin on määrä perustua tankkeihin eikä yksittäisiin kaloihin (mikä edellyttäisi joko kalojen yksilöllistä merkitsemistä tai spesifisen pseudokasvunopeuden käyttöä (ks. kohta 2.1.2)), on rinnakkaisia tankkeja oltava niin paljon, että kutakin pitoisuutta varten käytettävien tankkien välinen keskihajonta voidaan määrittää. Tämä tarkoittaa sitä. etta virhettä koskevien vapausasteiden määrän varianssianalyysissä on oltava vähintään 5 (11). Jos vain kontrolleista on rinnakkaiset, on vaara, että virheen vaihtelu vääristyy, koska se voi kasvaa kyseessä olevan kasvunopeuden keskiarvon mukana. Koska kasvunopeus todennäköisesti pienenee pitoisuuden noustessa, tämä saattaa johtaa vaihtelun estimointiin liian suureksi.

1.8. MENETTELY

1.8.1 **Kalojen valinta ja punnitus**

On tärkeää minimoida kalojen painon vaihtelu testin alussa. Lisäyksessä 1 mainitaan, minkälainen kokovaih-telu sopii tähän testiin suositelluille eri lajeille. Testissä käytettävässä koko kalaerässä yksittäisten kalojen painot eivät saisi vaihdella testin alussa mielellään enempää kuin ±10 % aritmeettisesta keskiarvosta eikä missään tapauksessa enemmän kuin 25 %. Suositellaan, että punnitaan alustava erä kaloja keskimääräisen painon arvioimiseksi.

▼B

Kantapopulaatiota ei saisi ruokkia 24 tuntiin ennen testin alkua. Kalat valitaan sitten satunnaistetusti. Kalat anestetisoidaan yleisellä anestesia-aineella (esim. vesiliuos, jossa on 100 mg/l trikaiinimetaanisulfonaattia (MS 222), joka on neutralisoitu lisäämällä kaksi osaa natriumbikarbonaattia yhtä osaa MS 222:ta kohti) ja punnitaan yksittäin (märkäpaino; pyyhekuivattuna) Lisäyksessä 1 mainitulla tarkkuudella. Kalat, joiden paino on annetuissa rajoissa, otetaan testiin ja jaetaan satunnaistetusti testiastioihin. Kalojen kokonaismärkäpaino kussakin testiastiassa kirjataan. Anestesia samoin kuin kalojen käsittely (kuten kuivaaminen ja punnitus) voi aiheuttaa kalanpoikasille, erityisesti pienikokoisille kaloille, stressiä ja vaurioita. Kalanpoikasia on siksi käsiteltävä äärimmäisen varoen stressin ja vahingoittumisen välttämiseksi.

Kalat punnitaan uudelleen päivänä 28 (ks. kohta 1.8.6), Jos katsotaan, että ruoka-annos on laskettava uudelleen, kalat voidaan punnita uudelleen päivänä 14 (ks. kohta 1.8.2.3). Muitakin menetelmiä, kuten valokuvaamista, voidaan käyttää kalojen koon muutosten määrittämiseksi. Rehun määrä voidaan siten mukauttaa koon muutoksiin.

1.8.2 **Altistusolosuhteet**

1.8.2.1 *Testin kesto*

Testin kesto on ≥ 28 vuorokautta.

1.8.2.2 *Lastaus- ja varastotiheys*

On tärkeää, että lastaus- ja varastotiheys ovat käytetylle kalalajille sopivia (ks. lisäys 1). Jos varastotiheys on liian suuri, ahtaus aiheuttaa stressiä, jonka seurauksena kasvunopeus laskee ja kalat voivat sairastua. Jos varas-totiheys on liian pieni, voi aiheutua territoriaalikäyttäytymistä, joka voi myös vaikuttaa kasvuun. Joka tapauksessa lastaustiheyden pitäisi olla niin pieni, että liuenneen hapen pitoisuus voidaan pitää vähintään arvossa 60 % ilman ilmastusta. Rengastestissä (3) on osoitettu, että hyväksyttävä lastaustiheys kirjolohelle on 16 kirjolohta (paino 3–5 g) 40 litrassa. Suositeltava veden vaihtamistaajuus testin aikana on 6 litraa grammaa kohti kalaa vuorokaudessa.

1.8.2.3 *Ruokkiminen*

Kaloille pitäisi antaa sopivaa ravintoa (lisäys 1) riittävästi, jotta kasvunopeus on hyväksyttävä. On varottava, ettei vedessä kasva mikrobeja eikä se samennu. Kirjolohelle mainitut edellytykset todennäköisesti täyttävä ruokintatiheys on 4 % elopainosta vuorokaudessa (3) (16) (17) (18). Päiväannos voidaan jakaa kahteen yhtä suureen osaan ja antaa kahtena kertana päivässä. Ruokintojen välin on oltava vähintään 5 tuntia. Annoksen määrä perustuu kalojen kokonaispainoon kutakin testiastiaa kohti testin alussa. Jos kalat punnitaan uudelleen päivänä 14, annos lasketaan uudelleen. Kaloja ei saa ruokkia 24 tuntiin ennen punnitusta.

▼B

Syömättä jäänyt rehu ja ulosteet on poistettava testiastioista päivittäin puhdistamalla tankkien pohjat huolellisesti imulaitteella.

1.8.2.4 *Valo ja lämpötila*

Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan pitäisi olla sopivia käytetylle testilajille (lisäys 1).

1.8.3 **Testipitoisuudet**

Yleensä tarvitaan viisi testipitoisuutta riippumatta testisuunnitelmasta (ks. kohta 1.7.2). Jos testiaineen myrkyllisyydestä on aiempia tietoja (esim. akuutista testistä ja/tai alustavista pitoisuusalueen määrityksistä), ne auttavat sopivien testipitoisuuksien valinnassa. Jos käytetään vähempää kuin viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Suurin testipitoisuus ei saisi olla suurempi kuin aineen liukoisuus veteen.

Kun varastoliuosten valmistuksessa käytetään jotakin liuotusapuainetta, sen lopputilavuus testiastioissa ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/l, ja tilavuuden pitäisi olla sama kaikissa testiastioissa (ks. kohta 1.6.3). Näiden aineiden käyttöä on kuitenkin vältettävä mahdollisimman pitkälle.

1.8.4 **Kontrollit**

Laimennusvesikontrollien lukumäärä riippuu testisuunnitelmasta (ks. kohdat 1.7–1.7.2). Jos käytetään liuotusapuainetta, testiin on otettava mukaan yhtä monta liuotusapuainekontrollia kuin laimennusvesikontrolleja.

1.8.5 **Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus**

Testiaineen pitoisuudet on määritettävä säännöllisin määräajoin testin aikana (ks. jäljempänä).

Läpivirtaustesteissä laimennusveden ja myrkyllistä ainetta sisältävän varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Jos testiainepitoisuuksien odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (ts. välillä 80–120 %, ks. kohdat 1.6.2 ja 1.6.3), suositellaan, että määritetään vähintään suurimmat ja pienimmät pitoisuudet testin alussa ja viikon välein sen jälkeen, jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (aineen stabiilisuutta koskevien tietojen perusteella), on analysoitava kaikki pitoisuudet noudattaen samanlaista järjestelmää.

Puolistaattisissa (jossa liuokset vaihdetaan) testeissä suositellaan, että määritetään vähintään suurimmat ja pienimmät pitoisuudet tuoreesta liuoksesta ja juuri ennen liuoksen vaihtoa testin alussa ja viikon välein sen jälkeen, jos testiainepitoisuuksien odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta. Jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta, on analysoitava kaikki pitoisuudet noudattaen samanlaista järjestelmää kuin stabiilimmille aineille.

▼B

Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos kuitenkin on näyttöä siitä, että testiaineen pitoisuus pysyy tyydyttävästi 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia.

Näytteet voivat edellyttää sentrifugointia tai suodatusta (esim. 0,45 um:n huokoskoon suotimella). Sentrifugointia suositellaan. Jos testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää.

Liuennut happi, pH ja lämpötila on mitattava testin aikana kaikista testiastioista. Veden kokonaiskovuus, emäksisyys ja suolapitoisuus (jos sillä on merkitystä) mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta, jossa on suurin pitoisuus. Vähintään olisi mitattava liuennut happi ja suolapitoisuus (jos sillä on merkitystä) kolmesti (testin alussa, keskivaiheilla ja lopussa). Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä liuennut happi mitataan useammin, mieluiten ennen kutakin veden vaihtoa ja sen jälkeen tai vähintään kerran viikossa. pH olisi mitattava kunkin vedenvaihdon alussa ja lopussa puolistaattisissa testeissä ja vähintään viikoittain läpivirtaustesteissä. Kovuus ja emäksisyys olisi mitattava kerran testin aikana. Lämpötilaa olisi mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

1.8.6 **Havainnot**

Paino: Testin lopussa on määritettävä kaikkien elossa olevien kalojen märkäpaino (pyyhekuivattuna) joko ryhmittäin testiastiaa kohti tai yksittäin. Punnitseminen testiastiaa kohti on parempi kuin yksittäisten kalojen punnitseminen, jolloin kalat olisi merkittävä yksilöllisesti. Jos mitataan kunkin kalan paino yksilöspesifisen kasvunopeuden määrittämiseksi, olisi valittava sellainen merkintätapa, joka ei stressaisi eläimiä (kylmämerkinnän vaihtoehdot, esim. hienon värillisen siiman käyttö, voivat olla sopivia).

Kaloja on havainnoitava päivittäin testin aikana, ja kaikki ulkoiset poikkeavuudet (kuten verenvuoto, värin muutokset) olisi pantava merkille. Mahdolliset kuolemantapaukset on kirjattava ja kuolleet kalat poistettava mahdollisimman nopeasti tankista. Kuolleiden kalojen tilalle ei panna uusia, sillä lastaus- ja varastotiheys ovat niin suuret, että kunkin tankin kalojen määrän muutokset eivät vaikuta kasvuun. Ruokkimistaajuutta on kuitenkin mukautettava.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Suositellaan, että sekä testin suunnittelussa että analysoinnissa on mukana tilastotieteilijä, koska menetelmä mahdollistaa huomattavaa joustoa kokeen suunnittelussa. Esim. testiastioiden lukumäärä, testipitoisuuksien lukumäärä ja kalojen lukumäärä voivat olla erilaiset.

▼B

Kasvunopeuksia ei lasketa sellaisille testiastioille, joissa kuolleisuus on yli 10 %. Kuolleisuus olisi kuitenkin ilmoitettava kaikille testipitoisuuksille.

Riippumatta tulosten analysointiin käytettävästä menetelmästä keskeinen käsite on spesifinen kasvunopeus r ajankohtien t_1, ja t_2 välillä. Se voidaan määritellä useilla tavoilla riippuen siitä, onko kalat merkitty yksilöllisesti vai ei ja siitä, tarvitaanko tankin keskiarvoa.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

jossa

r_1 = yksittäisen kalan spesifinen kasvunopeus

r_2 = tankkikohtainen keskimääräinen kasvunopeus

r_3 = spesifinen pseudokasvunopeus

W_1, W_2 = tietyn kalan paino ajankohdalla t_1, ja t_2

$\log_e W_1$ = yksittäisen kalan painon logaritmi testin alussa

$\log_e$, W_2 = yksittäisen kalan painon logaritmi testin lopussa

$\log_e W_1$ = w_1-arvojen logaritmien keskiarvo tankin kaloille testin alussa

$\log_e W_2$ = w_2-arvojen logaritmien keskiarvo tankin kaloille testin alussa

t_1,t_2 = aika (päiviä) testin alussa ja lopussa

r_1, r_2, r_3 voidaan laskea ajalle 0–28 vuorokautta ja tarvittaessa (ts. kun päivänä 14 on tehty mittaus) ajalle 0–14 vuorokautta ja 14–28 vuorokautta.

2.1.1 **Tulosten regressioanalyysi (pitoisuus-vastemallitus)**

Tässä analyysimenetelmässä sovitetaan sopiva matemaattinen vastaavuussuhde spesifisen kasvunopeuden ja pitoisuuden välille, ja sen avulla voidaan estimoida EC_x ts. mikä tahansa LC-arvo. Tämä menetelmä ei edellytä r-arvon laskemista yksittäisille kaloille (r_1); sen sijaan analyysi perustuu tankkia kohti määritettyyn keskiarvoon (r_2). Jälkimmäinen menetelmä on suositeltava. Se on parempi myös pienikokoisille kalalajeille.

Tankkikohtainen keskimääräinen spesifinen kasvunopeus (r_2) esitetään kuvaajassa pitoisuuden funktiona, jotta voidaan tarkastella pitoisuus-vastesuhdetta.

▼B

Jotta r_2-arvon ja pitoisuuden välinen suhde voidaan ilmaista, on valittava sopiva malli, ja valinnan tueksi on esitettävä asianmukaiset perustelut.

Jos elossa olevien kalojen määrä tankeissa on erilainen, on mallin sovitus — olipa se yksinkertainen tai epälineaarinen — painotettava siten, että siinä otetaan huomioon ryhmien epätasainen koko.

Mallin sovitusmenetelmän on oltava sellainen, että voidaan estimoida esim. EC_{20} ja laskea sen hajonta (joko keskivirhe tai luottamusväli). Sovitetun mallin kuvaaja on esitettävä mittaustulosten kanssa, jotta mallin sopivuus voidaan nähdä (8) (18) (19) (20).

2.1.2 **Tulosten analysointi LOEC-arvon estimoimiseksi**

Jos testissä on rinnakkaiset tankit kaikilla pitoisuuksilla, LOEC-arvon estimointi voi perustua tankkikohtaisen keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden varianssianalyysiin (ANOVA) (ks. kohta 2.1), jonka jälkeen sopivalla menetelmällä (esim. Dunnettin tai Williamsin testillä (12) (13) (14) (21) verrataan kullakin pitoisuudella saatua r-arvoa kontrollien keskimääräiseen r-arvoon, jotta voidaan tunnistaa pienin pitoisuus, jolla kyseinen ero on merkitsevä todennäköisyystasolla 0,05. Jos parametristen menetelmien edellyttämät vaatimukset eivät täyty –epänormaali jakauma (esim. Shapiro-Wilkin testi) tai heterogeeninen varianssi (Bartlettin testi) — olisi harkittava mittaustulosten muuntamista varianssien homogenisoimiseksi ennen ANOVA-analyysiä tai painotetun ANOVAn tekemistä.

Jos testissä ei ole rinnakkaisia tankkeja kaikilla pitoisuuksilla, tankkeihin perustuva ANOVA on epäherkkä tai mahdoton suorittaa. Tällaisessa tilanteessa on hyväksyttävää perustaa ANOVA yksittäisten kalojen spesifiseen pseudokasvunopeuteen r_3.

Kunkin testipitoisuuden keskimääräistä r_3-arvoa voidaan sitten verrata kontrollien keskimääräiseen r_3-arvoon. LOEC-arvo voidaan sitten määrittää kuten edellä. On todettava, että tässä menetelmässä ei voida ottaa lainkaan huomioon suurempaa tankkien välistä vaihtelua kuin minkä yksittäisten kalojen välinen vaihtelu selittää. Kokemus on kuitenkin osoittanut (9), että tankkien välinen vaihtelu on erittäin pieni verrattuna tankinsisäiseen (ts. kalojen väliseen) vaihteluun. Jos analyysi ei ota huomioon yksittäisiä kaloja, on selostettava suuresti poikkeavien näytteiden tunnistamiseen käytetty menetelmä ja perusteltava se.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testiliuosten myrkyllisen aineen pitoisuudet ovat lähellä määritysmenetelmän havaitsemisrajaa tai jos puolistaattisessa testissä testiaineen pitoisuus ennen liuoksen vaihtoa on pienempi kuin juuri valmistetussa liuoksessa.

2.3 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

▼B

2.3.1 **Testiaine**

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä,

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtausaste, ja testiaineen kvantifiointiin käytettävä analyyttinen menetelmä (tarvittaessa).

2.3.2 **Testissä käytettävät kalalajit**

— mahdollisesti tieteellinen nimi,

— kanta, koko, toimittaja, mahdolliset esikäsittelyt jne.

2.3.3 **Koeolosuhteet:**

— käytetty testimenetelmätyyppi (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, lastaustiheys, varastotiheys),

— testin suunnittelu (esim. testiastioiden, testipitoisuuksien ja rinnakkaisten näytteiden lukumäärä, kalojen lukumäärä astiaa kohti),

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtojen väli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitet tava, jos sellaista käytetään),

— nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laske miseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset on tehty todella liuoksessa olevasta testi aineesta,

— laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuus (jos se on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä, suspensiossa olevat kiinteät aineet, testiväliaineen suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja muut mahdolliset mittaukset,

— testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus,

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. rehu(je)n tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotaajuus).

2.3.4 **Tulokset:**

— näyttö siitä, että kontrollit täyttivät eloonjäämistä koskevan validiteettivaatimuksen, ja missä tahansa pitoi suudessa esiintynyttä kuolleisuutta koskevat tarkat tiedot,

— käytetyt analyyttiset tilastomenetelmät, rinnakkaisnäyte- tai kalaperusteiset tilastot, mittaustulosten käsittely ja käytettyjen tekniikoiden perustelut,

— taulukoidut mittaustulokset yksittäisten kalojen painoista ja keskimääräisistä painoista päivinä 0, 14 {jos on mitattu) ja 28, tankkikohtaiset keskimääräiset kasvunopeudet tai spesifiset pseudokasvunopeudet ajan jaksoille 0–28 vuorokautta tai mahdollisesti ajanjaksoille 0–14 ja 14–28 vuorokautta,

— tilastollisen analyysin (ts. regressioanalyysin tai ANOVAn) tulokset mieluiten taulukko- ja kuvaajamuodossa sekä LOEC-arvo ($p = 0{,}05$) ja NOEC-arvo tai EC_x-arvo sekä keskivirheet, jos mahdollista,

▼B

— kalojen mahdolliset epätavalliset reaktiot ja testiaineen aiheuttamat mahdolliset näkyvät vaikutukset.

3. LÄHDELUETTELO

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855–1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio*): rcsults of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157–164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G. VV., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (199 5). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol.28, pp. 287–297.

(7) Benoit, D. A., Holcombe, G. VV. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth. Minnesota.

(8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 pp.

(10) Cox D. R. (1958). Planning of experiments, Wiley Edt.

(11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

▼B

(14) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(15) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1485-1494.

(19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

▼B

Lisäys 1

TESTIIN SUOSITELLUT KALALAJIT JA SOPIVAT TESTIOLOSUHTEET

Laji	Suositeltu lämpötila-alue (°C)	Valojaksot (tuntia)	Suositellut kalojen painorajat testin alussa (g)	Vaadittu mittaustarkkuus	Lastaustiheys (g/l)	Varastotiheys (litraa kohti)	Rehu	Testin kesto (vrk)
Suositellut kalalajit:								
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	12,5–16,0	12–16	1–5	100 mg	1,2–2,0	4	Kaupallinen lohikalojen poikasten kuivarehu	≥ 28
Muita hyvin dokumentoituja lajeja:								
Danio rerio Seeprakala	21–25	12–16	0,050–0,100	1 mg	0,2–1,0	5–10	Elävää ravintoa *(Brachionus Artemia)*	≥ 28
Oryzias latipes Medaka	21–25	12–16	0,050–0,100	1 mg	0,2–1,0	5–20	Elävää ravintoa *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

▼B

Lisäys 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Pitoisuus
Kiinteät aineet	< 20 mg/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ammoniakki (ionisoitumaton)	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä ja polyklooratut bifebyylit	< 50 ng/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼B

Lisäys 3

Myrkyllisyystestiin soveltuvien pitoisuuksien logaritmiset sarjat (9)

Sarake välillä 100-10 tai välillä 10-1 olevien pitoisuuksien lukumäärä) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Sarakkeesta voi valita viiden (tai useamman) peräkkäisen pitoisuuden sarjan. Sarakkeessa (x) olevien pitoisuuksien keskivälillä olevia arvoja on sarakkeessa (2x + 1). Luetellut arvot voivat olla prosenttiosuuksina tilavuusyksikköä tai painoyksikköä kohti ilmaistuja pitoisuuksia (mg/l tai µg/l). Arvot voidaan tarvittaessa jakaa tai kertoa kymmenen potensseilla. Saraketta 1 voidaan käyttää, jos myrkyllisyystaso on hyvin epävarma

▼B

C.15 KALAN ALKIO- JA RUSKUAISPUSSIVAIHEEN POIKASILLA TEHTÄVÄ LYHYTAIKAINEN MYRKYLLISYYSTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä lyhytaikainen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 212 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä lyhytaikainen kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen poikasilla tehtävä myrkyllisyystesti on lyhytaikainen testi, jossa altistetaan testiaineelle varhaisessa kehitysvaiheessa olevia kalan alkioita juuri hedelmöityneistä munista ruskuaispussivaiheen loppuun asti. Alkio- ja ruskuaispussivaihetestissä ci anneta ravintoa, joten testi pitäisi lopettaa vaiheessa, jossa ruskuaispussivaihealkio saa vielä ravintonsa ruskuaispussista.

Testissä on tarkoitus määrittää kemikaalien letaalit ja rajoitetussa määrin subletaalit vaikutukset tietyn lajin tietyissä kehitysvaiheissa oleviin poikasiin. Tästä testistä saatavat tiedot olisivat hyödyllisiä, koska a) testin avulla voitaisiin muodostaa yhteys letaalien ja subletaalien vaikutusten välille, b) sitä voitaisiin käyttää joko täydellisen varhaiskehitysvaiheiden testin tai pitkäaikaisten myrkyllisyystestien seulontatestinä ja c) sillä voitaisiin testata lajeja, joiden kasvatusmenetelmät eivät ole vielä niin kehittyneet, että hallittaisiin vaihe, jolloin eläin siirtyy endogeenisestä ravinnonotosta eksogeeniseen ravinnonottoon.

Olisi muistettava, että kemikaalien pitkäaikainen myrkyllisyys kaloille voidaan yleensä arvioida tarkasti vain testeillä, jotka kattavat kaikki kalan elinkierron vaiheet. Jos altistetaan vain tietyissä kehitysvaiheissa olevia kaloja, testin herkkyys kärsii, ja pitkäaikainen myrkyllisyys voidaan aliarvioida. Sen vuoksi on odotettavissa, että alkio- ja ruskuaispussivaihetesti on vähemmän herkkä kuin täydellinen varhaiskehitysvaiheiden testi, erityisesti kun kysymyksessä ovat erittäin lipofiiliset (log P_{ow} > 4) kemikaalit ja sellaiset kemikaalit, joiden myrkyllisyysvaikutus on spesifinen. Kuitenkin voidaan odottaa, että kyseisten kahden testin väliset herkkyyserot ovat pienempiä kemikaaleilla, joilla on epäspesifinen narkoottinen vaikutus (1).

Ennen tämän testin julkaisemista useimmat tiedot alkio- ja ruskuaispussivaiheen kaloilla on saatu makeassa vedessä elävällä *Danio rerio* Hamilton-Buchanan -kalalla (Teleostei, Cyprinidae; yleinen nimi seeprakala). Tällä kalalla suoritettavasta testistä annetaan siksi yksityiskohtaisemmat ohjeet lisäyksessä 1. Muitakin lajeja, joista on kokemusta, voidaan kuitenkin käyttää (Taulukot 1 A ja 1 B).

1.2 MÄÄRITELMÄT

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): Pienin testiaineen testattu pitoisuus, jolla aineen havaitaan aiheuttavan merkitsevän vaikutuksen (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kuitenkin kaikilla LOEC-tasoa suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä haitallinen vaikutus kuin LOEC-tasolla.

NOEC (No Observed Effect Concentration): Välittömästi LOEC-tasoa pienempi testipitoisuus.

▼B

1.3 TESTIN PERIAATE

Alkio- ja ruskuaispussivaiheessa olevia kaloja altistetaan veteen liuotetun testiaineen eri pitoisuuksille. Testi voidaan tehdä testiaineesta riippuen joko puolistaattisena tai läpivirtaustestinä. Testin alussa hedelmöityneet munat pannaan testiastioihin, ja testi lopetetaan juuri ennen kuin mahdollisten toukkien ruskuaispussi on imeytynyt täydellisesti yhdessäkään testiastiassa tai ennen kuin kontrolleissa havaitaan ravinnonpuutteesta johtuvia kuolemantapauksia. Letaalit ja subletaalit vaikutukset arvioidaan ja niitä verrataan kontrolliarvoihin pienimmän havaittavan vaikutuksen aiheuttavan pitoisuuden arvioimiseksi ja siitä edelleen sen pitoisuuden arvioimiseksi, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta. Vaihtoehtoisesti vaikutukset voidaan arvioida käyttämällä regressiomallia sen pitoisuuden estimoimiseksi, joka aiheuttaisi tietyn prosentuaalisen vaikutuksen (ts. LC/EC_X, jossa x on määritelty prosenttiarvo).

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Välittömän myrkyllisyyden testin (ks. menetelmä C.1) tulosten pitäisi olla käytettävissä. Mieluiten samalla lajilla tehdyn testin tuloksista voi olla hyötyä valittaessa sopivaa pitoisuusaluetta varhaisten kehitysvaiheiden testiin. Testiaineen vesiliukoisuuden (myös liukoisuuden testissä käytettävään veteen) ja höyrynpaineen pitäisi olla tiedossa. Käytettävissä pitäisi olla myös tarkkuudeltaan ja määritysrajaltaan tunnettu sopiva analyyttinen menetelmä aineen määrittämiseksi kvantitatiivisesti testiliuoksissa.

Testiainetta koskevia tietoja, joista on hyötyä testiolosuhteiden määrittelemiseksi, ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, valostabiilisuus, stabiilisuus testiolosuhteissa, pKa, P_{ow} ja helpon biohajoavuuden testin tulokset (ks. menetelmä C.4).

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos

— hedelmöityneiden munien eloonjäämisaste kontrolleissa ja tapauksen mukaan ainoastaan liuotinta sisältävissä astioissa on vähintään yhtä suuri kuin lisäyksissä 2 ja 3 on määritelty,

— liuenneen hapen pitoisuus on 60-100 % ilman kyllästysarvosta koko testin ajan,

— veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,5°C testiastioiden välillä tai peräkkäisinä päivinä milloin tahansa testin aikana ja on niissä rajoissa, jotka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäykset 2 ja 3).

▼B

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Testiastiat**

Mitä tahansa lasista tai kemiallisesti inertistä materiaalista valmistettua astiaa voi käyttää. Astian pitäisi olla riittävän suuri kalamäärään nähden (ks. kohta 1.7.1.2). Suositellaan, että testiastiat sijoitetaan satunnaistetusti koealueelle. Satunnaistettu eristetty sijoittelu siten, että kussakin käsittelyssä olevia testiastioita on kussakin eristetyssä sijoituspaikassa, on parempi kuin täysin satunnaistettu järjestely, jos laboratoriossa on järjestelmällisiä vaikutuksia, jotka voidaan hallita eristyksellä. Jos eristystä käytetään, se on otettava huomioon tulostietojen käsittelyssä. Testiastiat olisi suojattava ei-toivotuilta häiriöiltä.

1.6.2 **Kalalajin valinta**

Suositeltavat kalalajit luetellaan taulukossa 1 A. Muitakin lajeja voidaan käyttää (esimerkkejä annetaan taulukossa 1 B), mutta testimenetelmää on silloin ehkä muutettava, jotta testiolosuhteet olisivat sopivat. Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen.

1.6.3 **Siitoskalojen kasvatus**

Siitoskannan kasvatuksesta tyydyttävissä oloissa annetaan yksityiskohtaiset ohjeet OECD:n testiohjeessa nro 210 ([1]) ja viitteissä (2) (3) (4) (5) (6).

1.6.4 **Alkioiden ja toukkien käsittely**

Alkioiden ja toukkien altistus voidaan tehdä ison astian sisällä olevissa pienemmissä astioissa, joiden laidoissa tai päädyissä on verkot, jolloin testiliuos pääsee virtaamaan astian läpi. Pienten astioiden läpi johdetaan pyörteeton virtaus ripustamalla astiat varteen, jota voidaan nostaa ja laskea astiassa siten, että eliöt ovat nestepinnan alla koko ajan. Myös lappoa ja nesteenlisäysjärjestelmää voidaan käyttää. Hedelmöityneitä lohensukuisten kalojen munia voidaan pitää telineissä tai verkoissa, joiden reiät ovat niin suuret, että toukat putoavat niistä läpi kuoriuduttuaan. Pasteur-pipettejä voidaan käyttää alkioiden ja toukkien poistamiseksi puolistaattisissa testeissä, jossa neste vaihdetaan päivittäin (ks. kohta 1.6.6).

Jos munien pitämiseksi isossa testiastiassa käytetään telineitä, ritilöitä tai verkkoja, ne olisi poistettava toukkien kuoriutumisen jälkeen ([1]). Verkot pitäisi kuitenkin säilyttää kalojen karkaamisen estämiseksi. Jos toukkia on siirrettävä, niitä ei saisi ottaa vedestä ilmaan eikä verkkoja saisi käyttää kalojen irrottamiseksi munatelineistä (tämä varokeino ei ehkä ole tarpeen, jos käytetään kestävämpiä kalalajeja, kuten karppeja). Siirtoajankohta vaihtelee lajeittain, eikä siirto ehkä ole aina välttämätöntä. Puolistaattisessa menetelmässä voidaan käyttää dekanterilaseja tai matalia astioita, ja niihin voi tarvittaessa kiinnittää verkon hieman pohjan yläpuolelle. Jos astiat ovat riittävän suuria kalamäärään nähden (ks. 1.7.1.2), alkioita tai toukkia ei ehkä tarvitse siirtää.

([1]) OECD, Pariisi, 1992, Test Guideline 210, Fish. Early-life Stage Toxicity Test.

▼B

1.6.5 **Vesi**

Testivedeksi käy vesi, joka täyttää lisäyksessä 4 mainitut hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia koskevat vaatimukset ja jossa testilaji säilyy elossa vähintään yhtä kauan kuin lisäyksissä 2 ja 3 edellytetään. Veden laadun on oltava tasainen testin ajan. pH:n vaihtelu ei saisi olla suurempi kuin ± 0,5 pH-yksikköä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, näytteitä olisi otettava säännöllisin väliajoin määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esim. kuuden kuukauden välein).

1.6.6 **Testiliuokset**

Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla.

Varastoliuos valmistetaan sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mieluiten mekaanisia menetelmiä tai ultraääntä. Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimien tai dispergointiaineiden (liuotusapuaineiden) käyttöä on vältettävä, jos mahdollista. Ne voivat kuitenkin olla joskus välttämättömiä riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Sopivia liuottimia ovat esimerkiksi asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sopivia dispergointiaineita ovat esimerkiksi Cremophor RH40, Tween 80, 0,01-prosenttinen metyyliselluloosa ja HCO-40. Helposti biohajoavia aineita (kuten asetonia) ja/tai helposti haihtuvia aineita käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa ongelmia bakteerikasvuston takia läpivirtaustesteissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta eloonjäämiseen eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia varhaisiin kehitysvaiheisiin. Tämä on osoitettava pelkkää liuotinta sisältävällä kontrollilla. Tällaisten aineiden käyttöä on kuitenkin pyrittävä välttämään aina, kun se on mahdollista.

Puolistaattisessa testissä voidaan käyttää kahta eri liuoksenvaihtomenetelmää: i) uudet testiliuokset valmistetaan puhtaissa astioissa ja elossa pysyneet munat ja toukat siirretään varovasti uusiin astioihin pienessä määrässä vanhaa liuosta välttäen kosketusta ilman kanssa tai ii) testieliöt pidetään astioissa ja osa (vähintään kolme neljäsosaa) testivedestä vaihdetaan. Kasvatusnesteen vaihtoväli riippuu testiaineen stabiilisuudesta, mutta vaihtoa suositellaan kerran päivässä. Jos alustavista stabiilisuustesteistä (ks. kohta 1.4) tiedetään, ettei testiaineen pitoisuus pysy vakiona (ts. se ei ole välillä 80-120 % nimellisarvosta tai se laskee alle 80 prosentin mitatusta alkupitoisuudesta) vaihtojen välillä, olisi harkittava läpivirtaustestiä. Joka tapauksessa olisi varottava stressaamasta toukkia veden vaihdon yhteydessä.

▼B

Läpivirtaustesteissä on käytettävä testiaineen varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 % koko testin aikana. Virtausnopeus, joka on vähintään viisi kertaa testiastian tilavuus 24 tunnissa, on havaittu sopivaksi (2).

1.7 MENETTELY

Kirjallisuudesta löytyy hyödyllistä tietoa kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen myrkyllisyystestin suorituskyvystä. Joitakin esimerkkejä on tämän ohjeen kirjallisuusluettelossa (7) (8) (9).

1.7.1 **Altistusolosuhteet**

1.7.1.1 *Testin kesto*

Testi olisi aloitettava 30 minuutin kuluessa munien hedelmöityksestä. Alkiot upotetaan testiliuokseen ennen alkiolevyn jakaantumisvaihetta tai mahdollisimman pian sen jälkeen, ja joka tapauksessa ennen gastrulavaiheen alkamista. Jos munat on hankittu kaupalliselta toimittajalta, ei testiä voi ehkä aloittaa heti hedelmöityksen jälkeen. Koska testin herkkyys voi kärsiä huomattavasti aloituksen viivästymisen johdosta, testi olisi aloitettava 8 tunnin kuluessa hedelmöityksestä. Koska toukkia ei ruokita altistuksen aikana, testi olisi lopetettava juuri ennen kuin mahdollisten toukkien ruskuaispussi on imeytynyt täydellisesti yhdessäkään testiastiassa tai ennen kuin kontrolleissa havaitaan ravinnonpuutteesta johtuvia kuolemantapauksia.Testin kesto riippuu käytetystä lajista. Lisäyksissä 2 ja 3 annetaan joitakin suosituksia testin kestosta.

1.7.1.2 *Kalojen lisääminen testiastiaan*

Hedelmöityneiden munien määrän testin alussa pitäisi olla riittävä tilastollista käsittelyä varten. Munat olisi jaettava satunnaistetusti eri käsittelyryhmiin, ja yhtä pitoisuutta kohti olisi käytettävä vähintään 30 hedelmöitynyttä munaa tasaisesti jaettuina (tai niin tasaisesti kuin mahdollista, koska voi olla vaikeaa saada aikaan yhtä suuria eriä joillakin lajeilla) vähintään kolmeen rinnakkaiseen testiastiaan. Kalojen määrän (biomassa testiliuoksen tilavuusyksikköä kohti) pitäisi olla niin pieni, että liuenneen hapen pitoisuus voidaan pitää vähintään arvossa 60 % ilman ilmastusta. On suositeltu, että läpivirtaustesteissä kalojen määrä saa olla enintään 5 g/l per 24 tuntia ja enintään 5 g/l liuosta minä tahansa ajankohtana (2).

1.7.1.3 *Valo ja lämpötila*

Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan pitäisi olla sopivia käytetylle testilajille (lisäykset 2 ja 3). Lämpötilan seurantaa varten voi olla tarpeen ylimääräinen testiastia.

▼B

1.7.2 **Testipitoisuudet**

Tavallisesti tarvitaan viisi testiaineen pitoisuutta, joiden välinen ero on vakio ja enintään 3,2-kertainen. Käyrää, jossa esitetään LC_{50} välittömän myrkyllisyystestin altistusajan funktiona, olisi käytettävä apuna valittaessa testipitoisuusaluetta. Vähemmän kuin viisi pitoisuutta voi olla riittävä määrä esim. raja-arvotesteissä, ja pitoisuuksien väli voi olla pienempi joissakin tapauksissa. Jos käytetään alle viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Pitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 96 tunnin LC_{50}, tai 100 mg/l (näistä alhaisempi arvo), ei tarvitse testata. Kemikaaleja ei pitäisi testata niiden liukoisuusrajaa suuremmissa pitoisuuksissa.

Kun testiliuosten valmistuksessa käytetään jotakin liuotusapuainetta (ks. kohta 1.6.6), sen lopputilavuus testiastioissa ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/1, ja tilavuuden pitäisi olla sama kaikissa testiastioissa.

1.7.3 **Kontrollit**

Testisarjan lisäksi on määritettävä yksi laimennusvesikontrolli (ja rinnakkaiset) sekä tapauksen mukaan yksi kontrolli, jossa on liuotusapuainetta (ja asianmukaiset rinnakkaiset).

1.7.4 **Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus**

Testiaineen pitoisuudet on määritettävä määräajoin testin aikana.

Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä, joissa testiainepitoisuuden odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (ts. välillä 80-120 %; ks. kohta 1.4 ja 1.6.6), analysoidaan vähintään suurin ja pienin pitoisuus juuri valmistetusta liuoksesta ja juuri ennen liuoksen vaihtoa vähintään kolme kertaa testin aikana tasaisin väliajoin (ts. samasta liuoksesta otetaan näyte, kun liuos on juuri valmistettu ja liuosta vaihdettaessa).

Jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (aineen stabiilisuutta koskevien tietojen perusteella), on analysoitava kaikki pitoisuudet tuoreesta liuoksesta ja liuosta vaihdettaessa noudattaen samanlaista järjestelmää (eli vähintään kolme kertaa testin aikana tasaisin väliajoin). Ennen liuoksen vaihtoa tehtävä määritys tarvitsee tehdä vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullakin testipitoisuudella. Määritysten väli saa olla enintään seitsemän vuorokautta. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos kuitenkin on näyttöä siitä, että testiaineen pitoisuus pysyy tyydyttävästi 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuutta tai mitattua alkupitoisuutta.

Läpivirtaustesteille sopii samanlainen näytteenottojärjestelmä kuin puolistaattisille testeille (vaikka ”vanhoja” liuoksia ei mitata). Jos testi kuitenkin kestää yli seitsemän vuorokautta, voi olla suositeltavaa lisätä näytteiden lukumäärää ensimmäisen viikon aikana (esim. kolme sarjaa määrityksiä) sen varmistamiseksi, että testipitoisuudet ovat pysyneet stabiileina.

▼B

Näytteet voivat edellyttää sentrifugointia tai suodatusta (esim. 0,45 μm:n huokoskoon suotimella). Koska sen enempää sentrifugoimalla kuin suodattamallakaan ei aina pystytä erottamaan testiaineen biologisesti hyödyntämiskelvotonta osaa biologisesti hyödynnettävästä osasta, näytteille ei tarvitse välttämättä tehdä kyseisiä toimenpiteitä.

Liuennut happi, pH ja lämpötila on mitattava testin aikana kaikista testiastioista. Veden kokonaiskovuus ja suolapitoisuus, jos se on merkityksellinen, mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta, jossa on suurin pitoisuus. Liuennut happi ja suolapitoisuus, jos se on merkityksellinen, olisi mitattava kolmesti (testin alussa, keskivaiheilla ja lopussa). Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä liuennut happi mitataan useammin, mieluiten ennen kutakin veden vaihtoa ja sen jälkeen tai vähintään kerran viikossa. pH olisi mitattava kunkin vedenvaihdon alussa ja lopussa puolistaattisissa testeissä ja vähintään viikoittain läpivirtaustesteissä. Kovuus olisi mitattava kerran testin aikana. Lämpötila olisi mitattava päivittäin, ja sitä olisi mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

1.7.5 **Havainnot**

1.7.5.1 *Alkiokehityksen vaiheet*

Alkiokehitysvaihe altistuksen alussa (ts. gastrulaatiovaihe) olisi varmistettava mahdollisimman tarkasti. Siinä voidaan käyttää sopivasti säilytettyä ja kirkastettua edustavaa näytettä munista. Kuvauksia ja kuvia alkiokehitykscn vaiheista löytyy kirjallisuudesta (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2 *Kuoriutuminen ja eloonjääminen*

Kuoriutumisesta ja eloonjäämisestä olisi tehtävä havaintoja vähintään kerran päivässä, ja yksilöiden lukumäärät on kirjattava. Voi olla toivottavaa tehdä havaintoja tiheämmin testin alussa (esim. 30 minuutin välein kolmen ensimmäisen tunnin aikana), koska joissakin tapauksissa elossapysymisaika voi olla merkityksellisempi kuin kuolemantapauksien lukumäärä (esim. silloin kun on välittömiä myrkkyvaikutuksia). Kuolleet alkiot ja toukat olisi poistettava heti, kun ne havaitaan, koska ne voivat hajota nopeasti. Kuolleita yksilöitä poistettaessa on oltava erittäin varovainen, ettei vieressä olevia munia tai toukkia kosketa tai vahingoiteta fyysisesti, sillä ne ovat hyvin herkkiä ja hauraita. Kuolemantapaukset todetaan eri kehitysvaiheessa eri tavoin:

— **munat:** erityisesti varhaisvaiheissa läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkymättömyys,

— **alkiot:** vartalo ei liiku ja/tai sydän ei lyö ja/tai läpinäkymättömyys tai värinmuutos sellaisessa lajissa, jonka alkiot ovat normaalisti läpikuultavia,

— **toukat:** toukat eivät liiku ja/tai niiden hengitysliikkeet puuttuvat ja/tai sydän ei lyö ja/tai keskushermosto on valkoinen ja läpinäkymätön ja/tai toukka ei reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin.

▼B

1.7.5.3 *Epänormaali ulkonäkö*

Sellaisten toukkien, joiden ruumiinmuodossa havaitaan epänormaalisuutta ja/tai pigmentaatiota, lukumäärä, sekä ruskuaispussin absorptioaste olisi kirjattava määräajoin testin kestosta ja kuvatun epänormaalisuuden laadusta riippuen. Huomattakoon, että epänormaaleja alkioita ja toukkia esiintyy luonnollisesti, ja niiden määrä voi olla useita prosentteja kontroll(e)issa joissakin lajeissa. Epänormaalit eläimet olisi vain poistettava testiastioista, kun ne kuolevat.

1.7.5.4 *Epänormaali käyttäytyminen*

Epänormaali käyttäytyminen, esimerkiksi hyperventilaatio, koordinoimaton uinti ja epätyypillinen liikkumattomuus, olisi kirjattava sopivin väliajoin testin aikana. Vaikka tällaisia vaikutuksia on vaikea kvantifioida, niiden havainnoiminen voi auttaa kuolleisuusdatan tulkinnassa, ts. niistä voi saada tietoa aineen myrkkyvaikutuksen laadusta.

1.7.5.5 *Pituus*

Suositellaan, että testin lopussa mitataan yksilöiden pituus. Voidaan käyttää vakio-, lovi- tai kokonaispituutta. Jos pyrstöevä tai muut evät ovat syöpyneet, on käytettävä vakiopituutta. Hyvin tehdyssä testissä kontrollirinnakkaisten pituuden vaihtelukerroin saisi olla enintään 20 %.

1.7.5.6 *Paino*

Testin lopussa voidaan punnita yksittäiset eläimet. Kuivapaino (24 tuntia, 60 ^{o}C) on suositeltavampi kuin märkäpaino (eläimet kuivataan pinnalta). Hyvin tehdyssä testissä kontrollirinnakkaisten painon vaihtelukerroin saisi olla enintään 20 %.

Näistä havainnoista saadaan tietoja seuraaviin tilastollisiin analyyseihin:

— kertyvä kuolleisuus,

— terveiden toukkien lukumäärä testin lopussa,

— aika kuoriutumisvaiheen alkuun ja loppuun (ts. kun 90 % kuoriutunut kussakin rinnakkaisnäytteessä),

— kunakin päivänä kuoriutuneiden toukkien lukumäärä,

— elossa olevien eläinten pituus (ja paino) testin lopussa,

— epämuodostuneiden tai epätavalliselta näyttävien toukkien lukumäärä,

— epätavallisesti käyttäytyvien toukkien lukumäärä.

▼B

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Suositellaan, että sekä testin suunnittelussa että analysoinnissa on mukana tilastotieteilijä, koska menetelmä mahdollistaa huomattavan vaihtelun kokeen suunnittelussa. Esim. testiastioiden lukumäärä, testipitoisuuksien lukumäärä, hedelmöityneiden munien lukumäärä testin alussa ja mitattava muuttuja voivat vaihdella. Koska testi voidaan suunnitella monella tavalla, tässä ei anneta erityisohjeita tilastomenetelmistä.

Jos on tarkoitus arvioida LOEC/NOEC, on variaatiot analysoitava kussakin rinnakkaisten joukossa varianssianalyysillä (ANOVA) tai kontingenssitaulukkomenetelmillä. Jos halutaan tehdä yhteisvertailu yksittäisten pitoisuuksien ja kontrollien välillä, Dunnettin menetelmästä voi olla hyötyä (12) (13). Muitakin hyviä esimerkkejä on saatavilla (14) (15). ANOVAA tai muita menetelmiä käyttämällä saatujen vaikutusten suuruus (ts. testin suorituskyky) olisi laskettava ja ilmoitettava. On huomattava, etteivät kaikki kohdassa 1.7.5.6 luetellut havainnot sovellu ANOVA-analyysiin. Esimerkiksi kertyvä kuolleisuus ja testin lopussa elossa olevien toukkien määrät voitaisiin analysoida probittimenetelmillä.

Jos on tarkoitus arvioida LC/EC_X, olisi sovitettava sopiva(t) käyrä(t), kuten logistinen käyrä, kyseessä oleviin mittaustietoihin käyttäen jotakin tilastomenetelmää, kuten pienimmän neliösumman menetelmää tai epälineaarista pienimmän neliösumman menetelmää. Käyrissä on käytettävä sellaisia muuttujia, että haluttu LC/EC_x ja sen vakiopoikkeama voidaan estimoida suoraan. Se helpottaa suuresti luottamusrajojen laskemista LC/EC_x:lle. Sovitusmenetelmän olisi oltava sellainen, että sen avulla voitaisiin arvioida sovituksen onnistumisen (tai sen puutteen) merkitsevyys. Ellei ole painavia syitä muunsuuruisten luottamusvälien käyttöön, olisi ilmoitettava kaksipuolinen 95 prosentin luottamusväli. Käyrien sovittamiseen voidaan käyttää graafisia menetelmiä. Regressioanalvysi soveltuu kaikkiin kohdassa 1.7.5.6 mainittuihin havaintoihin.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testiliuoksista mitatut myrkyllisen aineen pitoisuudet ovat lähellä määritysmenetelmän havaitsemisrajaa. Myös aineen liukoisuustuloa suuremmilla pitoisuuksilla saatujen tulosten tulkinnassa on oltava varovainen.

2.3 TEST1SELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.3.1 **Testiaine**

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä,

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtaus, ja testiaineen kvantifiointiin käytettävä analyyttinen menetelmä (tarvittaessa).

▼B

2.3.2 **Testissä käytettävät kalalajit**

— tieteellinen nimi, kanta, siitoskalojen lukumäärä (ts. kuinka monta naarasta käytettiin testissä käytettyjen munien tuottamiseen), hedelmöityneiden munien toimittaja ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

2.3.3 **Koeolosuhteet:**

— käytetty testimenetelmätyyppi (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, aika hedelmöitymisestä testin alkuun, testiastiaan lisättyjen emokalojen määrä),

— valoisa aika (valoisat aikajaksot),

— testin suunnittelu (esim. testiastioiden ja rinnakkaisten näytteiden lukumäärä, alkioiden määrä kussakin rinnakkaisastiassa),

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtojen väli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään),

— nimelliset testipitoisuudet, mitatut arvot, niiden keskiarvot ja keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset on tehty liuoksessa olevasta testiaineesta, mikäli testiaine on vesiliukoinen testipitoisuuksia pienemmissä pitoisuuksissa,

— laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä, suspensiossa olevat kiinteät aineet, testiväliaineen suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja muut mahdolliset mittaukset,

— testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus.

2.3.4 **Tulokset:**

— mahdollisista alustavista kokeista saadut testiaineen stabiilisuutta koskevat tulokset,

— näyttö siitä, että kontrollit täyttivät yleiset testilajin elinkyvyn hyväksyttävyyttä koskevat vaatimukset (lisäykset 2 ja 3),

— alkio- ja toukkavaiheen sekä yleistä kuolleisuutta/elinkykyä koskevat tulokset,

— päivien lukumäärä kuoriutumiseen ja kuoriutuneiden toukkien lukumäärä,

— pituus (ja paino),

— mahdollisten epämuodostumien ilmaantuvuus ja kuvaus,

— mahdollisten käyttäytymismuutosten ilmaantuvuus ja kuvaus,

— tulosten tilastollinen analyysi ja käsittely,

— ANOVALLA analysoiduille testeille LOEC (pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus) arvolla $p = 0,05$ ja NOEC (pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta) kullekin arvioidulle vasteelle sekä käytettyjen tilastomenetelmien kuvaus ja ilmoitus havaitun vaikutuksen suuruudesta,

▼B

— regressiotekniikoilla arvioiduille testeille LC/EC_x ja luottamusvälit sekä sen laskemiseen käytetyn sovitusmallin kuvaaja.

— selitys mahdollisiin poikkeamiin tästä testimenetelmästä.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoom A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *(Salmo gairdneri)*. J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, B*rachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, pp. 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish *(Danio rerio),* a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L, Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M, D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

Taulukko 1 A

Kalalajit, joita suositellaan käytettäväksi testissä

Makean veden kalat
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi (9) (16)
Danio rerio Seeprakala (7) (17) (18)
Cyprinus caprio Karppi (8) (19)
Oryzias latipes Medaka (20) (21)
Pimephales promelas Paksupäämutu (8) (22)

▼B

Taulukko 1 B

Esimerkkejä muista hyvin dokumentoiduista lajeista, joita on myös käytetty

Makean veden kalat	Suolaisen veden kalat
Carassius auratus Kultakala (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23) (24) (25)
Lepomis *macrochirus* Isoaurinkoahven (8)	*Clupea harengus* Silli (24) (25)
	Gadus morhua Turska (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Loistohammaskarppi (23) (24) (25)

▼B

LISÄYS 1

OHJEITA SEEPRAKALAN (*BRACHYDANIO RERIO*) ALKIO- JA RUSKUAISPUSSIVAIHEEN POIKASILLA TEHTÄVÄN MYRKYLLISYYSTESTIN SUORITTAMISEKSI

JOHDANTO

Seeprakala on peräisin Intian Coromandel-rannikolta, jossa se asuu voimakkaasti virtaavissa joissa. Se on yleinen karpinsukuinen akvaariokala, ja ohjeita sen hoidosta ja kasvatuksesta annetaan trooppisia kaloja koskevissa kirjoissa. Seepra-kalan biologiaa ja käyttöä kalatutkimuksessa on selostettu viitteessä Laale (1).

Seeprakala on harvoin pitempi kuin 45 mm. Ruumis on lieriömäinen, ja siinä on 7–9 tummansinistä vaakasuoraa hopeanhohtavaa raitaa. Raidat päättyvät pyrstö- ja peräeviin. Selkä on oliivinvihreä. Koiraat ovat naaraita hoikempia. Naarailla on voimakkaampi hopeanväri kuin koirailla ja niiden vatsa on isompi, erityisesti ennen mätimunien laskua.

Aikuiset kalat sietävät suuria lämpötilan, pH:n ja veden kovuuden vaihteluja. Jotta kalat olisivat terveitä ja tuottaisivat hyvälaatuisia munia, niille on kuitenkin tarjottava hyvät elinolot.

Parittelun yhteydessä koiras jahtaa ja puskee naarasta, ja mätimunat hedelmöittyvät, kun naaras laskee munat. Munat ovat läpikuultavia ja liukkaita ja vajoavat pohjaan. Aikuiset kalat voivat syödä niitä. Valo vaikuttaa paritteluun. Jos aamuvalo on riittävä, seeprakala parittelee yleensä aamunkoiton jälkeisinä tunteina.

Naaras voi tuottaa useita satoja munia viikon välein.

EMOKALAT, LISÄÄNTYMINEN JA VARHAISET KEHITYSVAIHEET

Valitaan sopiva määrä terveitä kaloja ja pidetään niitä sopivanlaatuisessa vedessä (esim. lisäys 4) vähintään 2 viikkoa ennen aiottua parittelua. Kalaryhmän pitäisi antaa paritella vähintään kerran ennen kuin tuotetaan testiä varten tarkoitettu munaerä. Kalojen määrä tänä aikana saisi olla enintään 1 gramma kalaa litrassa. Kalojen määrä voi olla suurempi, jos vesi vaihdetaan säännöllisesti tai käytetään puhdistusjärjestelmää. Kasvatustankkien lämpötilan olisi oltava 25 ± 2 °C. Kaloille pitäisi antaa vaihtelevaa ravintoa, jossa voi olla esimerkiksi sopivaa kaupallista kuivarehua, eläviä vasta kuoriutuneita Arthemia-vesikirppuja, surviaissääskiä, Daphnia-vesikirppuja ja ankyrimatoja (Enchytracids).

Seuraavassa selostetaan kaksi menetelmää, joilla on saatu käytännössä riittävä määrä terveitä, hedelmöityneitä munia testiä varten:

i) Kahdeksan naarasta ja 16 koirasta pannaan tankkiin, jossa on 50 litraa laimennusvettä ja joka on suojattu suoralta auringonvalolta. Tankin annetaan olla mahdollisimman häiriöttä vähintään 48 tuntia. Testiä edeltävänä päivänä iltapäivällä akvaarion pohjalle asetetaan parittelutarjotin, jossa on 5–7 cm korkea kehys (pleksilasia tai muuta sopivaa materiaalia), 2–5 mm:n isoreikäinen verkko yläosassa ja 10–30 µm:n hieno verkko pohjassa. Kehyksen isoreikäiseen verkkoon kiinnitetään useita auki kierretystä nailonnarusta tehtyjä ”parittelupuita”. Kun kalat ovat olleet pimeässä 12 tuntia, sytytetään heikko valo, joka käynnistää parittelun. Kahdesta neljään tuntia parittelun jälkeen tarjotin otetaan pois ja munat kerätään. Tarjotin estää kaloja syömästä munia, ja samalla munat on helppo kerätä siitä. Kalaryhmän pitäisi antaa paritella vähintään kerran ennen kuin tuotetaan testiä varten tarkoitettu munaerä.

▼B

ii) Viidestä kymmeneen koiras- ja naaraskalaa kasvatetaan yksittäin vähintään 2 viikkoa ennen aiottua parittelua. 5–10 päivän kuluttua naaraiden vatsat ovat isot ja genitaalinystyt näkyviä. Koiraskaloilla ei ole kyseisiä nystyjä. Parittelu tapahtuu parittelutankeissa, joissa on verkosta tehty valepohja (kuten edellä). Tankki täytetään laimennusvedellä niin, että vettä on verkon päällä 5–10 cm. Yksi naaras ja kaksi koirasta pannaan tankkiin päivää ennen aiottua parittelua. Veden lämpötilaa nostetaan vähitellen yhden asteen korkeammalle kuin totutteluläm pötila. Valo sammutetaan ja tankki jätetään mahdollisimman häiriöttä. Aamulla sytytään heikko valo, joka käynnistää parittelun. Kahdesta neljään tuntia parittelun jälkeen kalat otetaan pois ja munat kerätään. Jos tarvitaan enemmän munia kuin yhdeltä naaraalta saadaan, käytetään useampia parittelutankkeja. Kirjaamalla yksittäisten naaraiden jälkeläistentuotto ennen testiä (munien määrä ja laatu) voidaan valita parhaimmat naaraat poikasten tuottoon.

Munat olisi siirrettävä testiastioihin ohuilla lasiputkilla (sisähalkaisija vähintään 4 mm), joissa on imututti. Munien kanssa tulevan veden määrän pitäisi olla mahdollisimman pieni. Munat ovat vettä raskaampia ja putoavat putkesta. Munat (ja toukat) eivät saisi joutua kosketuksiin ilman kanssa. Munista pitäisi ottaa näytteitä ja tutkia niitä mikroskoopissa sen varmistamiseksi, ettei ensimmäisissä kehitysvaiheissa esiinny epänormaaleja ilmiöitä. Munia ei saa desinfioida.

Munien kuolleisuus on suurin ensimmäisten 24 tunnin aikana hedelmöityksestä. Kuolleisuus on tänä aikana usein 5–40 prosenttia. Munat hajoavat hedelmöittymisen epäonnistumisen tai kehityshäiriöiden takia. Munien laatu näyttää riippuvan naaraista, koska jotkut naaraat tuottavat jatkuvasti hyvälaatuisia munia ja toiset eivät koskaan. Myös kehittymis- ja kuoriutumisnopeus vaihtelevat munaerien välillä. Jos munien hedelmöitys on onnistunut, munat ja ruskuaispussivaiheen toukat (eloonjäämisprosentti yli 90) pysyvät hyvin elossa. Munat kuoriutuvat 25 ^{o}C:n lämpötilassa 3–5 päivää hedelmöityksen jälkeen, ja ruskuaispussi absorboituu noin 13 päivää hedelmöityksen jälkeen.

Hisaoka ja Battle (2) ovat kuvanneet hyvin sikiökehityksen. Koska munat ja toukat (kuoriutumisen jälkeen) ovat läpinäkyviä, kalojen kehitystä voidaan seurata ja epämuodostumia havainnoida. Noin 4 tuntia parittelun jälkeen hedelmöitymättömät munat voidaan erottaa hedelmöityneistä (3). Tätä tutkimusta varten munat ja toukat pannaan pieniin astioihin ja niitä tarkastellaan mikroskoopissa.

Lisäyksessä 2 kuvataan varhaisiin kehitysvaiheisiin sovellettavat testiolosuhteet. Optimiarvo pH:lle on 7,8 ja laimennusveden kovuudelle 250 mg $CaCO_3$/l.

LASKUTOIMITUKSET JA TILASTOLLINEN KÄSITTELY

Suositellaan, että tulosten käsittelyssä on kaksi vaihetta. Ensin käsitellään tilastollisesti kuolleisuutta, epänormaalia kehittymistä ja kuoriutumisaikaa koskevat tulostiedot. Sitten arvioidaan tilastollisesti ruumiin pituus niillä pitoisuuksilla, joilla ei havaittu haitallisia vaikutuksia edellä mainituissa muuttujissa. Tällaista menettelyä suositellaan, koska myrkky saattaa tappaa selektiivisesti pieniä kaloja, viivästyttää kuoriutumista ja aiheuttaa vakavia epämuodostumia, mikä johtaa vääristyneisiin pituuden mittauksiin. Lisäksi tällä tavoin menettelemällä saadaan suunnilleen sama määrä kaloja käsittelyä kohti, mikä varmistaa testin validiteetin.

▼B

LC_{50}- JA EC-$_{50}$-MÄÄRITYKSET

Eloonjääneiden munien ja toukkien määrä lasketaan prosentteina ja korjataan kontrollien kuolleisuuden suhteen Abbottin kaavalla (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100\right)$$

jossa

P = korjattu eloonjäämisprosentti

P' = testipitoisuudessa havaittu eloonjäämisprosentti

C = kontrollien eloonjäämisprosentti

Jos mahdollista, LC_{50} määritetään sopivalla menetelmällä testin lopussa.

Jos EC_{50}-tilastoihin halutaan sisällyttää epämuotoisuudet, ohjeita on viitteessä Stephan (5).

LOEC:N JA NOEC:N ESTIMOINTI

Muna- ja ruskuaispussitestin tarkoitus on verrata kontrolleja ja nollasta poikkeavia pitoisuuksia, ts. määrittää LOEC. Sen vuoksi olisi käytettävä yhteisvertailumenetelmiä (6) (7) (8) (9) (10).

LÄHDELUETTELO

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121–173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173–181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1–333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. F. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69–81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096–1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482–491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103–117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519–531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Lisäys 2

TESTIOLOSUHTEET, TESTIN KESTO JA ELOONJÄÄMISKRITEERIT SUOSITELLUILLE LAJEILLE

Laji	Lämpötila CO	Suolapitoisuus (0/00)	Valoisa aika (tuntia)	Kehitysvaiheiden kesto (päivää)		Tyypillinen testin kesto	Kontrollien eloonjäämisprosentti (vähintään)	
				Alkio	Ruskuaispussi		Kuoriutumisprosentti	Kuoriutumisen jälkeen
MAKEAN VEDEN KALA								
Brachydanio rerio Seeprakala	25 ± 1	—	12–16	3-5	8–10	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 5 vrk kuoriutumisen jälkeen (8–10 vrk)	80	90
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (*)	30–35	25–30	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 20 vrk kuoriutumisen jälkeen (50–55 vrk)	66	70
Cyprinus carpio Karppi	21–25	—	12–16	5	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (8–9 vrk)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 5 vrk kuoriutumisen jälkeen 13–16 vrk)	80	80
Pimephales promelas Paksupäämutu	25 ± 2	—	16	4–5	5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (8–9 vrk)	60	70

(1) Alkioille.
(2) Toukille.
(*) Alkiot ja toukat pidetään pimeässä viikon ajan kuoriutumisen jälkeen paitsi silloin, kun niitä tarkastellaan. Sen jälkeen heikko valaistus testin loppuun asti.

▼B

Lisäys 3

Testiolosuhteet, testin kesto ja eloonjäämiskriteerit muille hyvin dokumentoiduille lajeille

Laji	Lämpötila (°C)	Suolapitoisuus (0/00)	Valoisa aika (tuntia)	Kehitysvaiheiden kesto (vrk)		Tyypillinen alkio- ja ruskuaispussivaihetestin kesto	Kontrollien eloonjaamisprosentti	
				Alkiovaihe	Ruskuais-pussivaihe		Kuoriutumisprosentti	Kuoriutumisen jälkeen
MAKEAN VEDEN KALAT								
Carassius auratus Kultakala	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (7 vrk)	—	80
Leopomis macrochirus Isoaurinkoahven	21 ± 1	—	16	3	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (7 vrk)	—	75
SUOLAISEN VEDEN KALAT								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22–25	15–22	12	1,5	10	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 5 vrk kuoriutumisen jälkeen (6–7 vrk)	80	60
Clupea harengus Silli	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 3 vrk kuoriutumisen jälkeen (23–27 vrk)	60	80
Gadus morhua Turska	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 3 vrk kuoriutumisen jälkeen (18 vrk)	60	80
Cyprinodon variegatus Loistohammaskarppi	25 ± 1	15–30	12	—	—	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) — 4/7 vrk kuoriutumisen jälkeen (28 vrk)	> 75	80

▼B

Lisäys 4

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Pitoisuus
Kiinteät aineet	< 20 mg/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ammoniakki (ionisoitumaton)	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä ja polyklooratut bifebyylit	< 50 ng/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼B

C.16. MEHILÄISET — SUUN KAUTTA TAPAHTUNEEN ALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

1. MENETELMÄ

Tämä välittömän myrkyllisyyden testimenetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 213 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä myrkyllisyystesti on laboratoriomenetelmä, jonka tarkoituksena on arvioida kasvinsuojeluaineiden ja muiden kemikaalien välitöntä myrkyllisyyttä täysikasvuisille työmehiläisille oraalisen eli suun kautta tapahtuneen altistuksen jälkeen.

Arvioitaessa kemikaalien myrkyllisiä ominaisuuksia voidaan vaatia välittömän myrkyllisyyden määrittämistä mehiläisillä oraalisen altistuksen jälkeen esimerkiksi silloin, kun mehiläisten altistuminen tietylle kemikaalille on todennäköistä. Välittömän myrkyllisyyden testi tehdään mehiläisille myrkyllisten torjunta-aineiden ja muiden kemikaalien aineelle ominaisen myrkyllisyyden määrittämiseksi. Testituloksien avulla määritellään lisäarvioinnin tarve. Tätä menetelmää voidaan käyttää erityisesti ohjelmissa, joissa torjunta-aineista mehiläisille aiheutuvaa vaaraa arvioidaan vaiheittain, jolloin laboratoriossa tehtävien myrkyllisyystestien jälkeen edetään puoliksi kenttäolosuhteissa tehtäviin kokeisiin ja kenttäkokeisiin (1). Torjunta-aineita voidaan testata sekä tehoaineina että valmisteina.

Mehiläisten herkkyyden ja testimenetelmän tarkkuuden todentamiseksi olisi käytettävä myrkyllistä standardia.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Välitön myrkyllisyys suun kautta: Haittavaikutukset, jotka ilmenevät enintään 96 tunnin kuluttua siitä, kun testiainetta on annettu yksi annos suun kautta.

Annos: Nautitun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen massana (μg) testieläintä kohti (μg/mehiläinen). Todellista annosta kutakin mehiläistä kohti ei voida laskea, koska mehiläisiä ruokitaan yhtenä ryhmänä, mutta keskimääräinen annos voidaan arvioida (nautitun testiaineen kokonaismäärä / testimehiläisten lukumäärä yhdessä häkissä).

LD_{50} ((puolet tappava annos) suun kautta annosteltuna: Tilastollisesti laskettu yksittäinen annos, joka aiheuttaa kuoleman 50 %:ssa eläimistä suun kautta annosteltuna. LD_{50} ilmaistaan mikrogrammana testiainetta mehiläistä kohti. Kun on kysymys torjunta-aineesta, testiaine voi olla joko tehoaine tai valmiste, jossa on yksi tai useampia tehoaineita.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se on täysin liikkumaton.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Täysikasvuisia työmehiläisiä (*Apis mellifera)* altistetaan sarjalle sakkaroosiliuokseen liuotetun testiaineen annoksia. Mehiläisille annetaan tämän jälkeen sakkaroosiliuosta, jossa ei ole testiainetta. Kuolleisuus kirjataan päivittäin vähintään 48 tunnin ajan, ja sitä verrataan kontrolliarvoihin. Jos kuolleisuus lisääntyy 24 tunnin ja 48 tunnin välillä, mutta kontrollien kuolleisuus pysyy hyväksytyllä tasolla eli < 10 %, testiä jatketaan enintään 96 tuntiin saakka. Tulokset analysoidaan ja lasketaan 24 tunnin ja 48 tunnin LD_{50} sekä 72 tunnin ja 96 tunnin LD_{50}, jos testiä on jatkettu.

▼B

1.4 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos:

— keskimääräinen kuolleisuus kaikilla kontrolleilla ei ole suurempi kuin 10 % testin lopussa, ja

— myrkyllisen standardin LD_{50} on määritellyissä rajoissa.

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 **Mehiläisten kerääminen**

Testissä olisi käytettävä samaa rotua olevia täysikasvuisia työmehiläisiä. Niiden pitäisi olla saman ikäisiä, samalla tavalla ruokittuja jne. Testimehiläisten olisi oltava asianmukaisesti ruokittuja ja hyväkuntoisia, niissä ei saisi olla tauteja ja ne olisi otettava emollisista pesistä. Yhdyskuntien fysiologinen tila ja aiempi historia pitäisi tuntea. Mehiläiset olisi kerättävä sen päivän aamuna, jolloin ne käytetään, tai edellisenä iltana ja pidettävä testiolosuhteissa seuraavaan päivään. Sikiöttömiltä kakuilta kerätyt mehiläiset ovat sopivia. Keräämistä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä olisi vältettävä, koska mehiläisten fysiologia on erilainen näinä aikoina. Jos testit on tehtävä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä, mehiläisten voi antaa kuoriutua lämpökaapissa ja niitä voi kasvattaa viikon verran ”mesileivällä” (kakusta kerätyllä siitepölyllä) ja sakkaroosiliuoksella. Kemiallisilla aineilla kuten antibiooteilla ja varroapunkkilääkkeillä käsiteltyjä mehiläisiä ei saisi käyttää myrkyllisyystesteihin neljään viikkoon viimeisen käsittelyn lopusta.

1.5.2 **Häkit ja ruokinta**

Häkkien on oltava helposti puhdistettavia ja niissä on oltava hyvä ilmanvaihto. Kaikkia sopivia materiaaleja voi käyttää, kuten ruostumatonta terästä, metalliverkkoa tai muovia, tai häkit voivat olla kertakäyttöisiä puuhäkkejä. Kymmenen mehiläistä häkkiä kohti on sopivin määrä. Testihäkkien on oltava kooltaan riittävän tilavia mehiläismäärälle.

Mehiläisiä olisi pidettävä pimeässä koehuoneessa lämpötilassa 25 ± 2 °C. Suhteellinen kosteus, jonka pitäisi olla normaalisti 50-70 %, olisi rekisteröitävä koko testin ajan. Käsittelytoimenpiteet ja havainnot voidaan suorittaa (päivän)valossa. Ravintona käytetään sakkaroosiliuosta, jonka pitoisuus on 500 g/l (50 % w/v). Testiannosten antamisen jälkeen ravintoa on annettava *ad libitum*. Ruokintajärjestelmän olisi oltava sellainen, että ravinnonotto voidaan rekisteröidä jokaista häkkiä kohti (ks. kohta 1.6.3.1). Ravinnon annosteluun voidaan käyttää lasiputkea, joka on n. 50 mm pitkä ja 10 mm paksu ja jonka pää kapenee niin, että halkaisija on noin 2 mm.

1.5.3 **Mehiläisten valmistelu**

Kerätyt mehiläiset jaetaan satunnaisesti testihäkkeihin, jotka sijoitetaan satunnaisesti koehuoneeseen.

▼B

Mehiläisiä voidaan pitää ilman ravintoa enintään 2 tuntia ennen testin alkua. Suositellaan, että mehiläisiä pidetään ilman ravintoa ennen käsittelyä, jotta niiden suolen sisältö olisi samanlainen testin alkaessa. Kuolevat mehiläiset on hylättävä, ja niiden tilalle on otettava terveitä mehiläisiä ennen testin aloittamista.

1.5.4 **Annosten valmistus**

Jos testiaine on vesiliukoinen, se voidaan liuottaa suoraan 50-prosenttiseen sakkaroosiliuokseen. Tekniset valmisteet ja huonosti vesiliukoiset aineet voidaan liuottaa esimerkiksi sellaisen orgaanisen liuottimen tai emulgointi- tai dispergointiaineen avulla, jonka myrkyllisyys mehiläisille on vähäinen (esim. asetoni, dimetyyliformamidi, dimetyylisulfoksidi). Liuotinapuaineen pitoisuus riippuu testiaineen liukoisuudesta, ja sen pitäisi olla sama kaikille testattaville pitoisuuksille. Yhden prosentin pitoisuus on yleensä hyväksyttävä, eikä sitä saisi ylittää.

On myös valmistettava asianmukaiset kontrolliliuokset. Jos testiaineen liuottamiseen on käytetty liuotinta tai dispergointiainetta, pitäisi käyttää kahta erillistä kontrolliaineiden ryhmää: toinen olisi vesiliuos ja toinen sakkaroosiliuos, jossa on liuotinta / kantaja-ainetta siinä pitoisuudessa kuin sitä käytetään annosteluliuoksissa.

1.6 TESTIN SUORITUS

1.6.1 **Testi- ja kontrolliryhmät**

Testiannosten ja rinnakkaismääritysten määrän on täytettävä tilastolliset vaatimukset LD_{50}:n määrittämiseksi 95 %:n luottamusvälein. Tavallisesti vaaditaan viisi annosta, joiden pitoisuudet ovat geometrisessa sarjassa, jonka kerroin on enintään 2,2, ja jotka kattavat LD_{50}:n määrittämiseksi tarvittavan pitoisuusalueen. Laimennustekijä ja annosteltavien pitoisuuksien lukumäärä on kuitenkin määriteltävä myrkyllisyyskäyrän (kuolleisuus annoksen funktiona) kulmakertoimen mukaan, ja tulosten analysointiin valittu tilastollinen menetelmä on myös otettava huomioon. Alustavilla testeillä on määriteltävä sopivat annostelupitoisuudet.

Sama testipitoisuusannos olisi annettava vähintään kolmelle rinnakkaiselle testiryhmälle, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Testisarjan lisäksi olisi oltava vähintään kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Käytetyille liuottimille tai kantaja-aineille (ks. kohta 1.5.4) on oltava myös kontrollierät.

1.6.2 **Myrkyllinen standardi**

Testisarjassa on oltava myös myrkyllinen standardi. Siitä on oltava vähintään kolme annosta, jotka kattavat odotetun LD_{50}-arvon. Kutakin testiannosta varten on oltava vähintään kolme rinnakkaishäkkiä, joista kussakin kymmenen mehiläistä. Suositeltava myrkyllinen standardi on dimetoaatti, jonka 24 tunnin LD_{50}-arvon on raportoitu olevan alueella 0,10 - 0,35 µg tehoainetta / mehiläinen (2). Muutkin myrkylliset standardit ovat hyväksyttäviä, jos toimitetaan riittävästi tietoja odotetun annos-vastesuhteen todentamiseksi (esim. parationi).

▼B

1.6.3 **Altistus**

1.6.3.1 *Antotapa*

Kullekin mehiläisten testiryhmälle on annettava 100-200 µl 50-prosenttista sakkaroosin vesiliuosta, joka sisältää testiainetta sopivassa pitoisuudessa. Aineille, jotka ovat niukkaliukoisia, joiden myrkyllisyys on vähäinen tai joiden pitoisuus valmisteessa on pieni, tarvitaan suurempi nestetilavuus, koska on käytettävä aineiden suurempia osuuksia sakkaroosiliuoksessa. Ryhmää kohti kulunutta käsitellyn ravinnon määrää on seurattava. Kun ravinto on nautittu (tavallisesti 3-4 tunnin kuluessa), ruokintalaite on poistettava häkistä ja sen tilalle on pantava pelkästään sakkaroosiliuosta. Sitä annetaan sitten *ad libitum*. Joitakin aineita mehiläiset eivät ehkä syö, kun aineiden pitoisuus on suuri. Enintään 6 tunnin kuluttua nauttimatta jäänyt käsitelty ravinto otetaan pois ja korvataan sakkaroosiliuoksella. Nautitun käsitellyn ravinnon määrä on arvioitava (esim. mittaamalla jäljelle jääneen ravinnon tilavuus / paino).

1.6.3.2 *Testin kesto*

Testin kestoksi suositellaan 48 tuntia sen jälkeen kun testiliuos on korvattu sakkaroosiliuoksella. Jos kuolleisuus nousee edelleen yli 10 prosentilla ensimmäisten 24 tunnin jälkeen, koetta on jatkettava enintään 96 tuntiin saakka edellyttäen, ettei kontrollien kuolleisuus ole suurempi kuin 10 %.

1.6.4 **Havainnot**

Kuolleisuus kirjataan 4 tunnin kuluttua testin alusta ja sen jälkeen 24 tunnin ja 48 tunnin kuluttua (ts. annoksen antamisesta). Jos on tarpeen jatkaa havainnointia, havainnot on tehtävä 24 tunnin välein enintään 96 tuntiin saakka.

Ryhmää kohti kuluneen ravinnon määrä olisi arvioitava. Vertaamalla käsitellyn ja käsittelemättömän ravinnon nauttimisnopeutta 6 tunnin kuluessa voidaan saada käsitys käsitellyn ravinnon maittavuudesta.

Kaikki epänormaali käyttäytyminen testauksen aikana on kirjattava.

1.6.5 **Raja-annostesti**

Joissakin tapauksissa (esim. kun testiaineen myrkyllisyys oletetaan alhaiseksi) voidaan tehdä raja-arvotesti, jolloin käytetään 100 µg tehoainetta mehiläistä kohti sen osoittamiseksi, että LD_{50} on kyseistä arvoa suurempi. Raja-annostestissä olisi käytettävä samaa menettelyä kuin varsinaisessa testissä, ts. siinä on oltava kolme rinnakkaistestiryhmää annosta kohti, tarvittavat kontrollit, myrkyllinen standardi, ja nautitun käsitellyn ravinnon määrä on arvioitava. Jos esiintyy kuolleisuutta, on tehtävä täydellinen tutkimus. Jos havaitaan subletaaleja vaikutuksia (ks. kohta 1.6.4), ne on kirjattava.

▼B

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Määritystulokset on esitettävä taulukoituna, ja esityksestä on käytävä ilmi kussakin testiryhmässä sekä kontrolliryhmässä ja myrkyllistä standardia saaneessa ryhmässä käytettyjen mehiläisten lukumäärä, kuolleisuus kunakin havainnointihetkenä ja niiden mehiläisten lukumäärä, joissa havaitaan haittavaikutuksia. Kuolleisuustulokset on analysoitava sopivilla tilastomenetelmillä (esim. probittianalyysi, liukuva keskiarvo, binomiaalinen todennäköisyys) (3) (4). Annos-vastekuvaajat tehdään kutakin suositeltua havainnointiajankohtaa kohti, ja kuvaajien kulmakertoimet ja puolet tappava annos (LD_{50}) lasketaan 95 prosentin luottamusvälillä. Kontrollikuolleisuudesta johtuvat korjaukset voitaisiin tehdä Abbottin korjauksella (4) (5). Jos käsiteltyä ravintoa ei ole nautittu kokonaan, olisi määritettävä nautitun testiaineen annos ryhmää kohti. LD_{50}, olisi ilmaistava mikrogrammoina testiainetta mehiläistä kohti.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on oltava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine:**

— fysikaalinen olomuoto ja asian kannalta merkitsevät fysikokemialliset ominaisuudet (esim. stabiilisuus vedessä, höyrynpaine),

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien rakennekaava ja puhtaus (ts. torjunta-aineille tunnistetiedot ja tehoaine(id)en pitoisuus).

2.2.2 **Testilaji:**

— tieteellinen nimi, rotu, ikä suunnilleen (viikkoa), keräysmenetelmä, keräyspäivä,

— testimehiläisten keräykseen käytettyjä pesiä koskevat tiedot, mukaan lukien esim. mehiläisten terveydentila, mahdolliset täysikasvuisten taudit, mahdolliset esikäsittelyt.

2.2.3 **Testiolosuhteet:**

— koetilojen lämpötila ja suhteellinen kosteus,

— häkkien tyyppi, koko ja materiaali,

— varasto- ja testiliuosten valmistusmenetelmät (jos on käytetty liuotinta, sen nimi ja pitoisuus on mainittava),

— testin suunnittelu, esim. testipitoisuudet ja niiden määrä, kontrollien lukumäärä sekä kutakin testipitoisuutta ja kontrollia kohti rinnakkaisten häkkien määrä ja mehiläisten määrä häkkiä kohti,

— testin päivämäärä.

▼B

2.2.4 **Tulokset:**

— mahdolliset alustavan annosaluetutkimuksen tulokset,

— käsittelemättömät tulokset: kuolleisuus kullakin testipitoisuudella ja kullakin havainnointihetkellä,

— annos-vastekuvaajat testin lopussa,

— testiaineen ja myrkyllisen standardin LD_{50}-arvot 95 prosentin luottamusvälein kullakin suositellulla havainnointihetkellä,

— LD_{50}-arvon määrittämiseen käytetyt tilastomenetelmät,

— kontrollien kuolleisuus,

— muut havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset ja mehiläisissä mahdollisesti havaitut epänormaalit vasteet,

— mahdolliset poikkeamat tässä kuvatuista testimenettelyistä ja kaikki mahdollisesti tärkeät tiedot.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

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

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

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17 MEHILÄISET — KOSKETUSALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

1. MENETELMÄ

Tämä välittömän myrkyllisyyden testimenetelmä on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 214 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä myrkyllisyystesti on laboratoriomenetelmä, jonka tarkoituksena on arvioida kasvinsuojeluaineiden ja muiden kemikaalien välitöntä myrkyllisyyttä täysikasvuisille työmehiläisille kosketusaltistuksen jälkeen.

Arvioitaessa kemikaalien myrkyllisiä ominaisuuksia voidaan vaatia välittömän myrkyllisyyden määrittämistä mehiläisillä kosketusaltistuksen jälkeen esimerkiksi silloin, kun mehiläisten altistuminen tietylle kemikaalille on todennäköistä. Kosketusaltistuksen jälkeen ilmenevän välittömän myrkyllisyyden testin tarkoituksena on määrittää mehiläisille myrkyllisten torjunta-aineiden ja muiden kemikaalien aineelle ominainen myrkyllisyys. Testituloksien avulla määritellään lisäarvioinnin tarve. Tätä menetelmää voidaan käyttää erityisesti ohjelmissa, joissa torjunta-aineista mehiläisille aiheutuvaa vaaraa arvioidaan vaiheittain, jolloin laboratoriossa tehtävien myrkyllisyystestien jälkeen edetään puoliksi kenttäolosuhteissa tehtäviin kokeisiin ja kenttäkokeisiin (1). Torjunta-aineita voidaan testata sekä tehoaineina että valmisteina.

Mehiläisten herkkyyden ja testimenetelmän tarkkuuden todentamiseksi olisi käytettävä myrkyllistä standardia.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kosketusaltistuksen jälkeen ilmenevä välitön myrkyllisyys: Haittavaikutukset, jotka ilmenevät enintään 96 tunnin kuluttua siitä, kun testiainetta on aplikoitu paikallisesti yksi annos.

Annos: Aplikoidun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen massana (μg) testieläintä kohti (μg/mehiläinen).

LD_{50} (puolet tappava annos) ihon kautta annosteltuna: Tilastollisesti laskettu yksittäinen annos, joka aiheuttaa kuoleman 50 %:ssa eläimistä ihon kautta annosteltuna. LD_{50} ilmaistaan mikrogrammana testiainetta mehiläistä kohti. Kun on kysymys torjunta-aineesta, testiaine voi olla joko tehoaine tai valmiste, jossa on yksi tai useampia tehoaineita.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se on täysin liikkumaton.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Täysikasvuisia työmehiläisiä *(Apis mellifera)* altistetaan sopivaan kantaja-aineeseen liuotetun testiaineen annoksille siten, että ainetta aplikoidaan suoraan rintakehälle (tippoina). Testin kesto on 48 h. Jos kuolleisuus kasvaa 24 tunnin ja 48 tunnin välillä kontrollien kuolleisuuden pysyessä hyväksyttävällä tasolla, ts. < 10 %, testiä pitäisi jatkaa enintään 96 tuntiin saakka. Kuolleisuus kirjataan päivittäin, ja sitä verrataan kontrolliarvoihin. Tuloksista lasketaan LD_{50} 24 tunnin ja 48 tunnin kuluttua sekä 72 tunnin ja 96 tunnin kuluttua, jos testiä on jatkettu.

▼B

1.4 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos:

— keskimääräinen kuolleisuus kaikilla kontrolleilla ci ole suurempi kuin 10 % testin lopussa, ja

— myrkyllisen standardin LD_{50} on määritellyissä rajoissa.

1.5 TESTIN KUVAUS

1.5.1 **Mehiläisten kerääminen**

Testiin pitäisi käyttää nuoria täysikasvuisia työmehiläisiä, ts. sellaisia, jotka ovat saman ikäisiä, samalla tavoin ruokittuja, saman rotuisia jne. Testimehiläisten olisi oltava asianmukaisesti ruokittuja ja hyväkuntoisia, niissä ei saisi olla tauteja ja ne olisi kerättävä emollisista pesistä, joiden fysiologinen tila ja aiempi historia tunnetaan. Mehiläiset olisi kerättävä sen päivän aamuna, jolloin ne käytetään, tai edellisenä iltana ja pidettävä testiolosuhteissa seuraavaan päivään. Sikiöttömiltä kakuilta kerätyt mehiläiset ovat sopivia. Keräämistä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä olisi vältettävä, koska mehiläisten fysiologia on erilainen näinä aikoina. Jos testit on tehtävä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä, mehiläisten voi antaa kuoriutua lämpökaapissa ja niitä voi kasvattaa viikon verran ”mesileivällä” (kakusta kerätyllä siitepölyllä) ja sakkaroosiliuoksella. Kemiallisilla aineilla kuten antibiooteilla ja varroapunkkilääkkeillä käsiteltyjä mehiläisiä ei saisi käyttää myrkyllisyystesteihin neljään viikkoon viimeisen käsittelyn lopusta.

1.5.2 **Häkit ja ruokinta**

Häkkien on oltava helposti puhdistettavia ja niissä on oltava hyvä ilmanvaihto. Kaikkia sopivia materiaaleja voi käyttää, kuten ruostumatonta terästä, metalliverkkoa tai muovia, tai häkit voivat olla kertakäyttöisiä puuhäkkejä. Testihäkkien on oltava kooltaan riittävän tilavia mehiläismäärälle. Kymmenen mehiläistä häkkiä kohti on sopivin määrä

Mehiläisiä olisi pidettävä pimeässä koehuoneessa lämpötilassa 25 ± 2 °C. Suhteellinen kosteus, jonka pitäisi olla normaalisti 50-70 %, olisi rekisteröitävä koko testin ajan. Käsittelytoimenpiteet ja havainnot voidaan suorittaa (päivän)valossa. Ravintona käytetään sakkaroosiliuosta, jonka pitoisuus on 500 g/l (50 % w/v), ja sitä annetaan *ad libitum* testin ajan annostelulaitteen avulla, joka voi olla lasiputki (n. 50 mm pitkä ja 10 mm paksu ja jonka pää kapenee niin, että halkaisija on noin 2 mm).

1.5.3 **Mehiläisten valmistelu**

Mehiläiset voidaan keräyksen jälkeen anestesoida hiilidioksidilla tai typpikaasulla, jotta testiaine voidaan aplikoida. Anestesia-ainetta on käytettävä mahdollisimman pieni määrä ja mahdollisimman lyhyen aikaa. Kuolevat mehiläiset on hylättävä, ja niiden tilalle on otettava terveitä mehiläisiä ennen testin aloittamista.

1.5.4 **Annosten valmistelu**

Testiaine aplikoidaan kantaja-aineeseen, ts. orgaaniseen liuottimeen tai veteen tehtynä liuoksena, jossa on vettymistä edistävää ainetta. Orgaanisista liuottimista suositeltavin on asetoni, mutta muitakin orgaanisia liuottimia, joiden myrkyllisyys mehiläisille on vähäinen, voidaan käyttää (esim. dimetyyliformamidia tai dimetyylisulfoksidia). Orgaanisiin kantaja-aineisiin liukenemattomien veteen dispergoitujen valmisteiden ja erittäin polaaristen orgaanisten kemikaalien aplikointi voi olla helpompaa, jos niiden liuokset tehdään laimeaan kaupalliseen vettymistä edistävään aineeseen (esim. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Testissä olisi käytettävä asianmukaisia kontrolliliuoksia, ts. jos testiaineen liuottamiseen on käytetty liuotinta tai dispergointiainetta, pitäisi käyttää kahta erillistä kontrolliryhmää: sellaista, joka on käsitelty vedellä ja sellaista, joka on käsitelty liuottimella tai dispergointiaineella.

1.6 TESTIN SUORITUS

1.6.1 **Testi- ja kontrolliryhmät**

Testiannosten ja rinnakkaismääritysten määrän on täytettävä tilastolliset vaatimukset LD_{50}:n määrittämiseksi 9 5 %:n luottamusvälein. Tavallisesti vaaditaan viisi annosta, joiden pitoisuudet ovat geometrisessa sarjassa, jonka kerroin on enintään 2,2, ja jotka kattavat LD_{50}:n määrittämiseksi tarvittavan pitoisuusalueen. Annosteltavien pitoisuuksien lukumäärä on kuitenkin määriteltävä myrkyllisyyskäyrän (kuolleisuus annoksen funktiona) kulmakertoimen mukaan, ja tulosten analysointiin valittu tilastollinen menetelmä on myös otettava huomioon. Alustavilla testeillä on määriteltävä sopivat annostelupitoisuudet.

Sama testipitoisuusannos olisi annettava vähintään kolmelle rinnakkaiselle testiryhmälle, joista kussakin on kymmenen mehiläistä.

Testisarjan lisäksi olisi oltava vähintään kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Jos käytetään orgaanista liuotinta tai vettymistä edistävää ainetta, on testissä oltava myös orgaanista liuotinta tai vettymistä edistävää ainetta varten kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä.

1.6.2 **Myrkyllinen standardi**

Testisarjassa on oltava myös myrkyllinen standardi. Siitä on oltava vähintään kolme annosta, jotka kattavat odotetun LD_{50}-arvon. Kutakin testiannosta varten on oltava vähintään kolme rinnakkaishäkkiä, joista kussakin kymmenen mehiläistä. Suositeltava myrkyllinen standardi on dimetoaatti, jonka 24 tunnin LD_{50}-arvo on alueella 0,10 - 0,30 µg tehoainetta / mehiläinen (2). Muutkin myrkylliset standardit ovat hyväksyttäviä, jos toimitetaan riittävästi tietoja odotetun annos-vastesuhteen todentamiseksi (esim. parationi).

1.6.3 **Altistus**

1.6.3.1 *Antotapa*

Anestesoidut mehiläiset käsitellään yksitellen. Mehiläiset jaetaan satunnaistetusti eri testiannos- ja kontrolliryhmiin. Liuosta, joka sisältää 1 mikrolitran testiainetta sopivassa pitoisuudessa, aplikoidaan mikroaplikaattorilla kunkin mehiläisen rintakehän selkäpuolelle. Muita tilavuuksia voi käyttää, jos se on perusteltua. Mehiläiset jaetaan aplikaation jälkeen testihäkkeihin ja niille annetaan sakkaroosiliuosta.

1.6.3.2 *Testin kesto*

Testin keston olisi oltava mieluiten 48 tuntia. Jos kuolleisuus nousee edelleen yli 10 prosentilla 24 tunnin ja 48 tunnin välillä, testiä on jatkettava, kuitenkin enintään 96 tuntiin saakka, edellyttäen, ettei kontrollien kuolleisuus ole suurempi kuin 10 %.

▼B

1.6.4 **Havainnot**

Kuolleisuus kirjataan 4 tunnin kuluttua annostelusta ja 24 tunnin sekä 48 tunnin kuluttua. Jos on tarpeen jatkaa havainnointia, havaintoja on tehtävä 24 tunnin väliajoin enintään 96 tuntiin saakka, mikäli kontrollikuolleisuus ei ylitä 10:tä prosenttia.

Kaikki epänormaali käyttäytyminen testin aikana on kirjattava.

1.6.5 **Raja-annostesti**

Joissakin tapauksissa (esim. kun testiaineen myrkyllisyys oletetaan alhaiseksi) voidaan tehdä raja-arvotesti, jolloin käytetään 100 μg tehoainetta mehiläistä kohti sen osoittamiseksi, että LD_{50} on kyseistä arvoa suurempi. Raja-annostestissä olisi käytettävä samaa menettelyä kuin varsinaisessa testissä, ts. siinä on oltava kolme rinnakkaistestiryhmää annosta kohti, tarvittavat kontrollit ja myrkyllinen standardi. Jos esiintyy kuolleisuutta, on tehtävä täydellinen tutkimus. Jos havaitaan subletaaleja vaikutuksia (ks. kohta 1.6.4), ne on kirjattava.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Määritystulokset on esitettävä taulukoituna, ja esityksestä on käytävä ilmi kussakin testiryhmässä sekä kontrolliryhmässä ja myrkyllistä standardia saaneessa ryhmässä käytettyjen mehiläisten lukumäärä, kuolleisuus kunakin havainnointihetkenä ja niiden mehiläisten lukumäärä, joissa havaitaan haittavaikutuksia. Kuolleisuustulokset on analysoitava sopivilla tilastomenetelmillä (esim. probittianalyysi, liukuva keskiarvo, binomiaalinen todennäköisyys) (3) (4). Annos-vastekuvaajat tehdään kutakin suositeltua havainnointiajankohtaa (ts. 24, 48 ja tarvittaessa 72 ja 96 tuntia) kohti, ja kuvaajien kulmakertoimet ja puolet tappava annos (LD_{50}) lasketaan 95 prosentin luottamusvälillä. Kontrollikuolleisuudesta johtuvat korjaukset voitaisiin tehdä Abbottin korjauksella (4) (5). $LD_{5()}$ olisi ilmaistava mikrogrammoina testiainetta mehiläistä kohti.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on oltava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine:**

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esim. stabiilisuus vedessä, höyrynpaine),

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien rakennekaava ja puhtaus (ts. torjunta-aineille tunnistetiedot ja tehoaine(id)en pitoisuus).

2.2.2 **Testilajit:**

— tieteellinen nimi, rotu, ikä suunnilleen (viikkoa), keräysmenetelmä, keräyspäivä,

— testimehiläisten keräykseen käytettyjä pesiä koskevat tiedot, mukaan lukien esim. mehiläisten terveydentila, mahdolliset täysikasvuisten taudit, mahdolliset esikäsittelyt.

▼B

2.2.3 **Testiolosuhteet:**

— koetilojen lämpötila ja suhteellinen kosteus,

— häkkien tyyppi, koko ja materiaali,

— testiaineen antotapa, esim. käytetty kantaja-aine, aplikoidun testiliuoksen tilavuus, käytetty anestesia-aine,

— testin suunnittelu, esim. testiannokset ja niiden lukumäärä, kontrollien lukumäärä sekä kutakin testiannosta ja kontrollia kohti rinnakkaisten häkkien määrä ja mehiläisten määrä häkkiä kohti,

— testin päivämäärä.

2.2.4 **Tulokset:**

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— käsittelemättömät tulokset: kuolleisuus kullakin testipitoisuudella ja kullakin havainnointihetkellä,

— annos-vastekuvaajat testin lopussa,

— testiaineen ja kontrollin LD_{50}-arvot 95 % prosentin luottamusvälein kullakin havainnointihetkellä,

— LD_{50}-arvon määrittämiseen käytetyt tilastomenetelmät,

— kontrollien kuolleisuus,

— muut havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset ja mehiläisten mahdolliset epänormaalit vasteet,

— mahdolliset poikkeamat tässä kuvatuista testimenettelyistä ja kaikki mahdollisesti tärkeät tiedot.

3. **VIITTEET**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

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

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

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 8, pp. 265-267.

▼B

C.18 ADSORPTIO/DESORPTIO ERÄTASAPAINOMENETELMÄÄ KÄYTTÄEN

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD TG 106:sta, maa-aineksen adsorptio/desorptio-ominaisuuksien määrittämiseksi erätasapainomenetelmää käyttäen (2000).

1.1 JOHDANTO

Menetelmässä otetaan huomioon ”ring”-testi sekä maa-aineksen valitsemista koskeva seminaari (1) (2) (3) (4) adsorptiotestin kehittämiseksi samoin kuin kansallisella tasolla käytettävät ohjeet (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptio- ja desorptiotutkimuksista saadaan hyödyllisiä tietoja kemikaalien kulkeutumisesta ja niiden jakautumisesta biosfäärin maa-, vesi- ja ilmakerroksiin (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Tietoja voidaan käyttää esimerkiksi sen ennustamiseksi tai arvioimiseksi, miten kemikaalit hajoavat (22) (23), muuntuvat tai joutuvat eliöihin (24), uuttuvat maalajien läpi (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), haihtuvat maa-aineksesta (21) (29) (30) tai huuhtoutuvat maan pintakerroksista luonnonvesiin (18) (31) (32). Adsorptiotietoja voidaan käyttää vertailu- ja mallintamistarkoituksiin (19) (33) (34) (35).

Kemikaalin jakautuminen maa-ainekseen ja vesifaasiin on monimutkainen prosessi, joka riippuu lukuisista eri tekijöistä: aineen kemiallisesta luonteesta (12) (36) (37) (38) (39) (40), maa-aineksen ominaisuuksista (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) sekä ilmastollisista tekijöistä kuten sateista, lämpötilasta, auringosta ja tuulista. Näin ollen kemikaalin maa-aineksessa tapahtuvaan adsorptioprosessiin liittyviä moninaisia ilmiöitä ja mekanismeja ei voida täysin määritellä yksinkertaistetulla laboratoriomallilla, kuten tässä esitetyllä menetelmällä. Vaikka tällä menetelmällä ei ole mahdollista kattaa kaikkia ympäristön kannalta mahdollisia tapauksia, se antaa kuitenkin riittävästi tietoa kemikaalin adsorboitumisesta ympäristön kannalta merkityksellisellä tavalla.

Katso myös yleinen johdanto.

1.2 SOVELTAMISALA

Menetelmän tarkoituksena on arvioida, miten kemikaalit adsorboituvat maa-ainekseen tai desorboituvat siitä. Tavoitteena on saada sorptioarvo, jota voidaan käyttää ennustamaan jakautumista erilaisissa ympäristöolosuhteissa; tätä varten määritetään tasapainotilan adsorptiokertoimet kemikaalille erilaisissa maa-aineksissa maa-aineksen ominaisuuksien (esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH) funktiona. On käytettävä erilaisia maalajeja, jotta tietyn aineen ja luonnossa esiintyvien maa-ainesten väliset vuorovaikutukset voidaan kattaa mahdollisimman laajasti.

Tässä menetelmässä adsorptio edustaa kemikaalin sitoutumista maa-ainesten pintakerroksiin; siinä ei erotella erilaisia adsorptioprosesseja (fysikaalinen ja kemiallinen adsorptio) eikä esim. pintakatalysoitua hajoamista, massa-adsorptiota tai kemiallista reaktiota. Adsorptiota, joka tapahtuu maa-aineksesta syntyviin kolloidipartikkeleihin (halkaisija $< 0{,}2$ μm), ei ole otettu huomioon.

▼B

Tärkeimpinä adsorptiokäyttäytymiseen vaikuttavina maa-ainekseen liittyvinä muuttujina pidetään orgaanisen hiilen pitoisuutta (3) (4) (12) (13) (14) (41) (4 3) (44) (45) (46) (47) (48); savipitoisuutta ja maaperän rakennetta (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) sekä ionisoituvien yhdisteiden pH:ta (3) (4) (42). Muut maa-ainekseen liittyvät muuttujat, joilla saattaa olla vaikutusta tietyn aineen adsorptioon/desorptiooon ovat efektiivinen kationinvaihtokyky (ECEC), amorfisen raudan ja alumiinioksidien pitoisuus, erityisesti tulivuorialueiden ja trooppisten maa-ainesten (4) tapauksessa, samoin kuin ominaispinta-ala (49) ovat tärkeitä.

Testillä on tarkoitus arvioida kemikaalin adsorboitumista erityyppisiin maalajeihin, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH vaihtelevat eri tavoin. Testi käsittää kolme tasoa:

Taso 1 : Alustava tutkimus, jolloin määritetään:

— maa-aines/liuos-suhde,

— adsorptiotasapainotilan saavuttamiseksi tarvittava aika ja adsorboituneen testiaineen määrä tasapainotilassa,

— testiaineen adsorboituminen koeastioiden pintoihin sekä testiaineen stabiilius testijakson aikana.

Taso 2 : Seulontatesti: adsorptiokinetiikka tutkitaan viidessä erilaisessa maalajissa yhdellä pitoisuudella ja määritetään jakautumiskertoimet K_d ja K_{OC}.

Taso 3 : Freundlichin adsorptioisotermien määritys, jotta voidaan määrittää pitoisuuden vaikutus maa-aineksiin tapahtuvan adsorption laajuuteen.

Desorptiokinetiikka ja Freundlichin desorptioisotermit (lisäys 1).

1.3 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Symboli	Määritelmä	Yksiköt
A_{t_i}	adsorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i	%
A_{eq}	adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa	%
$m_s^{ads}(t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa ajanhetkellä t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa aikavälillä Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa adsorptiotasapainossa	µg
m_0	testiaineen massa koeputkessa, adsorptiotestin alussa	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	testiaineen massa mitattunav$_a^A$ määräosassa ajanhetkellä t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	aineen massa liuoksessa adsorptiotasapainotilassa	µg
m_{soil}	maa-ainesfaasin määrä, maa-aineksen kuiva-aineena ilmaistuna	g

▼B

Symboli	Määritelmä	Yksiköt
C_{st}	aineen varastoliuoksen massakonsentraatio	µg cm^{-3}
C_o	maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	aineen massakonsentraatio vesifaasissa analyysin suorituksen ajanhetkellä t_i	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneen aineen konsentraatio adsorptiotasapainotilassa	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	aineen massakonsentraatio vesifaasissa adsorptiotasapainotilassa	µg cm^{-3}
V_0	adsorptiotestin aikana maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin alkutilavuus	cm^3
v_a^A	määräosan tilavuus, jossa testiaine mitataan	cm^3
K_d	jakautumiskerroin adsorptiolle	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin	cm^3 g^{-1}
K_{om}	orgaanisen aineksen suhteen normalisoitu jakautumiskerroin	cm^3 g^1
K_F^{ads}	Freundlichin adsorptiokerroin	
l/n	Freundlichin eksponentti	
D_{t_i}	desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_1	%
$D_{\Delta t_i}$	desorboitumisprosentti aikavälillä Δt_i	%
K_{des}	näennäinen desorptiokerroin	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlichin desorptiokerroin	
$m_{aq}^{des}(t_i)$	maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa ajanhetkellä t_1	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa aikavälillä Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	analyyttisesti määritetyn aineen massa vesifaasissa desorptiotasapainotilassa	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	desorboituneen testiaineen kokonaismassa desorptiotasapainotilassa	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen aineen massa aikavälin Δt_i jälkeen	µg
m_{aq}^A	epätäydellisestä tilavuustäydennyksestä johtuen adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen aineen massa	µg
$C_s^{des}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa	µg g^{-1}

▼B

Symboli	Määritelmä	Yksiköt
$C_{aq}^{des}(eq)$	testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa desorptiotasapainotilassa	µg cm^{-3}
V_T	maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus sarjamenetelmällä suoritettavan desorptiokinetiikkakokeen aikana	cm^3
V_R	adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$-liuosta	cm^3
v_a^D	koeputkesta (i) analyysitarkoituksiin otetun määräosan tilavuus sarjamenetelmällä suoritettavan desorptiokinetiikkakokeen aikana	cm^3
$V_{ra}{}^{iD}$	koeputkesta (i) testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus desorptiokinetiikkakokeessa (rinnakkaismenetelmä)	cm^3
V_r^F	koeputkesta testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus desorptiotasapainotilassa	cm^3
MB	massatase	%
m_E	maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä kahdessa vaiheessa uutetun testiaineen kokonaismassa	µg
V_{rec}	adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen talteen otetun supernatantin tilavuus	cm^3
P_{ow}	oktanol-vesijakautumiskerroin	
pKa	hajoamisvakio	
S_w	vesiliukoisuus	g'''^1

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnetut tilavuudet testiaineliuoksia, merkitsemättöminä tai radioaktiivisesti merkittyinä, tunnettuina pitoisuuksina 0,01 M $CaCl_2$:ssa lisätään kuivapainoltaan tunnettuihin maa-ainesnäytteisiin, jotka on esitasapainotettu 0,01 M $CaCl_2$:ssa. Seosta ravistellaan riittävästi. Maa-ainessuspensiot sentrifugoidaan, suodatetaan haluttaessa ja vesifaasi analysoidaan. Maa-ainesnäytteeseen adsorboituneen testiaineen määrä lasketaan liuoksessa alussa olleen testiaineen määrän ja kokeen lopussa jäljellä olevan määrän välisenä erotuksena (epäsuora menetelmä).

Vaihtoehtoisesti adsorboituneen testiaineen määrä voidaan määrittää myös suoraan maa-ainesanalyysin avulla (suora menetelmä). Tätä menettelytapaa, johon kuuluu asteittainen maa-aineksen uutto sopivalla liuottimella, suositellaan silloin, kun aineen liuoskonsentraatioeroja ei voida täsmällisesti määrittää. Esimerkkejä tällaisista tapauksista ovat testiaineen adsorboituminen koeastioiden pintaan, testiaineen epästabiilius kokeen aikana, heikko adsorptio, mikä aiheuttaa vain pienen konsentraatiomuutoksen liuoksessa, sekä voimakas adsorptio, mikä saa aikaan alhaisen konsentraation, jota ei voida täsmällisesti määrittää, jos käytetään radioaktiivisesti merkittyä ainetta, maa-aineksen uutto voidaan välttää suorittamalla maa-ainesfaasin analyysi polttoa ja nestetuikelaskentaa käyttäen. Nestetuikelaskenta on kuitenkin epäspesifinen tekniikka, jolla ei voida erottaa lähtöaineita ja muunnostuotteita; siksi sitä olisi käytettävä ainoastaan silloin, kun testikemikaali on stabiili koko tutkimuksen keston ajan.

▼B

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Kemiallisten reagenssien on oltava analyysilaatua. Suositellaan merkitsemättömien, koostumukseltaan tunnettujen ja mieluiten puhtaudeltaan vähintään 95-prosenttisten testiaineiden käyttöä tai koostumukseltaan ja radio-isotooppipuhtaudeltaan tunnettujen radioaktiivisesti merkittyjen testiaineiden käyttöä. Jos merkkiaineiden puoliintumisajat ovat lyhyitä, on tehtävä hajoamiskorjauksia.

Testiaineesta on oltava seuraavat tiedot ennen adsorptio-desorptiotestin suorittamista:

a) vesiliukoisuus (A.6);

b) höyrynpaine (A.4) ja/tai Henryn lain vakio;

c) abioottinen hajoaminen: hydrolyysi pH:n funktiona (C.7);

d) jakautumiskerroin (A.8);

e) biologinen hajoavuus (C.4) tai aerobinen ja anaerobinen muuntuminen maa-aineksessa;

f) ionisoituvien aineiden pKa;

g) suora fotolyysi vedessä (eli UV-Vis-absorptiospektri vedessä, kvanttisaanto) ja fotohajoaminen maa-aineksessa.

1.6 TESTIN SOVELTUVUUS

Testi soveltuu kemiallisille aineille, joille on olemassa analyysimenetelmä, jota voidaan soveltaa riittävällä tarkkuudella. Tärkeä muuttuja, joka voi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen, erityisesti epäsuoraa menetelmää käytettäessä, on testiaineen stabiilius testin aikana. Siksi edellytyksenä on tarkistaa stabiilius alustavassa tutkimuksessa; jos testin aikana havaitaan muuttumista, suositellaan, että varsinainen tutkimus suoritetaan analysoimalla sekä maa-aines- että vesifaasi.

Tätä testiä suoritettaessa ongelmia saattavat aiheuttaa testiaineet, joiden vesiliukoisuus on alhainen ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), tai paljon varauksia sisältävät aineet. Vaikeudet johtuvat siitä, että konsentraatiota vesifaasissa ei voida tällöin mitata analyyttisesti riittävällä tarkkuudella. Näissä tapauksissa tarvitaan lisävaiheita. Ohjeita näiden ongelmien ratkaisemiseksi annetaan tätä menetelmää koskevissa kappaleissa.

Kun testataan haihtuvia aineita, on huolehdittava siitä, ettei käsittelyn aikana tapahdu häviöitä.

1.7 MENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 **Laitteet ja kemialliset reagenssit**

Standardi laboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

a) Koeputket tai astiat kokeiden suorittamiseksi. On tärkeää, että nämä koeputket tai astiat

— sopivat suoraan sentrifugiin aineiden käsittelystä ja siirtämisestä johtuvien virheiden minimoimiseksi,

— ovat inertistä materiaalista, mikä minimoi testiaineen adsorboitumisen niiden pinnalle.

▼B

b) Ravistelulaite: kääntelevä ravistelija tai vastaava laitteisto; ravistelulaitteen on pidettävä maa-aines suspensiona sekoituksen aikana.

c) Sentrifugi: mieluiten suurinopeuksinen, esimerkiksi keskipakovoima > 3 000 g, lämpötilaltaan säädettävä, pystyy erottelemaan halkaisijaltaan yli 0,2 μm olevat partikkelit vesiliuoksesta. Säiliöt on pidettävä suljettuina ravistelun ja sentrifugoinnin aikana haihtuvuus- ja vesihäviöiden välttämiseksi. Korkkeihin kohdistuvan adsorboitumisen minimoimiseksi on käytettävä deaktivoituja korkkeja, kuten teflonpäällysteisiä kierrekorkkeja.

d) Valinnainen: suodatuslaite; huokoisuudeltaan 0,2 μm:n steriilit kertakäyttösuodattimet. Suodatinmateriaalin valintaan on kiinnitettävä erityistä huomiota, jotta testiaine ci tartu siihen; orgaanista suodatinmateriaalia ei suositella niukkaliukoisille testiaineille.

e) Analyysivälineet, jotka soveltuvat testikemikaalin konsentraation mittaamiseen.

f) Laboratoriouuni, joka voidaan pitää lämpötilassa 103-110 ^{o}C.

1.7.2 **Maa-ainesten luonnehdinta ja valinta**

Maa-aineksista on määritettävä kolme ominaisuutta, joiden katsotaan pääasiassa vaikuttavan adsorptiokykyyn. Nämä ovat orgaaninen hiili, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH. Kuten jo mainittiin (katso soveltamisala}, muutkin maa-aineksen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet voivat vaikuttaa tietyn aineen adsorptioon ja desorptioon, ja ne täytyy ottaa huomioon kyseisissä tapauksissa.

Maa-aineksen luonnehdinnassa käytettävät menetelmät ovat hyvin tärkeitä, ja niillä voi olla merkittävä vaikutus tuloksiin. Siksi suositellaan, että maa-aineksen pH mitataan 0,01 M $CaCl_2$-liuoksessa (liuos, jota käytetään adsorptio/desorptiotestissä) ISO-menetelmän 10390-1 mukaisesti). Myös muita tärkeitä maa-aineksen ominaisuuksia suositellaan määritettäväksi standardimenetelmien mukaisesti (ISO Handbook of soil analysis). Tällöin sorptiotietojen analysointi voi perustua yleisesti standardoituihin maa-ainesta koskeviin muuttujiin. Joitakin käytössä olevien maa-aineksen analysointia ja luonnehdintaa koskevien standardimenetelmien ohjeita löytyy lähteistä 50-52. Maa-aineksen testimenetelmien kalibrointiin suositellaan vertailumaa-ainesten käyttöä.

Ohjeita maa-ainesten valitsemiseksi adsorptio/desorptiokokeisiin annetaan taulukossa 1. Seitsemän valittua maa-ainesta kattaa lauhkeilla maantieteellisillä alueilla esiintyvät maalajit. Ionisoituvien testiaineiden ollessa kyseessä valittujen maa-ainesten olisi katettava laaja pH-alue, jotta aineen adsorboituminen ionisoituneessa ja ionisoitumattomassa muodossa voidaan arvioida. Ohjeita siitä, kuinka montaa erilaista maa-ainesta käytetään testin eri vaiheissa, annetaan 1.9 kohdassa ”Testin suorittaminen”.

Jos muita maalajeja pidetään edellä mainittuja soveltuvampina, niistä on määritettävä samat muuttujat ja niillä on oltava erilaisia ominaisuuksia samalla tavoin kuin taulukossa 1 on esitetty, vaikka ne eivät täyttäisikään täsmälleen perusteita.

▼B

Taulukko 1

Ohjeet maa-ainesnäytteiden valitsemiseksi adsorptio-desorptiokokeisiin

Maalaji	pH-alue (0,01 M $CaCl_2$:ssa)	Orgaanisen hiilen pitoisuus (%)	Savipitoisuus (%)	Maaperän rakenne ([1])
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65-80	savi
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20-40	hiuesavi
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15-25	hiesusavi
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15-30	savikko
5	< 4,0 - 6,0 ([2])	< 0,5 - 1,5 ([2]) ([3])	< 10-15 ([2])	savinen hiekka
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 ([2]) ([3])	40-65	hiuesavi/savi
7	< 4,5	> 10	< 10	hiekka / savinen hiekka

([1]) FAO- ja US-järjestelmän mukaisesti (85).
([2]) Vastaavien muuttuja-arvojen olisi mieluiten oltava annetulla alueella. Jos sopivan maa-ainesmateriaalin löytämisessä kuitenkin ilmenee vaikeuksia, annettujen vähimmäisarvojen alapuolelle jäävät arvot hyväksytään.
([3]) Maa-ainekset, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus on alle 0,3 %, voivat häiritä orgaanisen aineen pitoisuuden ja adsorption välistä korrelaatiota. Siksi suositellaan käytettäväksi maa-aineksia, joiden orgaanisen hiilen vähimmäispitoisuus on 0,3 %.

1.7.3 **Maa-ainesnäytteiden kerääminen ja säilytys**

1.7.3.1 *Kerääminen*

Mitään erityistä näytteenottotekniikkaa tai -välineitä ei suositella; näytteenottotekniikka määräytyy tutkimuksen tarkoituksen mukaisesti (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Seuraavat seikat on otettava huomioon:

a) yksityiskohtaiset tiedot kenttäalueen sijainnista, kasvillisuudesta ja aiemmasta käytöstä (torjunta-aine- ja/tai lannoitekäsittelyt, biologiset lisäykset) tai tahattomasta kontaminaatiosta ovat välttämättömät. Maa-ainesten näytteenotossa olisi noudatettava näytteenottopaikan kuvausta koskevia ISO-standardin 10381-6 suosituksia;

b) näytteenottopaikka on määriteltävä UTM:n (Universal Transversal Mercator –projektio / European Horizontal Datum) mukaisesti tai maantieteellisten koordinaattien mukaisesti; näin tietyn maa-aineksen uudelleen kerääminen myöhemmin on mahdollista tai tästä voi olla apua määriteltäessä maa-aineksia eri maissa käytettyjen erilaisten luokitusjärjestelmien mukaisesti. Lisäksi A-kerroksesta olisi kerättävä ainoastaan enintään 20 cm:n syvyydeltä. Erityisesti maalajista nro 7 on otettava näyte O_h-kerroksesta, jos sitä esiintyy maa-aineksen osana.

Maa-ainesnäytteet on kuljetettava sellaisissa säiliöissä ja lämpöolosuhteissa, jotka takaavat, etteivät alkuperäiset maa-aineksen ominaisuudet muutu merkittävästi.

▼B

1.7.3.2 *Säilytys*

Käytetään mieluiten tuoreita kentältä otettuja maa-aineksia. Ainoastaan silloin, kun tämä ei ole mahdollista, maa-aines säilytetään huoneenlämpötilassa ja pidetään ilmakuivana. Mitään takarajaa säilytykselle ei suositella, mutta maa-ainekset, joita on säilytetty yli kolme vuotta, on analysoitava uudelleen ennen käyttöä niiden orgaanisen hiilen pitoisuuden, pH:n ja kationinvaihtokyvyn (CEC) osalta.

1.7.3.3 *Maa-ainesnäytteiden käsittely ja valmistelu testiä varten*

Maa-ainekset ilmakuivataan huoneenlämpötilassa (mieluiten lämpötilassa 20-25 °C). Kokonaisuuden pilkkominen on suoritettava mahdollisimman varovasti, jotta maaperän alkuperäinen rakenne muuttuisi mahdollisimman vähän. Maa-ainekset seulotaan partikkelikokoon < 2 mm; seulonnassa noudatetaan maa-ainesten näytteenottoa koskevia ISO-standardin suosituksia (ISO 10381-6). Huolellista homogenointia suositellaan sen vuoksi, että se parantaa tulosten uusittavuutta. Kunkin maa-aineksen kosteuspitoisuus määritetään kolmesta määräosasta kuumentamalla lämpötilassa 105 °C, kunnes painonmuutos ei ole merkittävä (noin 12 h). Kaikissa laskelmissa maa-aineksen massalla tarkoitetaan uunikuivaa massaa eli maa-aineksen kosteuspitoisuuskorjattua painoa.

1.7.4 **Testiaineen valmistus maa-ainekseen lisättäväksi**

Testiaine liuotetaan tislattuun tai deionisoituun veteen valmistettuun 0,01 M $CaCl_2$-liuokseen; $CaCl_2$-liuosta käytetään vesipitoisena liuotinfaasina parantamaan sentrifugointia ja minimoimaan kationinvaihtoa. Varastoliuoksen konsentraation on mieluiten oltava suuruusluokaltaan tuhatkertainen käytetyn analyysimenetelmän herkkyyteen verrattuna. Tällöin tällä menetelmällä saadaan tarkkoja mittauksia; lisäksi varastoliuoskonsentraation on oltava testiaineen vesiliukoisuusrajaa pienempi.

Varastoliuos valmistetaan mieluiten juuri ennen sen lisäämistä maa-ainesnäytteisiin, ja se säilytetään suljettuna pimeässä 4 °C:n lämpötilassa. Säilytysaika riippuu testiaineen stabiiliudesta ja sen konsentraatiosta liuoksessa.

Ainoastaan niukkaliukoisille aineille ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) saatetaan tarvita soveltuvaa liuottavaa ainetta silloin, kun testiaineen liuottaminen on vaikeaa. Tämän liuottavan aineen on sekoituttava veteen (esim. metanoli tai asetonitriili); sen konsentraatio ei saa ylittää yhtä prosenttia varastoliuoksen kokonaistilavuudesta ja sitä saa olla enintään tämän verran testiaineliuoksessa, joka joutuu kosketuksiin maa-aineksen kanssa (mieluiten alle 0,1 %). Se ei myöskään saa olla pinta-aktiivinen aine eikä se saa osallistua solvataatioreaktioihin testikemikaalin kanssa. Liuottavan aineen käytöstä on määrättävä ja sen käyttö on perusteltava tuloksia raportoitaessa.

Toisena vaihtoehtona on lisätä niukkaliukoinen testiaine koejärjestelmään siten, että testiaine liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, ja määräosa tästä lisätään järjestelmään, jossa on maa-ainesta ja tislattuun tai deionisoituun veteen valmistettua 0,01 M $CaCl_2$-liuosta. Orgaanisen liuottimen pitoisuus vesifaasissa on pidettävä mahdollisimman alhaisena, tavallisesti alle 0,1 prosentin. Testiaineen lisäys orgaanisessa liuoksessa voi vaikuttaa virheellisesti tilavuusmäärän toistettavuuteen. Näin ollen lisävirhe on mahdollinen, kun testiaineen ja lisäliuottimen konsentraatiot eivät ole samat kaikissa testeissä.

▼B

1.8 EDELLYTYKSET ADSORPTIO-DESORPTIOTESTIN SUORITTAMISELLE

1.8.1 **Analyysimenetelmä**

Tärkeimmät tekijät, jotka voivat vaikuttaa sorptiomittausten tarkkuuteen, ovat sekä liuos- että adsorptiofaasien analyyseissä käytettävän analyyttisen menetelmän tarkkuus, testiaineen stabiilius ja puhtaus, sorptiotasapainotilan saavuttamisaste, liuoskonsentraatiomuutoksen suuruus, maa-aines/liuos-suhde sekä muutokset maa-aineksen rakenteessa tasapainoprosessin aikana (35) (59-62). Lisäyksessä 2 esitetään joitakin esimerkkejä tarkkuutta koskevista kysymyksistä.

Käytetyn analyysimenetelmän luotettavuus on tarkistettava sillä konsentraatioalueella, joka todennäköisesti esiintyy testin aikana. Kokeen suorittaja voi vapaasti kehittää soveltuvan menetelmän, jonka tarkkuus, täsmällisyys, uusittavuus, herkkyys ja saanto ovat tarkoituksenmukaisia. Ohjeita tällaisen testin suorittamiseksi saadaan jäljempänä esitettävästä kokeesta.

Sopivaa määrää 0,01 M $CaCl_2$-liuosta, esimerkiksi 100 cm^3, ravistellaan 4 tunnin ajan yhdessä maa-ainesmäärän kanssa, esimerkiksi 20 g, jonka adsorptiokyky on hyvä, eli jonka orgaanisen hiilen pitoisuus ja savipitoisuus on korkea; nämä painot ja tilavuudet voivat vaihdella analyysitarpeiden mukaisesti. Sopivana lähtökohtana voidaan pitää maa-aines/liuos-suhdetta 1:5. Seos sentrifugoidaan ja vesifaasi voidaan suodattaa. Vesifaasiin lisätään tietty tilavuusmäärä testiaineen varastoliuosta, jotta saadaan nimellinen konsentraatio sille konsentraatioalueelle, joka todennäköisesti esiintyy testin aikana. Tämä tilavuusmäärä ei saa ylittää 10:tä prosenttia vesifaasin lopputilavuudesta — tällöin se muuttaa esitasapainotusliuoksen ominaisuuksia mahdollisimman vähän. Liuos analysoidaan.

Testaukseen on sisällytettävä yksi nollakoe, jossa on vain maa-aines ja $CaCl_2$-liuos (ilman testiainetta), jotta voidaan tarkistaa, johtuuko analyysimenetelmästä artefaktoja ja maa-aineksesta matriisivaikutuksia.

Analyysimenetelmät, joita voidaan käyttää sorptiomittauksiin, käsittävät kaasu-nestekromatografian (GLC), korkean suorituskyvyn nestekromatografian (HPLC), spektrofotometrian (esimerkiksi GC-massaspektrometria, HPLC-massaspektrometria) ja nestetuikelaskennan (vain radioaktiivisesti merkityille aineille). Käytetystä analyysimenetelmästä riippumatta pidetään sopivana, että saannot ovat 90-110 prosenttia nimellisarvosta. Jotta kromatografisen erotuksen jälkeen voidaan tulos detektoida ja arvioida, analyyttisen menetelmän herkkyyden olisi oltava suuruusluokaltaan nimelliskonsentraatiota vähintään kaksi kertaluokkaa pienempi.

Adsorptiotutkimuksiin käytettävän analyysimenetelmän ominaisuudet ja herkkyys ovat tärkeitä tekijöitä määriteltäessä koeolosuhteita ja testin koko suorituskykyä. Tässä menetelmässä noudatetaan yleisiä koekäytäntöjä ja annetaan suosituksia ja ohjeita vaihtoehtoisille ratkaisuille, jos analyysimenetelmä tai laboratoriomahdollisuudet asettavat rajoituksia.

▼B

1.8.2 **Optimaalisten maa-aines/liuos-suhteiden valinta**

Sopivien maa-aines/liuos-suhteiden valinta sorptiotutkimuksiin riippuu jakautumiskertoimesta K_d ja halutusta suhteellisesta adsorboitumisasteesta. Aineen konsentraationmuutos liuoksessa taas vaikuttaa adsorptioyhtälöön perustuvan mittauksen tilastolliseen tarkkuuteen ja on osoitus analyyttisen menetelmän herkkyydestä. Siksi käytännössä on hyödyllistä valita muutama kiinteä suhde, joilla adsorboitumisprosentti on yli 20 prosenttia ja mieluiten > 50 prosenttia (62); samalla on huolehdittava siitä, että testiaineen konsentraatio vesifaasissa on riittävän korkea tarkan mittauksen mahdollistamiseksi. Tämä on erityisen tärkeää silloin, kun adsorboitumisprosentit ovat suuria.

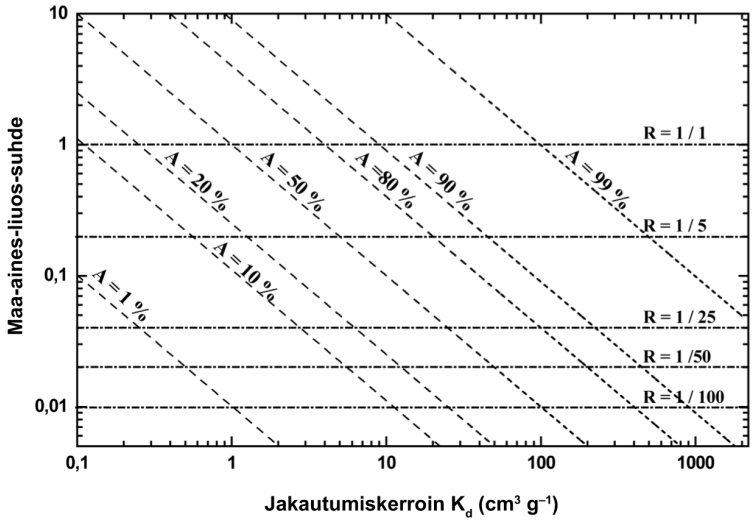
Sopiva lähestymistapa soveltuvien maa-aines/vesi-suhteiden valitsemiseksi perustuu joko alustavissa tutkimuksissa tai hyväksytyin arviointitekniikoin (lisäys 3) arvioituun K_d-arvoon. Soveltuvan suhteen valinta voidaan tehdä sitten K_d:n funktiona esitetyn maa-aines/liuos-suhdediagrammin pohjalta määrätyille adsorboitumisprosenteille (kuva 1). Esityksessä oletetaan, että adsorptioyhtälö on lineaarinen ([1]). Sopiva suhde saadaan järjestämällä K_d:n yhtälö (4) yhtälön (1) muotoon:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

tai sen logaritmiseen muotoon olettaen että $R = m_{soil}/V_0$ ja

$$A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$$

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{eq}\%/100}{1 - A_{eq}\%/100}\right] \qquad (2)$$



Kuva 1: Maa-aines-liuos-suhteiden ja K_d:n välinen yhteys testiaineen erilaisilla adsorboitumisprosenteilla.

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Kuvassa 1 esitetään tarvittavat maa-aines/liuos-suhteet K_d:n funktiona eri adsorboitumisasteille. Esimerkiksi maa-aines/liuos-suhteen ollessa 1:5 ja K_d:n ollessa 20 adsorboituminen on 80 prosentin luokkaa. Jotta saavutettaisiin 50 prosentin adsorboituminen samalla K_d-arvolla, on käytettävä suhdetta 1:25. Tällainen lähestymistapa sopivan maa-aines/liuos-suhteiden valitsemisessa antaa tutkijalle joustavuutta.

Vaikeammin käsiteltäviä tapauksia ovat ne, joissa kemikaali on voimakkaasti tai hyvin heikosti adsorboitunut. Silloin kun adsorboituminen on heikkoa, suositellaan maa-aines/liuos-suhteeksi 1:1, vaikkakin eräille hyvin orgaanisille maalajeille saatetaan tarvita pienempiä suhteita lietteen saamiseksi. Pienten liuoskonsentraatiomuutosten mittaamiseksi käytettävien analyysimenetelmien kanssa on oltava huolellinen: muutoin adsorptiomittaukset ovat epätarkkoja. Toisaalta K_d-jakautumiskertoimien ollessa hyvin suuria saatetaan maa-aines/liuos-suhteissa mennä jopa suhteisiin 1:100, jotta liuokseen jäisi merkittävä määrä kemikaalia. Huolellisuutta on kuitenkin noudatettava hyvän sekoituksen varmistamiseksi ja systeemin tasapainottumiseen on jätettävä riittävästi aikaa. Vaihtoehtoisena lähestymistapana on ennustaa K_d-arvo arviointitekniikkoja käyttäen, esimerkiksi P_{ow}-arvoihin (lisäys 3) perustuvaa tekniikkaa käyttäen. Tämä voi olla hyödyllistä erityisesti heikosti adsorboituville/polaarisille kemikaaleille, joiden $P_{ow} < 20$, ja lipofiilisille tai helposti sorboituville kemikaaleille, joiden $P_{ow} > 10^4$.

1.9 TESTIN SUORITTAMINEN

1.9.1 **Koeolosuhteet**

Kaikki kokeet suoritetaan huoneenlämpötilassa ja vakiolämpötilassa 20-25 °C, jos mahdollista.

Sentrifugoinnilla olisi voitava erottaa liuoksesta yli 0,2 μm:n kokoiset partikkelit. Tätä pidetään kiintoainepartikkelin ja kolloidipartikkelin raja-arvona. Ohjeita sentrifugointiolosuhteiden määrittelemiseksi annetaan lisäyksessä 4.

Jos sentrifugoinnilla ei voida poistaa yli 0,2 μm:n kokoisia partikkeleita, voidaan käyttää sentrifugoinnin ja yli 0,2 μm:n suodattimilla suoritettavan suodatuksen yhdistelmää. Näiden suodattimien on oltava sopivaa inerttiä materiaalia, jotta niiden pinnalle takertumisesta aiheutuvat testiaineen häviöt voitaisiin välttää. Joka tapauksessa on osoitettava, ettei suodatuksen aikana tapahdu testiainehäviöitä.

1.9.2 **Taso 1 — Alustava tutkimus**

Alustavan tutkimuksen tarkoitus on selvitetty jo kohdassa ”Soveltamisala”. Ohjeita kyseisen tutkimuksen toteuttamiseksi annetaan jäljempänä esitettävässä kokeessa.

1.9.2.1 *Optimaalisten maa-aines/liuos-suhteiden valitseminen*

Käytetään kahta maalajia ja kolmea maa-aines/liuos-suhdetta (kuusi koetta). Toisessa maalajissa orgaanisen hiilen pitoisuus on korkea ja savipitoisuus matala, ja toisessa maalajissa orgaanisen hiilen pitoisuus on matala ja savipitoisuus korkea. Suositellaan seuraavia suhteita:

— 50 g maa-ainesta ja 50 cm^3 testiaineen vesiliuosta (suhde 1/1),

▼B

— 10 g maa-ainesta ja 50 cm^3 testiaineen vesiliuosta (suhde 1/5),

— 2 g maa-ainesta ja 50 cm^3 testiaineen vesiliuosta (suhde 1/25).

Vähimmäismäärä maa-ainesta, jolla koe voidaan suorittaa, riippuu laboratoriomahdollisuuksista ja käytettyjen analyysimenetelmien suorituskyvystä. Käytettäväksi suositellaan kuitenkin vähintään l:tä grammaa ja mieluiten 2:ta grammaa maa-ainesta luotettavien testitulosten saamiseksi.

Yhdelle vertailunäytteelle. jossa on ainoastaan testiainetta 0,01 M $CaCl_2$-liuoksessa (ei maa-ainesta), suoritetaan täsmälleen samat toimenpiteet kuin testisysteemeille, jotta testiaineen stabiilius $CaCl_2$-liuoksessa ja sen mahdollinen adsorboituminen koeastioiden pinnalle voidaan tarkistaa.

Nollakokeella, jossa on sama määrä maa-ainesta ja liuoksen kokonaistilavuus 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (ilman testiainetta), suoritetaan samat testaustoimenpiteet kutakin maa-ainesta kohden. Tämä toimii taustavertailuna analyysin aikana häiritsevien aineiden tai kontaminoituneiden maa-ainesten havaitsemiseksi.

Kaikki kokeet, vertailu- ja nollakokeet mukaan lukien, suoritetaan vähintään rinnakkaisnäytteillä. Tutkimusta varten valmistettavien näytteiden kokonaismäärä voidaan laskea käytettävän menetelmän mukaisesti.

Alustava tutkimus ja varsinainen tutkimus tehdään yleisesti ottaen samoilla menetelmillä. Poikkeuksista mainitaan tarvittaessa.

Ilmakuivatut maa-ainesnäytteet saatetaan tasapainoon ravistelemalla niitä vähintään 45 cm^3:n kanssa 0,01 M $CaCl_2$-liuosta yön yli (12 h) ennen koepäivää. Myöhemmin lisätään tietty tilavuusmäärä testiaineen varastoliuosta, jotta lopputilavuudeksi saadaan 50 cm^3. Tämän lisättävän varastoliuoksen tilavuus ei saa ylittää 10:tä prosenttia vesifaasin lopputilavuudesta (50 cm^3), jotta esitasapainotusliuoksen ominaisuudet muuttuisivat mahdollisimman vähän, ja sen olisi mieluiten oltava sellainen, että maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiaineen alkukonsentraatio C_0 on suuruusluokaltaan vähintään satakertainen analyysimenetelmän herkkyyteen verrattuna; tällainen konsentraatio takaa tarkkojen mittausten suorittamisen myös silloin, kun adsorptio on voimakas (> 90 %) ja sen, että adsorptioisotermit voidaan myöhemmin määrittää. Suositellaan myös, jos mahdollista, ettei aineen alkukonsentraatio (C_0) ylittäisi puolta siitä, mikä on sen liukoisuusraja.

Jäljempänä esitetään esimerkki siitä, kuinka varastoliuoksen konsentraatio (C_{st}) lasketaan. Oletetaan, että toteamisraja on 0,01 μg cm^{-3} ja adsorptio 90 prosenttia; tällöin maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiaineen alkukonsentraation olisi mieluiten oltava 1 μg cm^{-3} (suuruusluokaltaan satakertainen toteamisrajaan verrattuna). Oletetaan, että varastoliuosta lisätään suositeltu enimmäismäärä eli 5 cm^3 45 cm^3:iin 0,01 M $CaCl_2$-tasapainoliuosta (= varastoliuos 10 % vesifaasin 50 cm^3:n kokonaistilavuudesta), jolloin varastoliuoksen konsentraation on oltava 10 μg cm^{-3}; tämä on suuruusluokaltaan tuhatkertainen analyysimenetelmän toteamisrajaan verrattuna.

Vesifaasin pH on mitattava ennen ja jälkeen maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutumista, koska tällä on tärkeä merkitys koko adsorptioprosessissa, erityisesti ionisoituvien aineiden ollessa kyseessä.

▼B

Seosta ravistellaan, kunnes adsorptiotasapainotila on saavutettu. Aika tasapainotilan saavuttamiseksi maa-aineksissa vaihtelee suuresti kemikaalin ja maa-aineksen mukaisesti; 24 tunnin jakso on yleensä riittävä (77). Alustavassa tutkimuksessa näytteitä voidaan kerätä järjestyksessä 48 tunnin sekoitusjakson aikana (esimerkiksi 4, 8, 24, 48 tunnin kohdalla). Analyysiajat on kuitenkin sovitettava joustavasti laboratorion työaikataluluun.

Testiaineen vesiliuoksen analysoimiseksi on kaksi vaihtoehtoa: a) rinnakkaismenetelmä ja b) sarjamenetelmä. On korostettava sitä, että vaikka rinnakkaismenetelmä vie kokeellisesti enemmän aikaa, tulosten matemaattinen käsittely on yksinkertaisempaa (liite 5). Käytettävän menetelmän valitsee kuitenkin kokeen suorittaja, jonka on otettava huomioon käytettävissä olevat mahdollisuudet ja resurssit laboratoriossa.

a) Rinnakkaismenetelmä: valmistetaan samalla maa-aines/liuos-suhteella niin monta näytettä kuin adsorptiokinetiikan tutkimiseksi halutaan näytteenottohetkiä. Sentrifugoinnin ja mahdollisen suodatuksen jälkeen ensimmäisen koeputken vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti ja mitataan esimerkiksi 4 tunnin jälkeen, vastaavasti toiselle koeputkelle 8 tunnin, kolmannelle koeputkelle 24 tunnin jälkeen ja niin edelleen.

b) Sarjamenetelmä: kullekin maa-aines/liuos-suhteelle valmistetaan ainoastaan yksi kaksoisnäyte. Tietyin aikavälein seos sentrifugoidaan faasien erottamiseksi. Vesifaasista otetaan pieni määräosa, josta testiaine analysoidaan välittömästi: koe jatkuu sitten alkuperäisellä seoksella. Jos käytetään suodatusta sentrifugoinnin jälkeen, laboratoriossa olisi oltava mahdollisuudet pienten vesipitoisten määräosien suodatuskäsittelyyn. Suositellaan, että otettujen määräosien kokonaismäärä ei ylitä yhtä prosenttia liuoksen kokonaistilavuudesta. Tämä siksi, ettei maa-aines/liuos-suhde muuttuisi merkittävästi ja ettei testin aikana adsorboituvissa olevan liukoisen massan määrä myöskään vähenisi.

Adsorboitumisprosentti, lasketaan kullakin ajanhetkellä (A_{t_i}) nimellisen alkukonsentraation pohjalta ja näytteenottohetkellä (A_{t_i}) mitattu konsentraatio korjataan nollakoearvon perusteella. Ajan funktiona esitettäviä käyriä (kuva 1, liite 5) käytetään tasapainotilan saavuttamisen arvioimiseksi ([1]). Lasketaan myös K_d-arvo tasapainotilassa. Tämän K_d-arvon pohjalta valitaan kuvasta 1 sopivat maa-aines/liuos-suhteet siten, että adsorboitumisprosentti on yli 20 prosenttia, mieluiten > 50 prosenttia (61). Kaikki diagrammeissa käytettävät yhtälöt ja periaatteet esitetään kohdassa ”Tulokset ja niiden raportointi” sekä lisäyksessä 5.

1.9.2.2 *Adsorptiotasapainotilan saavuttamisajan määrittäminen ja adsorboituneen testiaineen määrittäminen tasapainotilassa*

Kuten jo mainittiin, ajan funktiona esitettävienA_{t_i} taiC_{aq}^{ads} -käyrien avulla on mahdollista arvioida adsorptiotasapainotilan saavuttamista ja adsorboituneen testiaineen määrää tasapainotilassa. Lisäyksessä 5 esitetyissä kuvissa 1 ja 2 on esimerkkejä tällaisista käyristä. Tasapainottumisaika on se aika, jonka systeemi tarvitsee tasapainon saavuttamiseen.

([1]) Vesifaasissa olevan testiaineen konsentraatiotaC_{aq}^{ads} ajan funktiona kuvaavia diagrammeja voidaan käyttää myös tasapainotilan saavuttamisen arviointiin (katso kuva 2 lisäyksessä 5).

▼B

Jos jotain tiettyä maa-ainesta tutkittaessa tasapainotilaa ei saavuteta, vaan konsentraatio nousee jatkuvasti, tämä voi johtua sekoittavista tekijöistä kuten biohajoamisesta tai hitaasta diffuusiosta. Biohajoaminen voidaan osoittaa toistamalla koe steriloitua maa-ainesnäytettä käyttäen. Jos tasapainotilaa ei tällöinkään saavuteta, kokeen suorittajan on etsittävä muita ilmiöitä, jotka saattaisivat liittyä kyseisiin tutkimuksiin: tämä voidaan tehdä muuntelemalla koeolosuhteita sopivasti (lämpötila, ravisteluajat, maa-aines/liuos-suhteet). Kokeen suorittajan päätettävissä on, jatkaako hän testin suoritusta, vaikka tasapainotila saattaa jäädä saavuttamatta.

1.9.2.3 *Adsorptio koeastian pintaan ja testiaineen stabiilius*

Joitakin tietoja testiaineen adsorboitumisesta koeastioiden pintaan samoin kuin sen stabiiliudesta voidaan johtaa vertailunäytteiden analysoinnista. Jos havaitaan konsentraation pienenevän enemmän kuin analyysimenetelmän keskivirhe, kyseessä saattaa olla abioottinen hajoaminen ja/tai adsorptio koeastian pintaan. Nämä ilmiöt voidaan erottaa toisistaan siten, että astian seinämät huuhdellaan huolellisesti tunnetulla määrällä sopivaa liuotinta ja analysoidaan pesuliuos testiaineen osalta. Jos adsorptiota koeastioiden pintaan ei havaita, vähennys osoittaa testiaineen abioottista epästabiiliutta. Jos adsorboitumista havaitaan, koeastiamateriaali on vaihdettava. Tästä kokeesta saatuja tietoja koeastioiden pintaan tapahtuvasta adsorboitumisesta ei voida kuitenkaan ekstrapoloida suoraan maa-aines/liuos-kokeeseen. Maa-aineksen läsnäolo vaikuttaa tähän adsorboitumiseen.

Lisätietoja testiaineen stabiiliudesta voidaan johtaa määrittämällä kokonaismassatase kokeen aikana. Tämä tarkoittaa sitä, että testiaine määritetään vesifaasista, maa-ainesuutteista ja koeastian seinämistä. Lisätyn testikemikaalin massan ja vesifaasissa olevien testikemikaalimassojen ja maa-aineksesta sekä koeastiaseinämistä saatujen uutteiden summan välinen ero on yhtä kuin hajonnut ja/tai haihtunut ja/tai uuttumaton massa. Massataseen määrittämiseksi adsorptiotasapainotila on saavutettava koejakson aikana.

Massatase määritetään sekä maa-aineksesta että yhdestä sellaisesta maa-aines/liuos-suhteesta maa-ainesta kohden, josta vähenee yli 20 prosenttia ja mieluiten > 50 prosenttia tasapainotilassa. Kun suhteenmäärityskokeen lopussa on viimeinen näyte vesifaasista määritetty 48 tunnin jälkeen, faasit erotetaan sentrifugoimalla, ja mahdollisesti suodattamalla. Vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti, ja sopivaa uuttoliuotinta (uuttokerroin vähintään 95 %) lisätään maa-ainekseen testiaineen uuttamiseksi. Suositellaan vähintään kahta peräkkäistä uuttoa. Testiaine määritetään maa-aines- ja koeastiauutteista ja lasketaan massatase (yhtälö 10, ”Tiedot ja raportointi”). Jos se on alle 90 prosenttia, katsotaan, että testiaine on epästabiili testin aikana. Tutkimukset voivat kuitenkin yhä jatkua, kunhan testiaineen epästabiilius otetaan huomioon; tässä tapauksessa varsinaiseen tutkimukseen suositellaan molempien faasien analysointia.

▼B

1.9.2.4 *Taso 2 — Adsorptiokinetiikka yhdellä testiainekonsentraatiolla*

Käytetään viittä maa-ainesta, jotka valitaan taulukosta 1. Näihin viiteen maa-ainekseen olisi hyvä sisällyttää kaikki alustavassa tutkimuksessa käytetyt maa-ainekset tai joitakin niistä. Tällöin tasoa 2 ei tarvitse toistaa alustavassa tutkimuksessa käytetyille maa-aineksille.

Tasapainotilan saavuttamisaika, maa-aines/liuos-suhde, maa-ainesnäytteen paino, maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin tilavuus ja testiaineen konsentraatio liuoksessa valitaan alustavan tutkimuksen tulosten perusteella. Analyysi on suoritettava mieluiten noin 2, 4, 6, 8 (mahdollisesti myös 10) ja 24 tunnin kontaktiajan jälkeen; ravisteluaika voidaan ulottaa enintään 48 tuntiin silloin, kun kemikaali tarvitsee pidemmän ajan tasapainotilan saavuttamiseen suhteenmääritystulosten perusteella. Analyysiaikoihin voidaan kuitenkin suhtautua joustavasti.

Jokainen koe (yksi maa-aines ja yksi liuos) suoritetaan vähintään rinnakkaisnäytteillä tulosten varianssin arvioimiseksi. Jokaisessa kokeessa suoritetaan yksi nollakoe. Siinä käytetään maa-ainesta ja 0,01 M $CaCl_2$-liuosta ilman testiainetta, ja painon ja tilavuuden on oltava samat kuin varsinaisessa kokeessa. Vertailunäytteelle, jossa on ainoastaan testiainetta 0,01 M $CaCl_2$-liuoksessa (ilman maa-ainesta), suoritetaan sama testimenettely, jotta voitaisiin varautua yllättäviin tilanteisiin.

Adsorboitumisprosentti lasketaan kullakin ajanhetkellä,A_{t_i} ja/tai aikavälilläΔ$A_{\Delta t_i}$ (tarpeen mukaan) ja esitetään ajan funktiona. Lasketaan myös jakautumiskerroin K_d tasapainotilassa samoin kuin orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin K_{oc}. (ei-polaarisille orgaanisille kemikaaleille).

Adsorptiokinetiikkatestin tulokset

Lineaarinen K_d-arvo on yleensä tarkka kuvaamaan sorptiokäyttäytymistä maa-aineksessa (35) (78) ja se kuvaa kemikaalien luontaista kulkeutumista maaperässä. Esimerkiksi kemikaaleja, joiden $K_d \leq 1$ $cm^3\ g^{-1}$, pidetään yleensä helposti kulkeutuvina. MacCall et al. (16) ovat kehittäneet K_{oc}-arvoihin perustuvan kulkeutuvuusluokituskaavion. Lisäksi käytetään K_{oc}:n ja DT-50[6]:n väliseen suhteeseen ([1]) (32) (79) perustuvia uuttumisluokituskaavioita.

Virheanalyysitutkimusten mukaan (61) alle 0,3 $cm^3\ g^{-1}$ olevia K_d-arvoja ei myöskään voida arvioida tarkasti vesifaasikonsentraation pienenemisen pohjalta, ei edes silloin, kun käytetään soveltuvinta (tarkkuuden kannalta soveltuvinta) maa-aines/liuos-suhdetta, eli 1:1. Tällaisessa tapauksessa suositellaan molempien faasien, sekä maa-aineksen että liuoksen, analysointia.

([1]) DT-50: aika, jolloin 50 % testiaineesta on hajonnut.

▼B

Edellä esitettyjen huomautusten pohjalta suositellaan, että kemikaalin adsorptiokäyttäytymistä ja mahdollista kulkeutumista maaperässä koskevaa tutkimusta jatketaan määrittämällä Freundlichin adsorptioisotermit näille systeemeille. K_d:n tarkka määrittäminen kyseisille systeemeille on mahdollista tässä testimenetelmässä esitettävän koejärjestelyn avulla. Täsmällinen määritys on mahdollinen, jos K_d kerrottuna maa-aines/liuos-suhteella antaa tulokseksi arvon > 0.3 silloin, kun mittaukset perustuvat vesifaasikonsentraation pienenemiseen (epäsuora menetelmä), tai arvon > 0,1 silloin, kun molemmat faasit analysoidaan (suora menetelmä) (61).

1.9.2.5 *Taso 3 — Adsorptioisotermit ja desorptiokinetiikka/desorptioisotermit*

1.9.2.5.1 Adsorptioisotermit

Käytetään viittä testiainekonsentraatiota, jotka kattavat mieluiten kaksi suuruusluokkaa; näitä konsentraatioita valittaessa on otettava huomioon vesiliukoisuus ja syntyvät tasapainokonsentraatiot vesiliuoksissa. Kullakin maa-aineksella on säilytettävä sama maa-aines/liuos-suhde läpi tutkimuksen. Adsorptiotesti suoritetaan edellä kuvatulla tavalla lukuun ottamatta sitä, että vesifaasi analysoidaan vain kerran ja sillä ajanhetkellä, joka tarvitaan tasapainotilan saavuttamiseen (ja joka määritettiin edellä 2-tason kokeessa). Liuoksen tasapainokonsentraatiot määritetään ja adsorboitunut määrä lasketaan testiaineen vähentymisestä liuoksesta tai suoraa menetelmää käyttäen. Adsorboitunut massa maa-aineksen massayksikköä kohden esitetään testiaineen tasapainokonsentraation funktiona (katso ”Tulokset ja niiden raportointi”).

Adsorptioisotermikokeen tulokset

Tähän mennessä esitetyistä matemaattisista adsorptiomalleista Freundlichin isotermi on se, jota useimmin käytetään adsorptioprosessien kuvaamiseen. Yksityiskohtaisempia tietoja adsorptiomallien tulkinnasta ja merkityksestä esitetään lähteissä (41) (45) (80) (81) (82).

Huomautus: Eri aineiden K_F-arvojen (Freundlichin adsorptiokertoimien) vertailu on mahdollista ainoastaan silloin, kun nämä K_F-arvot ilmaistaan samoina yksikköinä (83).

1.9.2.5.2 Desorptiokinetiikka

Tämän kokeen tarkoituksena on tutkia, adsorboituuko kemikaali maa-ainekseen reversiibelisti vai irreversiibelisti. Tämä tieto on tärkeä, koska desorptioprosessilla on tärkeä merkitys myös kemikaalin käyttäytymisessä maaperässä kenttäolosuhteissa. Desorptiotiedot ovat lisäksi käyttökelpoisia syöttötietoja uuttumista kuvaavassa tietokonemallintamisessa ja liuenneita aineita sisältävien valumien simuloinnissa. Jos halutaan tehdä desorptiotutkimus, suositellaan, että jäljempänä kuvattava tutkimus suoritetaan jokaiselle systeemille, jolle edellisessä adsorptiokinetiikkakokeessa on ollut mahdollista määrittää tarkka K_d-arvo.

Kuten adsorptiokinetiikkatutkimuksessakin, desorptiokinetiikkakokeessa on käytettävissä kaksi vaihtoehtoa: a) rinnakkaismenetelmä ja b) sarjamenetelmä. Käytettävän menetelmän valitsee kokeen suorittaja, jonka on otettava huomioon käytettävissä olevat mahdollisuudet ja resurssit laboratoriossa.

▼B

a) Rinnakkaismenetelmä: jokaiselle maa-ainekselle, joka valitaan desorptiotutkimukseen, valmistetaan näytteet samalla maa-aines/liuos-suhteella ja niin monta näytettä kuin desorptiokinetiikan tutkimiseksi halutaan näytteenottohetkiä. Mieluiten käytetään samoja aikavälejä kuin adsorptiokinetiikkakokeessa; kokonaisaikaa voidaan kuitenkin tarvittaessa pidentää systeemin desorptiotasapainotilan saavuttamiseksi. Jokaisessa kokeessa (yksi maa-aines, yksi liuos) suoritetaan yksi nollakoe. Siinä on maa-ainesta ja 0,01 M $CaCl_2$-liuosta ilman testiainetta, ja painon ja tilavuuden on oltava samat kuin varsinaisessa kokeessa. Vertailunäytteenä suoritetaan testiaineelle 0,01 M $CaCl_2$-liuoksessa (ilman maa-ainesta) sama testimenettely. Kaikkia maa-aines-liuosseoksia ravistellaan, kunnes adsorptiotasapainotila on saavutettu (mikä määritettiin 2-tason kokeessa). Tämän jälkeen faasit erotetaan sentrifugoimalla ja vesifaasit poistetaan mahdollisimman tarkasti. Poistettu liuostilavuus korvataan samalla tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$-liuosta, joka ei sisällä testiainetta, ja uusia seoksia ravistellaan uudelleen. Ensimmäisen koeputken vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti ja mitataan esimerkiksi 2 tunnin jälkeen, toisen koeputken vesifaasi 4 tunnin, kolmannen koeputken 6 tunnin jälkeen ja niin edelleen, kunnes desorptiotasapainotila on saavutettu.

b) Sarjamenetelmä: adsorptiokinetiikkakokeen jälkeen seos sentrifugoidaan ja vesifaasi poistetaan mahdollisimman tarkasti. Poistettu liuostilavuus korvataan yhtä suurella tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$-liuosta, joka ei sisällä testiainetta. Uutta seosta ravistellaan, kunnes desorptiotasapainotila on saavutettu. Tämän ajanjakson aikana seosta sentrifugoidaan tietyin aikavälein faasien erottamiseksi. Testiaine määritetään pienestä määräosasta vesifaasia välittömästi; tämän jälkeen koe jatkuu alkuperäisellä seoksella. Kunkin yksittäisen määräosan tilavuuden on oltava alle yhden prosentin kokonaistilavuudesta. Seokseen lisätään sama määrä tuoretta 0,01 M $CaCl_2$-liuosta maa-aines/liuos-suhteen säilyttämiseksi, ja ravistelu jatkuu seuraavan aikavälin ajan.

Desorboitumisprosentti lasketaan kullakin ajanhetkellä(D_{t_i}) ja/tai aikavälillä($D_{\Delta t_i}$) (tutkimuksen tarpeiden mukaisesti) ja se esitetään ajan funktiona. Lasketaan myös tasapainotilan desorptiokerroin K_{des}. Kaikki käytettävät yhtälöt esitetään kohdassa ”Tulokset ja niiden raportointi” sekä lisäyksessä 5.

Desorptiokinetiikkakokeen tulokset

Yleisten ajan funktiona esitettävien desorboitumisprosentti-D_{t_i} ja adsorboitumisprosentti-A_{t_i} diagrammien avulla on mahdollista arvioida adsorptioprosessin reversiibeliyttä. Vaikka desorptiotasapainotilan saavuttamiseen menisikin jopa kaksinkertainen aika adsorptiotasapainotilan saavuttamiseen verrattuna ja kokonaisdesorptio olisi yli 75 prosenttia adsorboituneesta maarasta, adsorptiota pidetään reversiibelinä.

1.9.2.5.3 Desorptioisotermit

Freundlichin desorptioisotermit määritetään maa-aineksista, joita on käytetty adsorptioisotermikokeessa. Desorptiotesti suoritetaan kohdassa ”Desorptiokinetiikka” kuvatulla tavalla lukuun ottamatta sitä, että vesifaasi analysoidaan vain kerran, desorptiotasapainotilassa. Lasketaan desorboituneen testiaineen määrä. Maa-ainekseen desorptiotasapainotilassa adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus esitetään liuoksessa olevan testiaineen tasapainokonsentraation funktiona (katso ”Tulokset ja niiden raportointi” sekä lisäys 5).

▼B

2. **TULOKSET JA NIIDEN RAPORTOINTI**

Analyysitiedot esitetään taulukkomuodossa (katso lisäys 6). Niissä esitetään yksittäiset mittaukset ja lasketut keskiarvot sekä adsorptioisotermien graafiset kuvaajat. Laskutoimitukset tehdään jäljempänä kuvatulla tavalla.

Testin tarkoituksia varten sovitaan, että 1 cm^3 vesiliuosta painaa 1 g. Näin maa-aines/liuos-suhde voidaan ilmaista yksikköinä w/w tai w/vol samalla numerolla.

2.1 ADSORPTIO

Adsorptio (A_{t_i}) määritellään maa-ainekseen adsorboituneen aineen prosenttiosuutena testin alussa lisätystä aineen määrästä. Jos testiaine on stabiili eikä adsorboidu merkittävästi astiaseinämiin,A_{t_i} lasketaan kullakin ajanhetkellä t_i seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

jossa:

A_{ti} = adsorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i (%)

$m_s^{ads}(t_i)$ = maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa (µg) ajanhetkellä t_i

m_o = testiaineen massa koeputkessa testin alussa (µg).

Yksityiskohtaiset tiedot siitä, kuinka adsorboitumisprosenttiA$_{t_i}$ lasketaan rinnakkais- ja sarjamenetelmälle, annetaan liitteessä 5.

Jakautumiskerroin K_d on maa-ainesfaasissa olevan aineen pitoisuuden ja vesiliuoksessa olevan aineen massakonsentraation välinen suhde koeolosuhteissa adsorptiotasapainotilassa.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

jossa:

$C_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen aineen pitoisuus adsorptiotasapainotilassa (µg g^{-1})

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = vesifaasissa olevan aineen massakonsentraatio adsorptiotasapainotilassa (µg cm^{-3}). Tämä konsentraatio määritetään analyyttisesti nollakokeiden antamat arvot huomioon ottaen

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (µg)

m_{soil} = maa-ainesfaasin määrä, maa-aineksen kuiva-aineena ilmaistuna (g)

V_o = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin alkutilavuus (cm^3).

A_{eq}:n ja K_d :n välinen suhde saadaan yhtälöstä

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

jossa:

A_{eq} = adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa, %.

Orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin K_{oc} liittää jakautumiskertoimen K_d maa-ainesnäytteen orgaanisen hiilen pitoisuuteen:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC}(cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

jossa:

% oc = maa-ainesnäytteessä olevan orgaanisen hiilen prosenttiosuus ($g\ g^{-1}$).

K_{oc}-kerroin edustaa yksittäistä arvoa, joka kuvaa pääasiassa ei-polaaristen orgaanisten kemikaalien jakautumista maa-aineksessa tai sedimentissä olevaan orgaaniseen hiileen ja veteen. Näiden kemikaalien adsorboituminen korreloi sorboivan kiintoaineen orgaanisten ainesten pitoisuuden kanssa (7); näin ollen K_{oc}-arvot riippuvat humusjakeiden erityisominaisuuksista, joiden sorptiokyvyt vaihtelevat huomattavasti — tämä johtuu eroista alkuperässä, syntytavassa ja niin edelleen.

2.1.1 **Adsorptioisotermit**

Freundlichin adsorptioisotermien yhtälö liittää adsorboituneen testiaineen määrän tasapainotilassa liuoksessa olevan testiaineen konsentraatioon (yhtälö 8).

Mittaustuloksia käsitellään kuten kohdassa ”Adsorptio”. Kullekin koeputkelle lasketaan adsorptiotestin jälkeen maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen pitoisuus ($C_s^{ads}(eq)$, ilmaistu muualla muodossa x/m). Oletetaan, että tasapainotila on saavutettu ja että$C_s^{ads}(eq)$kuvaa tasapainoarvoa:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{soil}}(\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Yhtälö (8) on Freundlichin adsorptioyhtälö:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n}(\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

tai lineaarisessa muodossa:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

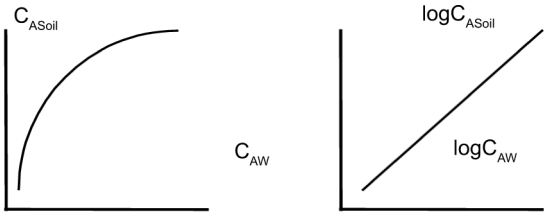
jossa:

K_F^{ads} = Freundlichin adsorptiokerroin; sen yksikkö on $cm^3\ g^{-1}$ ainoastaan silloin, kun l/n = 1; kaikissa muissa tapauksissa kulmakerroin 1/n esiintyyK_F^{ads}:n laatua osoittavassa yksikössä ^{ads} $(\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$

n = regressiovakio: l/n vaihtelee yleensä välillä 0,7 - 1,0, mikä osoittaa, että sorptiotiedot ovat usein hieman epälineaarisia.

Piirretään yhtälöt (8) ja (9) ja lasketaanK_F^{ads} ja l/n -arvot regressioanalyysillä yhtälöä 9 käyttäen. Lasketaan myös logaritmiyhtälön korrelaatiokerroin r^2. Esimerkit tällaisista käyristä esitetään kuvassa 2.

▼B



Kuva 2. Freundlichin adsorptiokäyrä, normaali ja linearisoitu

2.1.2 **Massatase**

Massatase (MB) on se aineen prosenttiosuus testin alussa lisätystä aineen nimellismäärästä, joka voidaan ottaa analyyttisesti talteen adsorptiotestin jälkeen.

Tulokset käsitellään eri tavalla, kun liuotin sekoittuu täysin veteen. Veteen sekoittuvan liuottimen tapauksessa tulokset voidaan käsitellä kuten kohdassa ”Desorptio” liuotinuuton avulla talteen saadun aineen määrän määrittämiseksi. Jos liuotin sekoittuu veteen niukasti, on talteenotettu määrä mitattava.

Massatase MB adsorptiolle lasketaan seuraavasti: oletetaan, että tekijä (m_E) vastaa maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä orgaanisella liuottimella uutettujen testikemikaalimassojen summaa:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

jossa:

MB = massatase (%)

m_E = kahdessa vaiheessa maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä uutetun testiaineen kokonaismassa (μg)

C_o = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa (μg cm^{-3})

V_{rec} = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen talteen otetun supernatantin tilavuus (cm^{-3})

2.2 DESORPTIO

Desorptio (D) määritellään desorboituneen testiaineen prosenttiosuutena aiemmin adsorboituneen aineen määrästä koeolosuhteissa:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

jossa:

D_{ti} = desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_1 (%)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa t_i (µg) ajanhetkellä t_i

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa adsorptiotasapainotilassa (µg).

Yksityiskohtaiset tiedot siitä, kuinka lasketaan desorboitumisprosenttiD$_{t^i}$ rinnakkais- ja sarjamenetelmälle, annetaan lisäyksessä 5.

Näennäinen desorptiokerroin (K_{des}) on koeolosuhteissa maa-ainesfaasiin jääneen aineen pitoisuuden suhde desorboituneen aineen massakonsentraatioon vesiliuoksessa silloin, kun desorptiotasapainotila on saavutettu:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

jossa:

K_{des} = desorptiokerroin ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = maa-aineksesta desorboituneen testiaineen kokonaismassa desorptiotasapainotilassa (µg)

V_T = maa-aineksen kanssa desorptiokinetiikkatestin aikana kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (cm^3).

Ohjeet$m_{aq}^{des}(eq)$:n laskemiseksi annetaan lisäyksessä 5 kohdassa ”Desorptio”.

Huomautus:

Jos edeltävä adsorptiotesti suoritettiin rinnakkaismenetelmää käyttäen, niin yhtälössä (12) esiintyvä tilavuus V_T oletetaan yhtä suureksi kuin V_o.

2.2.1 **Desorptioisotermit**

Freundlichin desorptioisotermien yhtälö yhdistää maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuuden liuoksessa olevan testiaineen konsentraatioon desorptiotasapainotilassa (yhtälö 16).

Kullekin koeputkelle lasketaan maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen aineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa seuraavasti:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ määritellään seuraavasti:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

jossa:

$C_s^{des}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa (µg g^{-1})

$m_m^{des}(eq)$ = vesifaasista desorptiotasapainotilassa analyyttisesti määritetyn aineen massa (µg)

▼B

m_{aq}^{A} = epätäydellisestä tilavuustäydennyksestä johtuen adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = koeputkesta testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus, desorptiotasapainotilassa (cm^3)

V_R = koeputkesta adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (cm^3).

Yhtälö (16) on Freundlichin desorptioyhtälö:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

tai lineaarisessa muodossa:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

jossa:

K_F^{des} = Freundlichin desorptiokerroin

n = regressiovakio

$C_{aq}^{des}(eq)$ = vesifaasissa olevan aineen massakonsentraatio desorptiotasapainotilassa (μg cm^{-3}).

Yhtälöt (16) ja (17) voidaan piirtää ja $K_F{}^{des}$ ja l/n -arvot lasketaan regressioanalyysin avulla yhtälöä 17 käyttäen.

Huomautus:

Jos Freundlichin adsorptio- tai desorptioeksponentti l/n on yhtä kuin 1, Freundlichin adsorption tai desorption sitoutumisvakio (K_F^{ads} jaK_F^{des}) on yhtä suuri kuin adsorptio- tai desorptiotasapainovakiot (vastaavasti K_d ja K_{des}), jolloin C_S vs C_{aq} -käyrät ovat lineaariset. Jos eksponentit ovat erisuuria kuin 1, C_s vs C_{aq} -käyrät eivät ole lineaarisia ja adsorptio- ja desorptiovakiot vaihtelevat isotermien eri kohdissa.

2.2.2 **Testiraportti**

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

— Käytettyjen maa-ainesnäytteiden täydelliset tunnistetiedot, johon sisältyy:

— maantieteellinen sijainti (leveysasteet, pituusasteet),

— näytteenottopäivämäärä,

▼B

— käyttömuoto (esimerkiksi maatalousmaa, metsä),

— näytteenottosyvyys,

— hiekka-, liete- ja savipitoisuus,

— pH-arvot (0,01 M $CaCl_2$:ssa),

— orgaanisen hiilen pitoisuus,

— orgaanisen aineksen pitoisuus,

— typpipitoisuus,

— C/N-suhde,

— kationinvaihtokyky (mmol/kg),

— kaikki maa-ainesnäytteiden keräämiseen ja säilyttämiseen liittyvät tiedot,

— soveltuvin osin kaikki testiaineen adsorptio-desorptiotulkinnan kannalta merkitykselliset tiedot,

— kunkin muuttujan määrittämiseksi käytettyjen menetelmien kirjallisuusviitteet,

— testiainetta koskevat tiedot soveltuvin osin,

— koelämpötilat,

— sentrifugointiolosuhteet,

— analyysimenetelmä testiaineen analysoimiseksi,

— perustelut kaikelle liuottavien aineiden käytölle testiaineen varastoliuosten valmistuksessa,

— selvitykset laskelmissa tehdyistä korjauksista,

— tiedot taulukkomuodossa (liite 6) ja graafiset esitykset,

— kaikki tiedot ja havainnot, jotka helpottavat testitulosten tulkintaa.

3. **LÄHDELUETTELO**

(1) Kukowski H. and Brümmer G, (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Scries 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), 'Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils', in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), 'Adsorption-Desorption Phenomena' in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), 'The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), 'An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media'. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), 'Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis', in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), 'Movement and sorption of chemicals applied to the soil'. Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R. C., Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) 'Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils'. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M. H., (1995), 'Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil' in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), 'Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides', IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), 'Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils'. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L, and Osgerby J. M., (1967), 'Persistence of herbicides in soil'. J. Sci. Fd Agric., 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), 'Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption'. Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977). 'Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides'. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J. M., (1973), 'Process affecting herbicide action in soil'. Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), 'Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden'. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J. W., (1975), 'The interpretation of soil leaching experiments', in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172. Plenum Press. NY.

(28) Helling C. S., (1971). 'Pesticide mobility in soils'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J. W., (1972), 'Diffusion and volatilization' in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds). Vol. 1, pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), 'Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system'. Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), 'Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 2 59, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), 'Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability'. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). 'Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils'. J. of Soil Sci., 28, pp. 340-350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), 'Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils'. Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), 'Sorption estimates for modeling', in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101,

(36) Lambert S. M., (1967), 'Functional relationship between sorption in soil and chemical structure'. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), ‘An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils’. J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G. G., (1969), ‘Molecular structure of herbicides and their sorption by soils’. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G., (1981). ‘Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor’. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), ‘Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology’. J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), ‘Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil’. Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg, (1968). ‘Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate’. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), ‘Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils’. Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), ‘Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners’. Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), ‘Adsorption in organic chemicals’ in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, ‘Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils’. Weed Sci. 19: pp. 6 7-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975). ‘Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils’. Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), ‘Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations’ in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980). ‘Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase’, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. ‘Methods of Soil Analysis’, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/D1S 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) 1SO/D1S 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), 'Precision in pesticide adsorption measurements'. Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J., (1970), 'Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine'. Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system'. Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106'. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), 'Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique'. Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), 'Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments'. J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), 'Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water'. Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), 'Sorption of organic substances by soils and sediments'. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. E. C., (1987), 'Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons'. Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F., and Rosenblatt D. H., (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I., (1980). 'Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota' in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), ‘A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds’. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), ‘Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption’. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), ‘Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils’. Chemosphere Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), ‘Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilite-reactivite’. Revue de l'Agric, 34 (4), pp. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W., (1996). ‘Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil’. Chemosphere, 32(12), pp. 249 3-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M., (1995), ‘HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test’. Chemosphere 30 (7), pp. 1 3 73-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G., (1993), ‘HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases’. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R. J., (1967), ‘The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides’. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990), ‘The retention processes: mechanisms’ in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), ‘Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses’, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), ‘Interpretation and use of sorption isotherms’ in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D., (1960), ‘Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils’. J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), ‘Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption’. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), ‘Anomalies in the Freundlich equation’, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

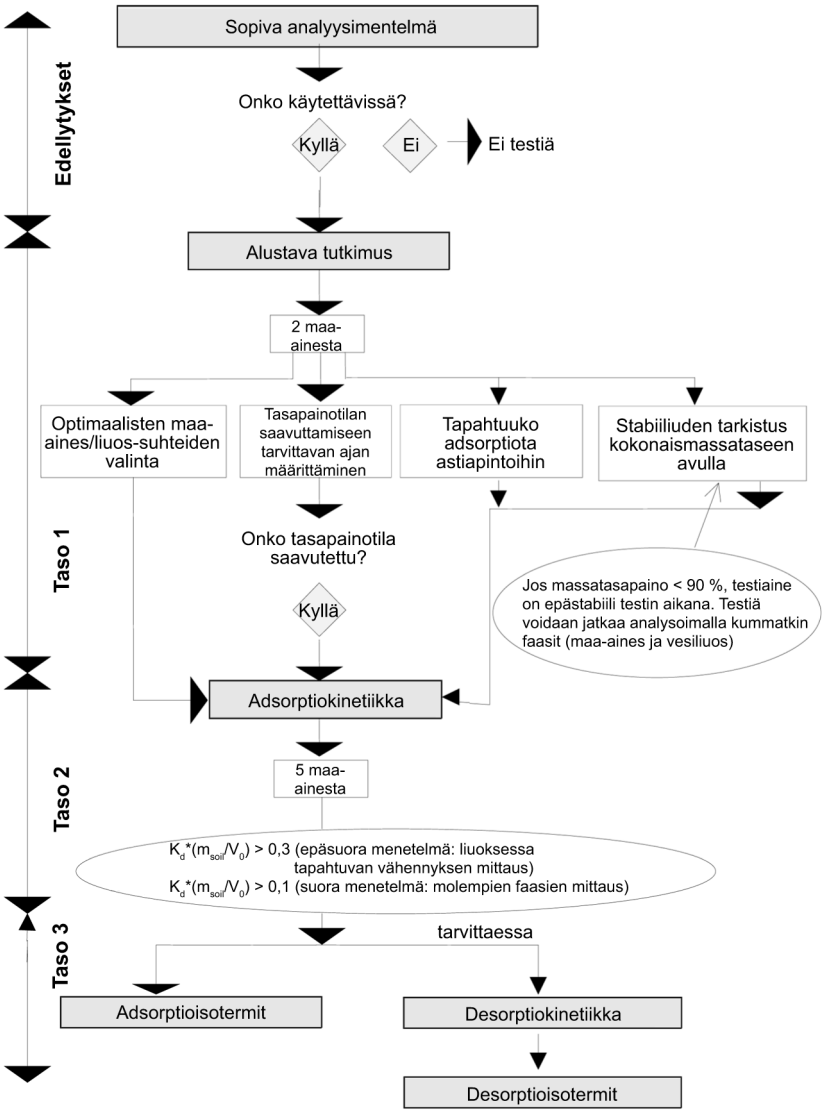
(84) Guth, J. A., (1985), ‘Adsorption/desorption’, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

LISÄYS 1

Testikaavio



▼B

Lisäys 2

ANALYYSIMENETELMÄN TARKKUUDEN JA KONSENTRAATIO-MUUTOKSEN VAIKUTUS ADSORPTIOTULOSTEN TARKKUUTEEN

Seuraavasta taulukosta (84) käy ilmi, että silloin kun alkuperäisen massan ($m_{aq}^{ads}(eq)$ = 110 µg) ja liuoksessa olevan testiaineen tasapainomassan ($m_{s}^{ads}(eq)$ = 100 µg) välinen ero on hyvin pieni, 5 prosentin virhe tasapainokonsentraation mittaustuloksissa johtaa 50 prosentin virheeseen maa-ainekseen adsorboituneen aineen pitoisuuslaskelmissa ($m_{s}^{ads}(eq)$) ja 52,4 prosentin virheeseen K_d-laskelmissa.

Maa-aineksen määrä m_{soil} = 10 g

Liuoksen tilavuus V_o =100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_{s}^{ads}(eq)$* (µg)	$C_{s}^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
m_0 = 110 µg tai C_0 = 1,100 µg/cm^3	**KUN A = 9 %**							
	100	1,000	todell. arvo	10	1,00	todell. arvo	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
m_0 = 110 µg tai C_0 = 1,100 µg/cm^3	**KUN A = 55 %**							
	50,0	0,500	todell. arvo	60,0	6,00	todell. arvo	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
m_0 = 110 µg tai C_0 = 1,100 µg/cm^3	**KUN A = 99 %**							
	1,100	0,011	todell. arvo	108,9	10,89	todell. arvo	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}. \; Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainesfaasissa olevan testiaineen massa tasapainotilassa, µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = vesifaasissa olevan testiaineen massa tasapainotilassa, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = testiaineen pitoisuus maa-ainesfaasissa tasapainotilassa, µg g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa tasapainotilassa, µg cm^{-3}

R = analyyttinen virhe$m_{aq}^{ads}(eq)$:n määrityksessä

R‡ = analyyttisestä virheestä R johtuva laskettu virhe.

▼B

LISÄYS 3

K_d:N ARVIOINTITEKNIIKAT

1. Arviointitekniikoiden avulla on mahdollista ennustaa K_d-arvoja, jotka perustuvat korrelaatioon esimerkiksi P_{ow}-arvojen kanssa (12) (39) (63-68), vesiliukoisuustietojen kanssa (12) (19) (21) (39) (68-73) tai käänteisfaasi-HPLC:sta johdettujen polaarisuustietojen kanssa (74-76). Taulukoissa 1 ja 2 esitetyt K_{oc} tai K_{om} -arvot on laskettu näistä yhtälöistä ja K_d sitten epäsuorasti yhtälöistä:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1})$$

2. Tämä korrelaatiokäsite perustuu kahteen oletukseen: 1) aineen adsorboitumiseen vaikuttaa pääasiassa juuri maa-aineksen orgaaninen aines; ja 2) kyseeseen tulevat vuorovaikutukset ovat pääasiassa polaarittomia. Täten näitä korrelaatioita ei voida soveltaa polaarisiin aineisiin tai soveltaminen voidaan ulottaa vain tiettyyn rajaan asti, ja niitä ei voida soveltaa silloin, kun orgaanisen aineksen pitoisuus maa-aineksessa on hyvin pieni (12). Vaikka tyydyttäviä P_{ow}:n ja adsorption (19) välisiä korrelaatioita onkin löydetty, samaa ei voida sanoa vesiliukoisuuden ja adsorboitumisasteen (19) (21) välisistä yhteyksistä; tutkimustulokset ovat toistaiseksi hyvin ristiriitaisia.

3. Joitakin esimerkkejä adsorptiokertoimen ja oktanoli-vesi-jakautumiskertoimen välisistä korrelaatioista samoin kuin suhteesta vesiliukoisuuteen esitetään taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1.

Esimerkkejä adsorptiojakautumiskertoimen ja oktanoli-vesi-jakautumiskertoimen välisistä korrelaatioista; lisäesimerkkejä lähteistä (12) (68).

Aineet	Korrelaatiot	Tekijät
Substituoidut ureat	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Klooratut aromaatit	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$.	Chiou *et al*. (1983) (65)
Erilaiset torjunta-aineet	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{oW}$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Aromaattiset hiilivedyt	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles ja Mantoura (1987) (67)

Taulukko 2.

Esimerkkejä adsorptiojakautumiskertoimen ja vesiliukoisuuden välisistä korrelaatioista; katso lisäesimerkkejä lähteistä (68) (69).

Aineet	Korrelaatiot	Tekijät
Erilaiset torjunta-aineet	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Alifaattiset, aromaattiset klooratut aineet	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
α-naftoli	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Sykliset, alifaattiset aromaattiset aineet	$\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Erilaiset yhdisteet	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Lisäys 4

SENTRIFUGOINTIOLOSUHTEIDEN LASKEMINEN

1. Sentrifugointiaika saadaan seuraavasta kaavasta olettaen, että partikkelit ovat pallomaisia:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \quad (1)$$

Yksinkertaisuuden vuoksi kaikki muuttujat esitetään muina kuin SI-yksikköinä (g, cm),

jossa:

ω pyörimisnopeus (=2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm kierrosta minuutissa

η liuoksen viskositeetti, g s^{-1} cm^{-1}

r_p partikkelin säde, cm

ρ_s maa-aineksen tiheys, g cm^{-3}

ρ_{aq} liuoksen tiheys, g cm^{-3}

R_t etäisyys sentrifugipyörijän keskikohdasta sentrifugiputkessa olevan liuoksen yläpintaan, cm

R_b etäisyys sentrifugipyörijän keskikohdasta sentrifugiputken pohjaan, cm

R_b-R_t maa-aines/liuos-seoksen pituusmitta sentrifugiputkessa, cm.

Käytännössä lasketut ajat yleensä kaksinkertaistetaan täydellisen erottumisen varmistamiseksi.

2. Yhtälöä (1) voidaan edelleen yksinkertaistaa, jos oletetaan, että liuoksen viskositeetti (η) ja tiheys (ρ_{aq}) on yhtä suuri kuin veden viskositeetti ja tiheys lämpötilassa 25 °C; tällöin η = 8,95 x 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} ja ρ_{aq} = 1,0 g. cm^{-3}.

Tämän jälkeen sentrifugointiaika saadaan yhtälöstä (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \quad (2)$$

3. Yhtälöstä (2) käy ilmi, että sentrifugointiolosuhteiden eli ajan (t) ja nopeuden (rpm) määrittäminen perustuu kahteen tärkeään muuttujaan, jotta määrätynkokoiset partikkelit saadaan erotetuksi (tässä tapauksessa säde on 0,1 μm): 1) maa-aineksen tiheys ja 2) seoksen pituus sentrifugiputkessa (R_b-R_t), eli väli, jolla esiintyy maa-ainespartikkeleita liuoksen yläreunasta koeputken pohjaan; tällöin on selvää, että kun putkessa olevan seoksen tilavuus on sama, seoksen pituus koeputkessa riippuu koeputken säteen neliöstä.

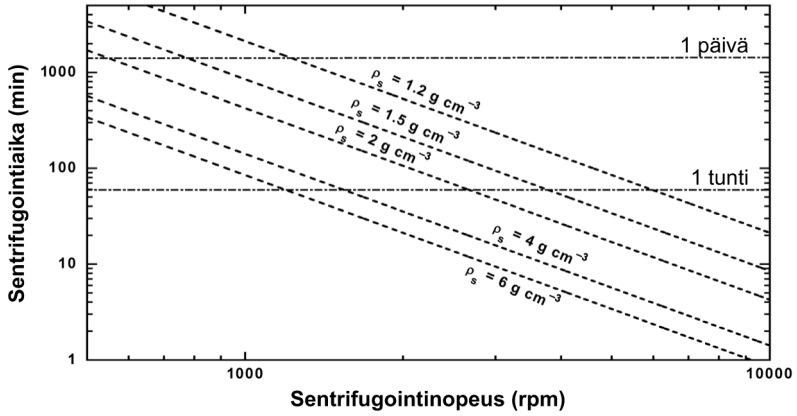
4. Kuvassa 1 esitetään, kuinka sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetty sentrifugointiaika (t) vaihtelee eri maa-ainestiheyksillä (ρ_s) (kuva 1b) ja silloin, kun seoksen pituus sentrifugiputkissa on erilainen (kuva 2a). Kuvassa 1a näkyy selvästi maa-aineksen tiheyden vaikutus; esimerkiksi klassisella 3 000 rpm:n sentrifugoinnilla sentrifugointiaika on noin 240 minuuttia, kun maa-aineksen tiheys on 1,2 g/cm^3, ja vain 50 minuuttia, kun tiheys on 2,0 g/cm^3. Vastaavasti kuvasta 1b näkyy, kuinka klassisella 3 000 rpm:n sentrifugoinnilla sentrifugointiaika on noin 50 minuuttia, kun seoksen pituus on 10 cm, ja vain 7 minuuttia, kun pituus on 1 cm. Sentrifugointituloksen kannalta on edullisinta, jos putkessa olevan seoksen pituus on mahdollisimman pieni, ja käsittely taas on helpointa, jos putkessa olevan seoksen pituus on suuri; tässä on löydettävä paras kompromissi.

▼B

5. Lisäksi silloin, kun määritellään koeolosuhteita maa-aines/liuos-faasien erottelemiseksi, on tärkeää ottaa huomioon mahdollinen kolmannen ”pseudofaasin” eli kolloidien olemassaolo. Näillä partikkeleilla, joiden koko on alle 0,2 μm, voi olla merkittävä vaikutus aineen koko adsorptiomekanismiin maa-ainessuspensiossa. Kun sentrifugointi suoritetaan edellä kuvatulla tavalla, jäävät kolloidit vesifaasiin ja joutuvat analyysiin yhdessä vesifaasin kanssa. Tällöin tiedot niiden vaikutuksista jäävät saamatta.

   Jos suorittavalla laboratoriolla on ultrasentrifugointi- tai ultrasuodatusmahdollisuus, aineen adsorptiota/desorptiota maa-aineksessa voidaan tutkia syvemmin, mukaan lukien tiedot aineen adsorboitumisesta kolloideihin. Tällöin olisi käytettävä ultrasentrifugointinopeutta 60 000 rpm/min tai ultrasuodatusta suodatinhuokoisuudella 100 000 Daltonia, jotta nämä kolme faasia voidaan erottaa: maa-aines, kolloidit, liuos. Testimenetelmää on myös muunneltava tämän mukaisesti, jotta kaikista kolmesta faasista voitaisiin suorittaa aineen analysointi.

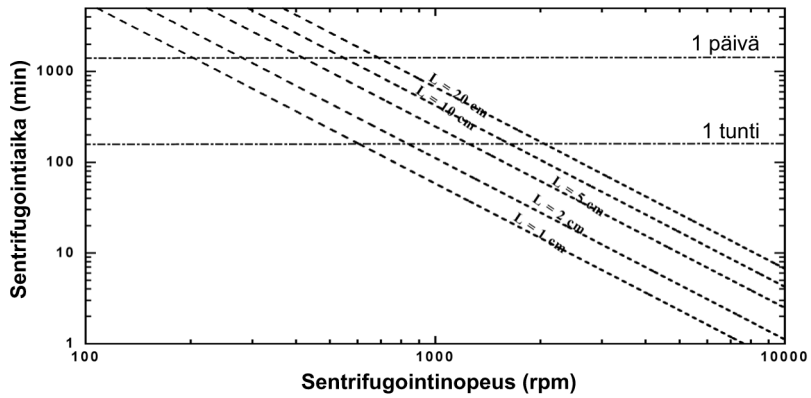
Kuva 1a.



Sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetyn sentrifugointiajan (t) vaihtelu eri maa-ainestiheyksille

(ρ_s) . R_t = 10 cm, R_b -R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} ja p_{aq} = 1,0 g cm^{-3}, kun 25 °C.

Kuva 1b.



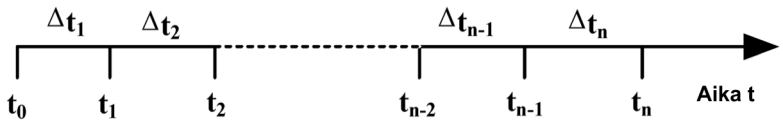
Sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetyn sentrifugointiajan (t) vaihtelu silloin, kun sentrifugiputkessa olevan seoksen pituus on erilainen (Rb - Rt) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, p_{aq} = 1,0 g cm^{-3} kun 25 °C ja (ρ_s) = 2,0 g cm^{-3}

▼B

LISÄYS 5

ADSORPTION A (%) JA DESORPTION D (%) LASKEMINEN

Menettelyn aikakaavio on:



Kaikissa laskelmissa oletetaan, että testiaine on stabiili eikä adsorboidu merkittävästi astiaseinämiin.

ADSORPTIO A (A %)

a) *Rinnakkaismenetelmä*

Adsorboitumisprosentti lasketaan kullekin koeputkelle (i) kullakin ajanhetkellä (t_i) seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Tämän yhtälön tekijät voidaan puolestaan laskea seuraavasti:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

joissa:

A_{ti} = adsorboitumisprosentti (%) ajanhetkellä t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = testiaineen massa maa-aineksessa ajanhetkellä t_i, kun analyysi suoritetaan (µg)

m_o = testiaineen massa koeputkessa testin alussa (µg)

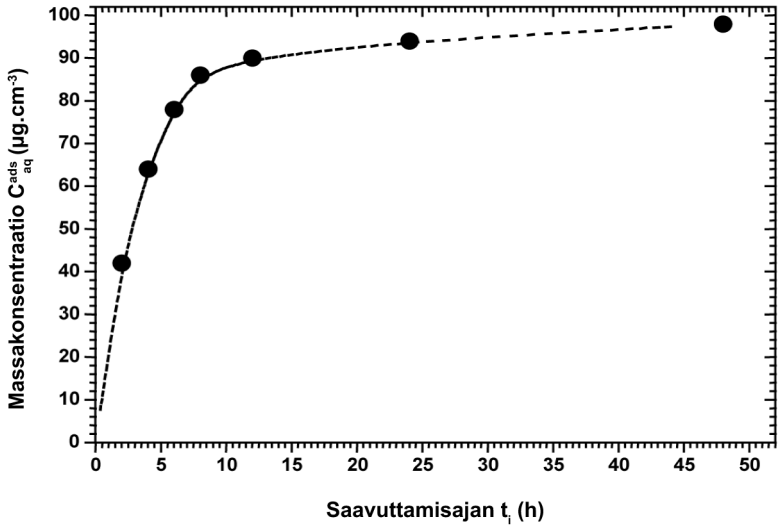
C_o = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa (µg cm^{-3})

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = aineen massakonsentraatio vesifaasissa ajanhetkellä t_i, kun analyysi suoritetaan (µg cm^{-3}); tämä konsentraatio määritetään analyyttisesti ottaen huomioon nollakokeista saadut arvot

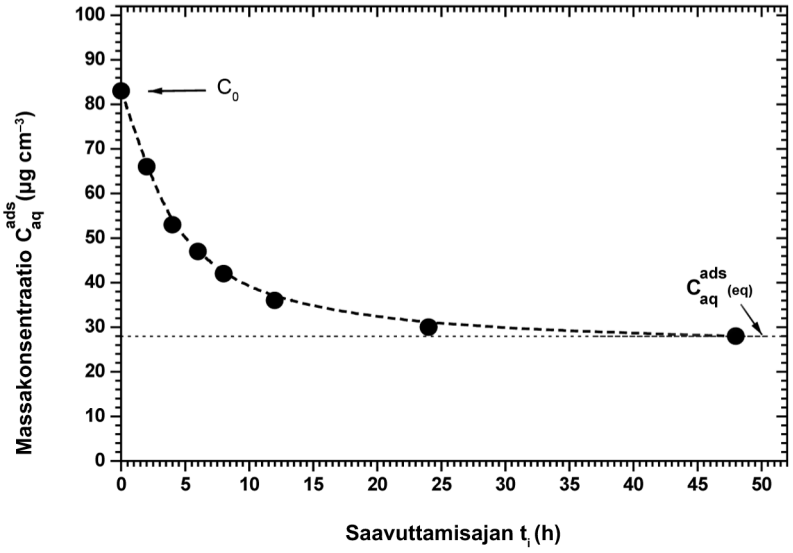
V_o = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen alkutilavuus (cm^3).

Adsorboitumisprosenttien arvot A_{t_i} tai$C_{aq}^{ads}(t_i)$ esitetään ajan funktiona ja määritetään aika, joka kuluu sorptiotasapainotilan saavuttamiseen. Esimerkkejä tällaisista käyristä esitetään kuvassa 1 ja kuvassa 2.



Kuva 1.

adsorptiotasapainokäyrä



Kuva 2.

Testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa (C_{aq}) ajan funktiona

▼B

b) *Sarjamenetelmä*

Seuraavissa yhtälöissä otetaan huomioon, että adsorptiokoe suoritetaan mittaamalla testiaine vesifaasin pienistä määräosista ja määrätyin aikavälein.

— Kullakin aikavälillä maa-ainekseen adsorboituneen aineen määrä lasketaan seuraavasti:

— emsimmâisella aikavâlilla $\Delta t_i = t_i - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— toisellä aikavälillä $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— kolmannella aikavälillä $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— ninnellä aikavälillä $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Adsorboitumisprosentti kullakin aikavälillä, $A_{\Delta t_i}$, lasketaan seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

kun taas adsorboitumisprosentti A_{t_i} ajanhetkellä t_i saadaan yhtälöstä:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Adsorptioarvot A_{t_i} tai $A_{\Delta t_i}$ (tutkimuksen tarpeiden mukaisesti) esitetään ajan funktiona ja määritetään aika, joka kuluu sorptiotasapainotilan saavuttamiseen.

— Ajanhetkellä, jolloin tasapainotila on saavutettu t_{eq}:

— maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa on:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_{i=1}}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— liuoksessa olevan testiaineen massa on:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— ja adsorboitumisprosentti tasapainotilassa on:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Edellä käytetyt muuttujat määritellään seuraavasti:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = maa-ainekseen aikavälillä Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} adsorboituneeksi jääneen aineen massa (μg)

$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$ = määräosasta v_a^A mitatun aineen massa ajanhetkellä t_1, t_2,t_n (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

v_a^A = määräosan tilavuus, josta testiaine mitataan (cm^3)

$A_{\Delta ti}$ = aikaväliä Δt_i vastaava adsorboitumisprosentti (%)

A_{eq} = adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa (%).

DESORPTIO D (%)

Ajanhetki t_0, jolloin desorptiokinetiikkakoe alkaa, on hetki, jolloin talteenotettu testiaineliuos, jonka tilavuus on suurimmillaan kun adsorptiotasapainotila on saavutettu, korvataan yhtä suurella tilavuusmäärällä 0,01 M $CaCl_2$-liuosta.

a) *Rinnakkaismenetelmä*

Ajanhetkellä t_i mitataan testiaineen massa koeputkesta i (V_r^i) otetusta vesifaasista ja desorboitunut massa lasketaan seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Desorptiotasapainotilassa $t_i = t_{eq}$ ja sitenm$_{aq}^{des}(t_i)$ =m$_{aq}^{des}(eq)$

Aikavälillä (Δt_i) desorboituneen testiaineen massa saadaan yhtälöstä:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorboitumisprosentti lasketaan:

ajanhetkellä t_i yhtälöstä:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

ja aikavälillä (Δt_i) yhtälöstä:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

jossa

D_{ti} = desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i (%)

$D_{\Delta ti}$ = aikaväliä Δt_i vastaava desorboitumisprosentti (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = ajanhetkellä t_i desorboituneen testiaineen massa (µg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = aikavälillä Δt_i desorboituneen testiaineen massa (µg)

$m_m^{des}(t_i)$ = analyyttisesti mitatun testiaineen massa ajanhetkellä t_i liuostilavuudessa V_r^i, joka otetaan analyysiä varten (µg)

$m_{aq}{}^{A}$ = epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (µg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = liuoksessa olevan testiaineen massa adsorptiotasapainotilassa (µg)

V_R = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuusmäärällä 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (cm^3)

V_r^i = testiaineen mittaamiseksi koeputkesta (i) otetun liuoksen tilavuus, desorptiokinetiikkakokeessa (cm^3).

Desorptioarvot D_{ti} tai$D_{\Delta t_i}$ (tutkimustarpeiden mukaisesti) esitetään ajan funktiona, ja desorptiotasapainotilan saavuttamiseen kuluva aika määritetään.

b) *Sarjamenetelmä*

Seuraavissa yhtälöissä otetaan huomioon se, että edeltänyt adsorptiokoe on suoritettu määrittämällä testiaine vesifaasin pienistä määräosista(v_a^A) (sarjamenetelmä 1.9 kohdassa ”Testin suorittaminen”). Oletetaan, että: a) adsorptiokinetiikkakokeen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus on korvattu samalla tilavuusmäärällä 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (V_R) ja b) maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (V_T) säilyy desorptiokinetiikkakokeen aikana vakiona ja se saadaan yhtälöstä:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad (18)$$

▼B

Ajanhetkellä t_i:

— Testiaineen massa mitataan pienistä määräosista(v_a^D) ja desorboitunut massa lasketaan seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Desorptiotasapainotilassa $t_i = t_{eq}$ ja sitenm$_{aq}^{des}(t_i)$ =m$_{aq}^{des}$(eq).

— DesorboitumisprosenttiD$_{t_i}$ lasketaan seuraavasta yhtälöstä:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Aikavälillä (Δt_i):

Kullakin aikavälillä desorboituneen aineen määrä lasketaan seuraavasti:

— ensimmäisellä aikavälillä $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— toisellä aikavälillä $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

and (22)

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— ninnellä aikavälillä n^{th} $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

and (23)

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Lopuksi lasketaan desorboitumisprosentti kullakin aikavälillä,$D_{\Delta t_i}$, seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

kun taas desorboitumisprosenttiD$_{t_i}$, ajanhetkellä t_i saadaan yhtälöstä:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

jossa edellä käytetyt muuttujat määritellään seuraavasti:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = maa-ainekseen aikavälillä Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n adsorboituneeksi jääneen aineen massa (μg)

$m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2),... , m_s^{des}(\Delta t_n)$ = aikavälillä Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n desorboituneen testiaineen massa (μg)

$m_m^{des}(t_1), m_m^{des}(t_2),... , m_m^{des}(t_n)$ = määräosasta (v_a^D) mitatun aineen massa ajanhetkellä t_1, t_2, ..., t_n (μg)

V_T = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus sarjamenetelmällä suoritetun desorptiokinetiikkakokeen aikana (cm^3)

m_{aq}^A = epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuusmäärällä 0,01 M $CaCl_2$-liuosta (cm^3)

v_a^D = sarjamenetelmällä suoritetun desorptiokinetiikkakokeen aikana koeputkesta (i) analysoitavaksi otetun määräosan tilavuus (cm^3)

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

LISÄYS 6

ADSORPTIO-DESORPTIO MAA-AINEKSISSA: TULOSTEN RAPORTOINTILOMAKE

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C. 12 h): %

Lämpötila: °C

Analyysimenetelmän soveltuvuus

Punnittu maa-aines	g	
Maa-aines: kuivapaino	g	
$CaCl_2$-liuoksen tilavuus	cm^3	
Loppuliuoksen nimelliskonsentraatio	$\mu g\ cm^{-3}$	
Loppuliuoksen analyyttinen konsentraatio	$\mu g\ cm^{-3}$	

Käytetyn analyysimenetelmän periaate: Analyysimenetelmän kalibrointi:

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h): %

Lämpötila: °C

Käytetty analyysimenetelmä: Epäsuora ☐ Rinnakkais ☐ Sarja ☐

Suora ☐

Adsorptiotesti: testinäytteet

	Symboli	Yksikkö	Tasapainotumisaika		Tasapainotumisaika		Tasapainotumisaika		Tasapainotumisaika	
Koeputki n:o										
Punnittu maa-aines	—	g								
Maa-aines:	m_{soil}	g								
Veden tilavuus punnitussa maa-aineksessa (laskettu)	V_{WS}	cm^3								
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M $CaCl_2$-liuoksen tilavuus		cm^3								
Varastoliuoksen tilavuus		cm^3								
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	V_0	cm^3								
Testiliuoksen alkukonsentraatio	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Testiaineen massa testin alussa	m_0	µg								

▼B

	Symboli	Yksikkö	Tasapainotumisaika		Tasapainotumisaika		Tasapainotumisaika		Tasapainotumisaika	
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen										
EPÄSUORA MENETELMÄ										
Rinnakkaismenetelmä										
Testiaineen konsentraatio vesifaa-sissa nollakokeen korjaus huomioituna	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Sarjamenetelmä										
Testiaineen mitattu massa määräosassa V^{A}_{a}	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
SUORA MENETELMÄ										
Maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Adsorption laskeminen										
Adsorptio	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Keskiarvo										
Adsorptiokerroin	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Keskiarvo										
Adsorptiokerroin	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Keskiarvo										

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h): %

Lämpötila: °C

Adsorptiotesti: nolla- ja vertailukokeet

	Symboli	Yksikkö	Nollakoe		Nollakoe		Vertailukoe	
Koeputki n:o								
Punnitut maa-ainekset		g					0	0
Veden määrä punnitussa maa-aineksessa (laskettu)		cm^3					—	—
Lisätyn 0,01 M $CaCl_2$,-liuoksen tilavuus		cm^3						
Lisätyn testiaineen varastoliuoksen tilavuus		cm^3	0	0				
Vesifaasin kokonaistilavuus (laskettu)		cm^3					—	—

▼B

	Symboli	Yksikkö	Nollakoe		Nollakoe		Vertailukoe	
Vesifaasissa olevan testiaineen alkukonsentraatio		µg cm^{-3}						
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen								
Konsentraatio vesifaasissa		µg cm^{-3}						

Huomautus: sarakkeita voidaan tarvittaessa lisätä.

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h): %

Lämpötila: °C

Massatase

	Symboli	Yksikkö				
Koeputki n:o						
Punnittu maa-aines	—	g				
Maa-aines: kuivapaino	ms_{oil}	g				
Punnitussa maa-aineksessa olevan veden tilavuus (laskettu)	V_{WS}	ml				
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M $CaCl_2$-liuoksen määrä		ml				
Varastoliuoksen tilavuus		cm^3				
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	V_0	cm^3				
Testiliuoksen	C_0	µg cm^{-3}				
Tasapainottumisaika	—	h				
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen						
Testiainekonsentraatio vesifaasissa adsorptiotasapainotilassa nollakokeen korjaus huomioituna	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Tasapainottumisaika	t_{eq}	h				
1. laimennus liuotinta käyttäen						
Poistetun vesifaasin tilavuus	V_{rec}	cm^3				
Lisätyn liuottimen tilavuus	ΔV	cm^3				
1. uutto liuotinta käyttäen						
Analysaattorisignaali — liuotin	S_{E1}	eril.				
Testiaineen konsentraatio liuottimessa	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Symboli	Yksikkö				
Maa-aineksesta ja astiaseinämistä uutetun aineen massa	m_{E1}	µg				

2. laimennus liuotinta käyttäen

Poistetun liuottimen tilavuus	ΔV_s	cm^3				
Lisätyn liuottimen tilavuus	$\Delta V'$	cm^3				

2. uutto liuotinta käyttäen

Analysaattorisignaali — liuotinfaasi	S_{E2}	eril.				
Testiaineen konsentraatio liuottimessa	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Maa-aineksesta ja astiaseinämistä uutetun aineen massa	m_{E2}	µg				
Kahdessa vaiheessa uutetun testiaineen kokonaismassa	m_E	µg				
Massatase	MB	%				

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):

Lämpötila:

Adsorptioisotermit

	Symboli	Yksikkö								
Koeputki n:o										
Punnittu maa-aines	—	g								
Maa-aines: kuivapaino	E	g								
Veden tilavuus punnitussa maa-aineksessa (laskettu)	V_{WS}	cm^3								
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M $CaCl_2$-liuoksen tilavuus		cm^3								
Lisätyn varastoliuoksen tilavuus		cm^3								
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (laskettu)	V_0	cm^3								
Liuoskonsentraatio	C_0	µg cm^{-3}								
Tasapainottumisaika	—	h								

▼B

	Symboli	Yksikkö								
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen										
Aineen konsentraatio vesifaasissa nollakokeen korjaus huomioituna	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Lämpötila		°C								
Maa-ainesyksikköä kohden adsorboitunut massa	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressioanalyysi:

K_F^{ads}-arvo:

l/n-arvo:

regressiokerroin r^2:

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):

Lämpötila:

Käytetty analyysimenetelmä: Epäsuora ☐ Rinnakkais ☐ Sarja ☐

Desorptiotesti

		Symboli	Yksiköt	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli
Adsorptiovaiheesta saatavan koeputken n:o							
Maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa		$m_{s}^{ads}(eq)$	µg				
Poistetun vesifaasin tilavuus, korvataan 0,01 M $CaCl_2$:lla		V_R	cm^3				
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	RM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jäävän testiaineen massa		m_{aq}^{A}	µg				
Desorptiokinetiikka							
Ajanhetkellä t_i mitatun maa-aineksesta desorboituneen aineen massa		$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Koeputkesta (i) testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus	RM	V_r^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Ajanhetkellä t_i maa-aineksesta desorboituneen aineen massa (laskettu)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Aikavälillä Δt_i maa-aineksesta desorboituneen aineen massa (laskettu)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symboli	Yksiköt	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli
Desorboitumisprosentti						
Desorptio ajanhetkellä t_i	D_{t_i}	%				
Desorptio aikavälillä Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Näennäinen desorptiokerroin	K_{des}					

RM: Rinnakkaismenetelmä

SM: Sarjamenetelmä

▼B

C.19 MAA-AINEKSIIN JA VIEMÄRILIETTEESEEN SOVELLETTAVAN ADSORPTIOKERTOIMEN (K_{oc}) MÄÄRITYS KORKEAN SUORITUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIALLA (HPLC)

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testimenetelmästä TG 121 (2000).

1.1 JOHDANTO

Aineiden sorptiokäyttäytymistä maa-aineksiin ja viemärilietteeseen voidaan kuvata muuttujilla, jotka voidaan määrittää kokeellisesti testimenetelmällä C 18. Tärkeä muuttuja on adsorptiokerroin, joka on määritelmän mukaan aineen maa-aineksessa tai viemärilietteessä olevan konsentraation ja adsorptiotasapainossa vesifaasissa olevan konsentraation suhde. Maa-aineksen orgaanisen hiilen pitoisuuden suhteen normalisoitua adsorptiokerrointa K_{oc} voidaan käyttää osoittamaan kemiallisen aineen sitoutumiskykyä maa-aineksen tai viemärilietteen orgaaniseen ainekseen, jolloin eri kemikaaleja voidaan verrata. Tämä muuttuja voidaan arvioida vesiliukoisuuden ja n-oktanoli-vesijakautumiskertoimen suhteen tehtyjen korrelaatioiden avulla (1) (2) (3) (4) (5) {6} (7).

Tässä testiohjeessa kuvatussa menetelmässä käytetään HPLC:tä adsorptiokertoimen K_{oc} määrittämiseksi maa-aineksessa ja viemärilietteessä (8). Estimaatit ovat luotettavampia kuin QSAR-laskelmista saadut (9). Estimointimenetelmänä tämä menetelmä ei kuitenkaan voi täysin korvata testimenetelmässä C 18 kuvattua erätasapainomenetelmää. Estimoitua K_{oc}-arvoa voidaan kuitenkin käyttää valittaessa testimuuttujia testimenetelmän C 18 mukaan tehtäviin adsorptio-desorptiokokeisiin laskemalla K_d (jakautumiskerroin) tai K_f (Freundlichin adsorptiokerroin) yhtälöstä 3 (jakso 1.2).

1.2 MÄÄRITELMÄT

K_d: jakautumiskerroin: liuenneen testiaineen tasapainokonsentraatioiden C suhde kaksifaasijärjestelmässä, joka koostuu sorbentista (maa-aines tai viemäriliete) ja vesifaasista. Arvo on paljas luku, jos konsentraatiot on ilmaistu molemmissa faaseissa painoyksiköissä. Jos vesifaasin konsentraatio ilmaistaan painoyksikköinä tilavuusyksikköä kohti, laatu on ml · g^{-1}. K_d voi vaihdella sorbentin ominaisuuksien mukaan, ja se voi olla konsentraatiosta riippuvainen.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

jossa:

C_{soil} = testiaineen tasapainokonsentraatio maa-aineksessa (µg · g^{-1})

C_{sludge} = testiaineen tasapainokonsentraatio viemärilietteessä (µg · g^{-1})

$C_{aq|}$ = testiaineen tasapainokonsentraatio vesifaasissa (µg · g^{-1}, µg · ml^{-1}).

▼B

K_f: Freundlichin adsorptiokerroin: testiaineen konsentraatio maa-aineksessa tai viemärilietteessä (x/m), kun tasapainokonsentraatio vesifaasissa (C_{aq}) on yksi; laatu on $\mu g \cdot g^{-1}$ sorbenttia. Arvo voi vaihdella sorbentin ominaisuuksien mukaan.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

jossa:

x/m = sorbentin määrään m (g) adsorboituneen testiaineen määrä x (μg) tasapainotilassa

l/n = Freundlichin adsorptioisotermikuvaajan kulmakerroin

C_{aq} = testiaineen tasapainokonsentraatio vesifaasissa ($\mu g \cdot ml^{-1}$)

$$\text{At} C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Sorbentin orgaanisen hiilen pitoisuuden (f_{oc}) suhteen normalisoitu aineen jakautumiskerroin (K_d) tai ainetta koskeva Freundlichin adsorptiokerroin (K_f). Erityisesti ionisoitumattomille kemikaaleille se osoittaa suunnilleen aineen ja sorbentin välisen adsorption määrän, ja sen avulla voidaan verrata eri kemikaaleja. K_d:n ja K_f:n laaduista riippuen K_{oc} voi olla laaduton tai sen laatu voi olla $ml \cdot g^{-1}$ tai $\mu g \cdot g^{-1}$ orgaanista ainetta.

$$\text{Koc} = \frac{\text{Kd}}{\text{foc}} \left((\text{laaduton tai ml} \cdot g^{-1}\right) \text{tai} \frac{\text{Kf}}{\text{foc}} \left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

K_{oc}:n ja K_d:n suhde ei ole aina lineaarinen, ja siten K_{oc}-arvot voivat vaihdella maa-ainesten välillä, mutta vaihtelun määrä on paljon pienempi kuin K_d- tai K_f-arvojen vaihtelu.

Adsorptiokerroin (K_{oc}) johdetaan kapasiteettikertoimesta (k'} käyttämällä kuvaajaa, jossa log k' esitetään log K_{oc}:n funktiona valikoiduille vertailuyhdisteille.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

jossa:

t_R = testiaineen ja vertailuaineen HPLC-retentioaika (minuuttia)

t_0 = HPLC:n kuollut aika (minuuttia) (ks. jakso 1.8.2).

P_{ow}: Oktanoli-vesijakautumiskerroin: n-oktanoliin liukenevan ja veteen liukenevan aineen konsentraatioiden suhde, joka on laaduton suure.

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coktanoli}}{\text{Caq}} \left(= \text{Kow}\right) \quad (5)$$

1.3 VERTAILUAINEET

Aineen rakennekaava, puhtaus ja hajoamisvakio (tarvittaessa) olisi tiedettävä ennen kuin menetelmää käytetään. Veteen ja orgaanisiin liuottimiin liukenemista, oktanoli-vesijakautumiskerrointa ja hydrolyysiominaisuuksia koskevat tiedot ovat hyödyllisiä.

▼B

Jotta mitatut HPLC-retentiotulokset voidaan korreloida aineen adsorptiokertoimen K_{oc} kanssa, on laadittava kalibrointikuvaaja, jossa log K_{oc} esitetään log k':n funktiona. Kuvaajassa on oltava vähintään kuusi referenssipistettä, joista vähintään yhden on oltava testiaineen odotetun arvon yläpuolella ja yhden sen alapuolella. Menetelmän tarkkuus paranee huomattavasti, jos vertailuaineet ovat rakenteeltaan testiaineen kaltaisia. Jos tällaisia tietoja ei ole saatavilla, käyttäjän on valittava sopivat kalibrointiaineet. Siinä tapauksessa olisi valittava rakenteellisesti heterogeenisiä aineita. Käyttökelpoisia aineita ja K_{oc}-arvoja esitetään viemärilietteelle lisäyksen taulukossa 1 ja maa-aineksille taulukossa 3. Jos valitaan muita kalibrointiaineita, ne on perusteltava.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

HPLC tehdään analyyttisillä pylväillä, jotka on pakattu kaupallisesti saatavilla lipofiilisiä ja polaarisia osia sisältävillä syanopropyylipohjaisilla kiinteillä faaseilla. Stationaarifaasina käytetään suhteellisen polaarista silikamatriisipohjaista ainetta:

— O — Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
silika	pooliton spacer-aine	polaarinen osa

Testimenetelmän periaate on samankaltainen kuin testimenetelmän A 8 (jakautumiskerroin, HPLC-menetelmä) periaate. Kun testiaine kulkee pylvään läpi liikkuvan faasin mukana, se reagoi stationaarifaasin kanssa. Koska testiaine jakautuu liikkuvaan ja stationaariseen faasiin, sen kulku hidastuu. Koska stationaarifaasissa on sekä polaarisia että poolittomia paikkoja, sekä molekyylin polaariset että poolittomat ryhmät voivat reagoida samalla tavalla kuin maa-aineksen tai viemärilietteen sisältämän orgaanisen aineksen kanssa. Tämän ansiosta voidaan määrittää pylvääseen liittyvän retentioajan ja orgaaniseen aineeseen tapahtuvan imeytymisen adsorptiokertoimen välinen suhde.

pH:lla on huomattava vaikutus sorptiokäyttäytymiseen erityisesti polaarisilla aineilla. Maanviljelysmaa-aineksissa tai viemärivesien käsittelylaitosten tankeissa pH vaihtelee tavallisesti välillä 5,5 - 7,5. Ionisoituville aineille olisi tehtävä kaksi testiä sekä ionisoituneessa että ionittomassa muodossa sopivissa puskuriliuoksissa, mutta vain silloin, kun vähintään 10 % testiaineesta dissosioituu välillä pH 5,5 - 7,5.

Koska arviointiin käytetään vain HPLC-pylvästä koskevan retentioajan ja adsorptiokertoimen välistä suhdetta, kvantitatiivista määritysmenetelmää ei tarvita ja vain retentioajan määritys on tarpeen. Jos on käytettävissä sopivia vertailuaineita ja koeolosuhteet ovat vakioidut, tämä menetelmä on nopea ja tehokas keino arvioida adsorptiokerroin K_{oc}.

1.5 TESTIN SOVELTAMISALA

HPLC-menetelmä sopii sellaisille kemiallisille aineille (riippumatta siitä, onko niissä erityisiä merkkiaineita tai esim. radioaktiivista leimaa), joille on käytettävissä sopiva detektiomenetelmä (esim. spektrofotometrinen tai radioaktiivisen säteilyn mittalaite) ja jotka pysyvät riittävän stabiileina kokeen aikana. Menetelmä voi olla erityisen hyvä sellaisille aineille, joita on vaikea tutkia muunlaisissa koejärjestelyissä (ts. haihtuvat aineet tai aineet, jotka eivät liukene veteen sellaisessa pitoisuudessa, että se voidaan mitata tarkasti; aineet, joilla on suuri affiniteetti inkubaatiojärjestelmien pintaan). Menetelmää voidaan käyttää seoksille, joiden eluutiovyöhykkeet eivät erotu toisistaan. Silloin olisi ilmoitettava testiseokseen sisältyvien yhdisteiden log K_{oc}-arvojen ylä- ja alarajat.

▼B

Epäpuhtaudet voivat joskus aiheuttaa ongelmia HPLC-tulosten tulkinnassa, mutta ne eivät juurikaan aiheuta ongelmia, jos testiaine voidaan tunnistaa analyyttisesti ja erottaa epäpuhtauksista.

Menetelmä on validoitu lisäyksessä olevassa taulukossa 1 luetelluille aineille. Sitä sovellettiin myös useille muille kemikaaleille, jotka kuuluivat seuraaviin kemiallisiin luokkiin:

— aromaattiset amiinit (esim. trifluraliini, 4-kloorianiliini, 3,5-dinitroaniliini, 4-metyylianiliini, N-metyylianiliini, 1-naftyyliamiini)

— aromaattiset karboksyylihappoesterit (esim. bentsoehappometyyliesteri, 3,5-dinitrobentsoehappometyyliesteri)

— aromaattiset hiilivedyt (esim. tolueeni, ksyleeni, etyylibentseeni, nitrobentseeni)

— aryylioksifenoksipropionihappoesterit (esim. diklofoppi-metyyli, fenoksaproppi-etyyli, fenoksaproppi-P-etyyli)

— bentsimidatsoli- ja imidatsolifungisidit (esim. karbendatsiimi, fuberidatsoli, triatsoksidi)

— karboksyylihappoamidit (esim. 2-klooribentsamidi, N,N-dimetyylibentsamidi, 3,5-dinitrobentsamidi, N-metyylibentsamidi, 2-nitrobentsamidi, 3-nitrobentsamidi)

— klooratut hiilivedyt (esim. endosulfaani, DDT, heksaklooribentseeni, kvintotseeni, 1,2,3-triklooribentseeni)

— orgaanisia fosforiyhdisteitä sisältävät torjunta-aineet (esim. atsinfossi-metyyli, disulfotoni, fenamifossi, isofenfossi, pyratsofossi, sulprofossi, triatsofossi)

— fenolit (esim. fenoli, 2-nitrofenoli, 4-nitrofenoli, pentakloorifenoli, 2,4,6-trikloorifenoli, 1-naftoli)

— tenyyliurea-johdannaiset (esim. isoproturoni, monolinuroni, pensykuroni)

— väriaineet (esim. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)

— polyaromaattiset hiilivedyt (esim. asenafteeni, naftaleeni)

— 1,3,5-triatsiinia sisältävät kasvinsuojeluaineet (esim. prometryyni, propatsiini, simatsiini, terbutryyni)

— triatsolijohdannaiset (esim. tebukonatsoli, triadimefoni, tradimenoli, triapentenoli).

Menetelmä ei sovellu aineille, jotka reagoivat joko eluentin tai stationaarifaasin kanssa. Se ei myöskään sovellu aineille, jotka reagoivat spesifisellä tavalla epäorgaanisten yhdisteiden kanssa (jos esim. muodostuu klusterikomplekseja saven mineraalien kanssa). Menetelmä ei mahdollisesti sovellu myöskään pinta-aktiivisille aineille, epäorgaanisille yhdisteille eikä vahvoille tai melko vahvoille hapoille ja emäksille. Välillä 1,5 - 5,0 olevia log K_{oc}-arvoja voidaan määrittää. Ionisoituvat yhdisteet on määritettävä käyttäen puskuroitua liikkuvaa faasia, mutta on varottava, etteivät puskurin sisältämät aineet tai testiaine saostu.

▼B

1.6 LAATUVAATIMUKSET

1.6.1 **Tarkkuus**

Testiaineen adsorptiokerroin voidaan tavallisesti arvioida ± 0,5 logaritmiyksikön tarkkuudella verrattuna erätasapainomenetelmällä määritettyyn arvoon (ks. lisäyksessä oleva taulukko 1). Suurempaan tarkkuuteen voidaan päästä, jos vertailuaineet ovat rakenteellisesti testiaineen kaltaisia.

1.6.2 **Toistettavuus**

Määritykset olisi tehtävä vähintään kaksoismäärityksinä. Yksittäisistä mittauksista lasketut log K_{oc}-arvot eivät saisi erota toisistaan enemmän kuin 0,25 logaritmiyksikköä.

1.6.3 **Uusittavuus**

Menetelmää sovellettaessa saadut kokemukset tukevat käsitystä menetelmän validiteetista. Kun HPLC-menetelmää tutkittiin 48 aineella (enimmäkseen torjunta-aineita), joista oli saatavilla luotettavia maa-ainesten K_{oc}:tä koskevia tietoja, saatiin korrelaatiokertoimeksi R = 0,95 (10) (11).

Menetelmän parantamiseksi ja validoimiseksi tehtiin laboratorioiden välinen vertailukoe, johon osallistui 11 laboratoriota (12). Tulokset esitetään lisäyksessä olevassa taulukossa 2.

1.7 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 **Adsorptiokertoimen alustava määritys**

Oktanoli-vesijakautumiskerrointa P_{ow} (= K_{ow}) ja (jossain määrin) vesiliukoisuutta voidaan käyttää osoittamaan adsorption määrää erityisesti ionisoitumattomille yhdisteille, ja siten sen avulla voidaan alustavasti määrittää kyseeseen tuleva mittausalue. Useille kemikaaliryhmille on julkaistu useita käyttökelpoisia korrelaatioita (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2 **Laitteet**

Menetelmässä tarvitaan nestekromatografi, jossa on pulssittomasti toimiva pumppu ja sopiva detektori. On suositeltavaa käyttää injektioventtiiliä ja injektiosilmukkaa. Pylvään pakkausaineena on käytettävä kaupallista kemiallisesti sidottua silikapohjaista syaanopropyylihartsia (esim. Hypersil ja Zorbax CN). Samaa ainetta oleva esipylväs voidaan liittää injektiojärjestelmän ja analyyttisen pylvään väliin. Eri valmistajien pylväiden erotustehot voivat erota huomattavasti toisistaan. Ohjeellisesti pitäisi pyrkiä seuraavanlaisiin kapasiteettikertoimiin k': log k' > 0,0, kun log K_{oc} = 3,0 ja log k' > -0,4, kun log K_{oc} = 2,0 käytettäessä metanoli/vesiseosta (55/45 %) liikkuvana faasina.

1.7.3 **Liikkuva faasi**

Useita liikkuvia faaseja on testattu, ja seuraavia kahta suositetaan:

— metanoli/vesi (55/45 % v/v)

— metanoli/0,01 M sitraattipuskuri, pH 6,0 (55/45 % v/v)

▼B

Eluutioliuoksen valmistukseen on käytettävä HPLC-laatuista metanolia ja tislattua vettä tai sitraattipuskuria. Seoksesta poistetaan kaasut ennen käyttöä. Eluution pitäisi olla isokraattinen. Jos metanoli-vesiseokset eivät sovellu, voidaan kokeilla muita orgaanisen liuottimen ja veden seoksia, esim. etanoli-vesi- tai asetonitriili-vesiseoksia. Ionisoituville yhdisteille suositetaan puskuriliuoksen käyttöä pH:n pitämiseksi vakiona. Suolan saostumista ja pylvään suoritustehon heikentymistä on pyrittävä välttämään. Se voi tapahtua käytettäessä tiettyjä orgaanisia faaseja ja puskuriseoksia.

Mitään sellaisia lisäaineita kuten ioniparireagensseja ei saa käyttää, koska ne voivat vaikuttaa stationaarifaasin sorptio-ominaisuuksiin. Tällaiset stationaarifaasin muutokset voivat olla palautumattomia. Siksi kokeet, joissa käytetään lisäaineita, on ehdottomasti tehtävä eri pylväillä.

1.7.4 **Liuotetut aineet**

Testi- ja vertailuaine olisi liuotettava liikkuvaan faasiin.

1.8 TESTIN SUORITUSTEHO

1.8.1 **Testiolosuhteet**

Lämpötila olisi rekisteröitävä mittausten aikana. Suositellaan, että käytetään termostoitua pylvästä, jotta voidaan varmistaa vakio-olosuhteet kalibrointimittausten ja alustavien ajojen sekä testiaineen määritysten aikana.

1.8.2 **Kuollut aika t_o**

Kuollut aika t_o voidaan määrittää kahdella eri menetelmällä (ks. myös jakso 1.2).

1.8.2.1 *Kuolleen ajan t_o määritys homologisen sarjan avulla*

Tämän menetelmän on osoitettu antavan luotettavia ja vakioituja t_o-arvoja. Menetelmä selostetaan yksityiskohtaisesti testimenetelmässä A.8: Partitiokerroin (n-oktanoli/vesi), HPLC-menetelmä.

1.8.2.2 *Kuolleen ajan t_o määritys inerteillä aineilla, jotka eivät tartu pylvääseen*

Tämä menetelmä perustuu formamidi-, urea- tai natriumnitraattiliuosten injektoimiseen. Määritykset olisi tehtävä vähintään kaksoismäärityksinä.

1.8.3 **Retentioaikojen t_R määritys**

Vertailuaineet olisi valittava kuten jaksossa 1.3 selostetaan. Ne voidaan injektoida seosstandardina retentioaikojen määrittämiseksi, mikäli on vahvistettu, että toisten vertailuaineiden läsnäolo ei vaikuta yksittäisten vertailuaineiden retentioaikoihin. Kalibrointi olisi tehtävä säännöllisin väliajoin vähintään kahdesti päivässä, jotta pylväiden mahdolliset suorituskyvyn muutokset voidaan selittää. Kalibrointiajot olisi tehtävä mieluiten ennen testiaineen injektioita ja niiden jälkeen, jotta voidaan varmistaa, etteivät retentioajat ole muuttuneet. Testiaineet injektoidaan erikseen mahdollisimman pieninä määrinä (pylvään ylikuormituksen estämiseksi), ja niiden retentioajat määritetään.

▼B

Määritysten luotettavuuden lisäämiseksi olisi tehtävä vähintään kaksoismääritykset. Yksittäisistä mittauksista lasketut log K_{oc}-arvot eivät saisi erota toisistaan enemmän kuin 0,25 logaritmiyksikköä.

1.8.4 **Arviointi**

Kapasiteettikertoimet k' lasketaan valittujen vertailuaineiden kuolleesta ajasta t_o ja retentioajoista t_R yhtälön 4 avulla (ks. jakso 1.2). Laaditaan kuvaaja, jossa esitetään vertailuaineiden log k' -arvot erätasapainokokeesta saatujen, lisäyksen taulukoissa 1 ja 3 esitettyjen vertailuaineita koskevien log K_{oc} -arvojen funktiona. Testiaineen log K_{oc} -arvo määritetään sen log k' -arvon perusteella kyseisen kuvaajan avulla. Jos testiaineen log K_{oc} osoittautuu todellisten tulosten perusteella olevan kalibrointialueen ulkopuolella, testi olisi toistettava käyttäen sopivampia vertailuaineita.

2. **MITTAUSTULOKSET JA TESTISELOSTEET**

Testiselosteessa on esitettävä tai selostettava seuraavat asiat:

— testiaineiden ja vertailuaineiden tunnistetiedot ja niiden puhtaus sekä pK_a-arvot tarvittaessa,

— laitteet ja toimintaolosuhteet, esim. analyyttisen (ja esi-) pylvään tyyppi ja mitat, detektiomenetelmä, liikkuva faasi (ainesten suhteelliset osuudet ja pH), lämpötila-alue mittausten aikana,

— kuollut aika ja sen määrittämiseen käytetty menetelmä,

— pylvääseen injektoitujen testiaineiden ja vertailuaineiden määrät,

— kalibrointiin käytettyjen vertailuaineiden retentioajat,

— sovitettua regressiokuvaajaa (log k' vs log K_{oc}) koskevat tiedot ja itse kuvaaja,

— testatun yhdisteen keskimääräinen retentioaika ja estimoitu d log K_{oc}-arvo,

— kromatogrammit.

3. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996).Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

LISÄYS

Taulukko 1

Maa-ainesten ja viemärilietteiden K_{oc}-arvojen ja kartoittavan HPLC menetelmän perusteella laskettujen arvojen vertailu ([1]) ([2])

Aine	CAS-nro	Log K_{oc} viemäri-lietteet	Log K_{oc} HPLC	Δ	Log K_{oc} maa-ainekset	Log K_{oc} HPLC	Δ
Atratsiini	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuroni	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentioni	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuroni	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreeni	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bentsoehappofe-nyyliesteri	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bentsamidi	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobcntsamidi	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Asetanilidi	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniliini	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Dikloorianiliini	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), s. 121–128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), s. 107–119.

Taulukko 2

Tulokset 11 laboratorion välisestä vertailusta, jonka tarkoituksena oli parantaa ja validoida HPLC-menetelmä ([1])

Aine	CAS-nro	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		[OECD 106]	[HPLC-menetelmä]	
Atratsiini	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuroni	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenoli	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuroni	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentioni	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373–1384.

▼B

Taulukko 3

Kartoittavaan HPLC-menetelmään suositellut vertailuaineet; tiedot perustuvat maa-ainesten adsorptiotuloksiin

Vertailuaine	CAS-nro	Erätasapainosta saadut log K_{oc} -arvojen keskiarvot	K_{oc} -tulosten lukumäärä	Log S.D.	Lähde
Asetanilidi	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenoli	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-Nitrobentsamidi	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-Dimetyylibentsamidi	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-Metyylibentsamidi	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metyylibentsoaatti	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
Atratsiini	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
Isoproturoni	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-Nitrobentsamidi	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Aniliini	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-Dinitrobentsamidi	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendatsiimi	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
Triadimenoli	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
Triatsoksidi	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
Triatsofossi	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuroni	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftaleeni	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfaani-dioli	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarbi	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-Triklooribentseeni	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fentioni	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyratsofossi	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-Endosulfaani	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofoppi-metyyli	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
Fenantreeni	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (seos)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

[a] W. Kördel. J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01 044 (1994).
[b] B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22. s. 285–304.
[c] Data provided by industry.

▼M7

C.20. LISÄÄNTYMISTESTI VESIKIRPULLA (*DAPHNIA MAGNA*)

JOHDANTO

Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 211 (2012). OECD:n testiohjeita tarkistetaan säännöllisesti tieteen kehityksen perusteella. Lisääntymistestin yleisohje 211 on peräisin testiohjeen 202 II osasta, *Daphnia*-lajin vesikirppujen lisääntymistesti (*Daphnia* sp. reproduction test) (1984) On yleisesti tunnustettu, että tiedot testeistä, jotka tehtiin testiohjeen 202 perusteella, voivat olla vaihtelevia. Siksi pyrittiin panostamaan huomattavasti tämän vaihtelun syiden tunnistamiseen. Tavoitteena oli saada aikaan parempi testimenetelmä. Testiohje 211 perustuu näiden tutkimusten, yhteistutkimusten ja vuonna 1992 (1), 1994 (2) ja 2008 (3) tehtyjen validointitutkimusten tuloksiin.

Lisääntymistestin ohjeen alkuperäisen version (testiohje 202, 1984) ja toisen version (testiohje 211, 1988) väliset pääasialliset erot ovat seuraavat:

— Laji, jota suositellaan käytettäväksi on *Daphnia magna*.

— Testin kesto on 21 vuorokautta.

— Semistaattisessa testissä kussakin testikonsentraatiossa käytettävän vähintään 40 eläimen määrää on vähennetty, ja ne jaetaan mieluiten neljään 10 eläimen ryhmään, joista ainakin 10 eläintä pidetään yksittäin (vaikka läpivirtaustesteissä voidaan käyttää eri malleja).

— Viljelynesteestä ja ruokinnasta on annettu tarkempia suosituksia.

— Pääasialliset erot lisääntymistestin ohjeen toisen version (TG 211, 1998) ja tämän version välillä ovat seuraavat:

— Lisäys 7 on lisätty kuvaamaan menettelyitä vastasyntyneen sukupuolen tunnistamiseen, jos tätä tarvitaan. Tämän testimenetelmän aikaisempien versioiden mukaisesti sukupuolten välinen suhde on valinnainen päätepiste.

— Elossa olevan emon tuottamien elävien jälkeläisten vastemuuttujien määrää on täydennetty ylimääräisellä vesikirpun lisääntymistä koskevalla vastemuuttujalla – testin lopussa tuotettujen elävien jälkeläisten kokonaismäärä testin alussa ollutta emovesikirppua kohti – ja analyysin ulkopuolelle jätetään emon vahingossa ja/tai epähuomiossa tapahtunut kuolema. Uuden vastemuuttujan tarkoitus on tämän vastemuuttujan mukauttaminen selkärankaisten lisääntymiseen liittyviin muihin testimenetelmiin. Lisäksi, kun kyse on tästä vastemuuttujasta, tässä testimenetelmässä on mahdollista poistaa virhelähde, eli emon epähuomiossa ja/tai vahingossa tapahtuva kuolema, jos tämä sattuu altistuksen aikana.

— Muita tilastollisia ohjeita testin suunnitteluun ja tulosten käsittelyyn on sisällytetty ECx-arvoa (esimerkiksi EC50, EC10) ja NOEC/LOEC-arvoa koskevaan lähestymistapaan.

— Lisäksi otetaan käyttöön raja-annostesti.

Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

Testin pääasiallinen tarkoitus on määrittää kemikaalien vaikutus *Daphnia magna*-vesikirpun lisääntymistuotokseen. Tästä syystä nuoria naarasvesikirppuja (emot), joiden ikä on alle 24 tuntia testin alussa, altistetaan testikemikaalille, jota on lisätty veteen useissa pitoisuuksissa. Testin kesto on 21 vuorokautta. Testin lopussa arvioidaan elävien jälkeläisten kokonaismäärä. Emojen lisääntymistuotos voidaan ilmaista muillakin tavoin (esim. elävien jälkeläisten määrä eläintä kohti päivässä siitä päivästä lähtien, jolloin jälkeläiset havaittiin ensimmäisen kerran), mutta tämä pitäisi ilmoittaa testin lopussa tuotettujen elävien jälkeläisten kokonaismäärän lisäksi. Koska puolistaattisella testillä on erityinen rakenne muihin

▼M7

selkärangattomien lisääntymistä koskeviin testimenetelmiin verrattuna, on myös mahdollista laskea kunkin yksittäisen emon elävien jälkeläisten määrä. Tämä mahdollistaa, toisin kuin muissa selkärangattomien lisääntymistä koskevissa testimenetelmissä, että jos emoeläin kuolee vahingossa ja/tai epähuomiossa testijakson aikana, sen jälkeläisten tuotanto voidaan jättää pois tietojen arvioinnista. Jos emojen kuolleisuus ilmenee altistetuissa rinnakkaisnäytteissä, olisi harkittava, seuraako kuolleisuus pitoisuusvastesuhdetta, eli onko vasteen regressio huomattava verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen, joka on ylöspäin nouseva (tähän voidaan käyttää tilastollista testiä, kuten Cochran-Armitagen trenditestiä). Jos kuolleisuus ei seuraa pitoisuusvastesuhdetta, rinnakkaisnäytteet, joissa emo on kuollut, pitäisi jättää testin tuloksen arvioinnin ulkopuolelle. Jos kuolleisuus seuraa pitoisuusvastesuhdetta, emojen kuolleisuus pitäisi määrittää testikemikaalin vaikutukseksi, ja rinnakkaisnäytteitä ei pitäisi jättää arvioinnin ulkopuolelle. Jos emo kuolee testin aikana, joko vahingossa epäasianmukaisen käsittelyn tai tapaturman vuoksi tai epähuomiossa selittämättömän tapauksen vuoksi, joka ei liity testikemikaalin vaikutukseen, tai jos kyseessä on koiras, rinnakkainen eläin jätetään arvioinnin ulkopuolelle (lisätietoja on 51 kohdassa). Testikemikaalin toksinen vaikutus lisääntymistuotokseen ilmaistaan EXc-arvolla sovittamalla tiedot sopivaan malliin epälineaarisella regressiomenetelmällä, jolla arvioidaan pitoisuus, joka aiheuttaisi x prosentin vähennyksen lisääntymistuotoksiin, tai vaihtoehtoisesti NOEC/LOEC-arvolla (4). *Testipitoisuudeksi olisi valittava alhaisin käytetyistä vaikuttavista pitoisuuksista (esim. EC_{10}), mikä merkitsee, että tämä arvo lasketaan ekstrapoloinnin sijaan interpoloimalla.*

Myös emojen eloonjääminen ja ensimmäisten sikiöiden tuottamisen ajankohta on ilmoitettava. Muut kemikaaliin liittyvät vaikutukset muuttujiin, kuten kasvu (esim. pituus), ja mahdollisesti populaation kasvun ominaisnopeus voidaan myös tutkia (ks. 44 kohta).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

Akuuttia toksisuutta koskevan tutkimuksen tulokset (ks. tässä liitteessä oleva C.2 luku: *Daphnia* sp. akuutin immobilisaation testi), joka tehdään *Daphnia magna* -vesikirpuille voi olla hyödyllinen valittaessa lisääntymistestien sopivat testipitoisuusalueet. Testikemikaalin vesiliukoisuus ja höyrynpaine on oltava tiedossa, ja kemikaalin kvantifioimiseksi testiliuoksissa on oltava käytettävissä luotettava analyysimenetelmä, jonka saantoteho on raportoitu, ja määritysraja pitäisi olla saatavissa.

Testikemikaalia koskevia tietoja, joista on hyötyä testiolosuhteiden määrittelemiseksi, ovat mm. rakennekaava, kemikaalin puhtaus, valostabiilisuus, stabiilisuus testiolosuhteissa, pKa, P_{ow} ja helpon biohajoavuuden testin tulokset (ks. tässä liitteessä oleva C.4 luku [biohajoavuuden määritys] ja C.29 luku [helpon biohajoavuuden testi – hiilidioksidi suljetuissa astioissa]).

TESTIN VALIDITEETTI

Jotta testi olisi luotettava, kontrollien pitäisi täyttää seuraavat perusteet:

— Emojen (naarasvesikirppujen) kuolleisuus on enintään 20 prosenttia testin lopussa.

— Testin lopussa elossa olevan emon tuottamia eläviä jälkeläisiä on keskimäärin vähintään 60.

Huomautus: samaa hyväksyttävyysperustetta (20 prosenttia) voidaan soveltaa emon vahingossa ja/tai epähuomiossa tapahtuvaan kuolemaan kontrolleissa sekä kutakin testipitoisuutta kohti.

▼M7

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

Astioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Testiastiat ovat tavallisesti lasisia dekantterilaseja.

Lisäksi tarvitaan seuraavia välineitä (kaikkia tai joitakin niistä):

— happimittari (joka on varustettu mikroelektrodilla tai muulla sopivalla laitteella, jolla voidaan mitata liuennut happi pienitilavuuksisissa näytteissä)

— asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön

— ph-mittari

— laitteet veden kovuuden mittaamiseen

— laitteet veden orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuuden (TOC) mittaamiseen tai kemiallisen hapenkulutuksen (COD) mittaamiseen

— asianmukaiset laitteet valojärjestelmän ja valon intensiteetin säätöön.

Koe-eliö

Testissä olisi käytettävä *Daphnia magna Straus* -eliötä ([1]).

Klooni olisi mieluiten tunnistettava genotyypin määrityksellä. Tutkimuksissa (1) on osoitettu, että kloonin A (joka on peräisin IRCHA:sta Ranskasta) (5) lisääntymistuottavuus täyttää jatkuvasti vaatimuksen, jonka mukaan tässä testimenetelmässä kuvatuissa olosuhteissa tuotto on keskimäärin $\geq$ 60 jälkeläistä kutakin elävää emoa kohti. Muutkin kloonit ovat kuitenkin hyväksyttäviä, jos vesikirppuviljelmän osoitetaan täyttävän testiä koskevan validiteettiperusteen.

Testin alussa eläinten on oltava alle 24 tunnin ikäisiä, eivätkä ne saa olla ensimmäistä sikiösarjaa. Niiden olisi oltava peräisin terveestä varastokannasta (ts. niissä ei saa näkyä merkkejä stressistä, kuten korkeaa kuolleisuutta, koiraita ja lepomunia, viivästymistä ensimmäisten sikiöiden tuottamisessa, värihäiriöisiä eläimiä jne.). Varastokannan eläimiä on pidettävä samanlaisissa viljelyoloissa (valo, lämpötila, viljelyneste, ravinto ja eläinten määrä tilavuusyksikköä kohti) kuin testissä käytettäviä. Jos testissä käytettävä viljelyneste eroaa vesikirpun viljelyssä normaalisti käytetystä viljelynesteestä, on hyvä noudattaa käytäntöä, että eläimet totutetaan viljelyoloihin ennen testiä noin kolmen viikon ajan (ts. yhden sukupolven ajan), jotta emojen stressaantuminen vältettäisiin.

Testiviljelyaine

Testiin suositellaan täysin määriteltyä viljelynestettä. Siten voidaan välttää sellaisten lisäaineiden (esim. levät, maaperäuute) käyttö, joiden ominaisuuksia ei voida hallita täydellisesti, ja parannetaan siten mahdollisuuksia laboratorioiden väliseen vakiointiin. Elendtin M4- (6) ja M7-viljelynesteet (ks. lisäys 2) on todettu sopiviksi tähän tarkoitukseen. Muitakin viljelynesteitä (esim. (7) (8)) voidaan käyttää, jos vesikirppuviljelmän osoitetaan täyttävän testiä koskevan validiteettiperusteen.

([1]) Muita vesikirppuja saa käyttää, jos ne täyttävät asianmukaiset vaatimukset (kontrollien lisääntymistuottavuutta koskevan perustet pitäisi olla kaikille lajeille merkityksellinen). Jos muita vesikirppuja käytetään, ne olisi selkeästi tunnistettava ja niiden käyttö olisi perusteltava.

▼M7

Jos käytetään viljelynesteitä, joissa on kemiallisesti määrittelemättömiä lisäaineita, lisäaineet on spesifioitava selvästi ja testiselosteessa on annettava tietoa niiden koostumuksesta, erityisesti hiilipitoisuudesta, koska se voi vaikuttaa annettavaan ravintoon. Suositellaan, että orgaanisen lisäaineen varastovalmisteen orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) ja/tai kemiallinen hapenkulutus (COD) määritetään ja valmisteen vaikutus testissä käytettävän viljelynesteen TOC- ja/tai COD-arvoihin arvioidaan. Viljelynesteen TOC-tason olisi oltava (ennen levien lisäämistä) alle 2 mg/l (9).

Kun testataan metalleja sisältäviä kemikaaleja, on tärkeää ottaa huomioon, että testissä käytettävän viljelynesteen ominaisuudet (esim. kovuus, kelaatiokyky) voivat vaikuttaa testikemikaalien toksisuuteen. Tästä syystä on toivottavaa käyttää kemiallisesti määriteltyä viljelynestettä. Tällä hetkellä kuitenkin ainoat kemiallisesti määritellyt viljelynesteet, joiden tiedetään sopivan *Daphnia magnan* pitkäaikaiseen viljelyyn, ovat Elendtin M4 ja M7. Molemmissa viljelynesteissä on kelatoivaa ainetta EDTA:ta. On osoitettu (2), että kadmiumin ”näennäinen toksisuus” on yleensä pienempi, kun testi tehdään M4- ja M7-viljelynestcessä kuin nesteessä, joka ei sisällä EDTA:ta. M4- ja M7-viljelynesteitä ei siksi suositella metalleja sisältävien kemikaalien testaukseen, ja myös muita viljelynesteitä, joissa on tunnettuja kelatoivia aineita, olisi vältettävä. Metalleja sisältäville kemikaaleille voi olla suositeltavaa käyttää jotain muuta viljelynestettä, esimerkiksi ASTM:n rekonstituoitua kovaa makeaa vettä (9), joka ei sisällä EDTA:ta. Tämä ASTM:n kovan makean veden ja leväuutteen yhdistelmä (10) sopii myös Daphnia magna -vesikirpun pitkäaikaiseen viljelyyn (2).

Testin alussa ja sen aikana liuenneen hapen pitoisuuden olisi oltava yli 3 mg/l, ja pH:n olisi oltava välillä 6–9, eikä se saisi yleensä vaihdella enemmän kuin 1,5 yksikköä testin aikana. Kovuudeksi suositellaan yli 140 mg/l (ilmaistuna $CaCO_3$:na). Tällä ja suuremmalla pitoisuudella tehdyissä testeissä on osoitettu validiteettiperusteiden mukaista lisääntymistuottavuutta (11) (12).

Testiliuokset

Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan tavallisesti kantaliuoksista laimentamalla. Kantaliuokset valmistetaan mieluiten ilman liuottimia tai dispergointiaineita sekoittamalla testikemikaali laimennusveteen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittaminen tai ultraääni) tai muita asianmukaisia menetelmiä käyttäen. On suositeltavaa, että testijärjestelmiä altistetaan tutkimukseen käytettävän testikemikaalin pitoisuudelle niin kauan kuin se on tarpeen, jotta vakaiden altistuspitoisuuksien ylläpitäminen osoitetaan ennen testiorganismien käyttöönottoa. Jos testikemikaalia on vaikea liuottaa veteen, olisi noudatettava menettelyitä, joita kuvataan OECD:n ohjeissa vaikeasti testattavista aineista (13). Liuottimien tai dispergointiaineiden käyttöä pitäisi välttää, mutta tämä voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi annostelua varten.

Testisarjojen lisäksi on tehtävä laimennusvesikontrolli, johon liittyvät riittävät rinnakkaisnäytteet, ja jos on välttämätöntä, liuotinkontrolliviljelmä, johon liittyvät riittävät rinnakkaisnäytteet. Testissä on käytettävä ainoastaan liuottimia tai dispergointiaineita, joilla ei ole tutkimusten perusteella merkittävää vaikutusta vastemuuttujaan tai joilla on ainoastaan vähäinen vaikutus. Esimerkkejä sopivista

▼M7

liuottimista (esim. asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli) ja dispergointiaineista (esim. Cremophor RH40, 0,01-prosenttinen metyyliselluloosa ja HCO-40) annetaan viitteessä (13). Jos käytetään liuotinta tai dispergointiainetta, sen pitoisuus ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/l (13) ja pitoisuuden on oltava sama kaikissa testiastioissa paitsi laimennusvesikontrollissa. On kuitenkin kaikin keinoin pidettävä liuottimen pitoisuutta minimissä.

MENETTELY

Altistusolosuhteet

Kesto

Testin kesto on 21 vuorokautta.

Täyttö

Emoja pidetään testiastiassa yksi eläin astiaa kohti, astiaan pannaan yleensä 50–100 ml viljelynestettä (kun kyseessä on *Daphnia magna,* pienemmille vesikirpuille, esim. *Ceriodaphnia dubia* -lajille voidaan mahdollisesti käyttää pienempiä vesimääriä), ellei testiin tarvita läpivirtaustestiä.

Suurempi tilavuus voi olla joskus tarpeen testikemikaalin pitoisuuden määritykseen käytettävän analyyttisen menetelmän vaatimusten vuoksi, vaikka rinnakkaisnäytteet voidaan myös yhdistää kemiallista analyysiä varten. Jos tilavuus on yli 100 ml, vesikirpulle annettavaa annosta on ehkä suurennettava, jotta varmistetaan ravinnon riittävyys ja validiteettiperusteiden noudattaminen.

Koe-eläimet

Puolistaattisissa oloissa tehtävässä testissä on oltava vähintään 10 yksittäin kasvatettua vesikirppua kutakin testipitoisuutta kohti ja vähintään 10 yksittäin pidettyä vesikirppua kontrollisarjassa.

Läpivirtaustesteissä 40 vesikirppua neljään 10 vesikirpun ryhmään jaettuna on osoittautunut sopivaksi (1). Pienempääkin määrää eläimiä voi käyttää. Suositellaan vähintään 20:tä vesikirppua pitoisuutta kohti jaettuna kahdeksi tai useammaksi yhtä monta vesikirppua käsittäväksi rinnakkaisnäytteeksi (esim. neljä rinnakkaista, joista kussakin viisi vesikirppua). On pantava merkille, että testeissä, joissa eläimiä pidetään ryhmissä, mitään jälkeläistä ei voida jättää tilastollisen analyysin ulkopuolelle, jos emo kuolee epähuomiossa/vahingossa lisääntymisen alettua, ja siksi näissä tapauksissa lisääntymistuotos olisi ilmaistava elävien jälkeläisten kokonaismääränä testin alussa mukana olevia emoja kohti.

Testiaineet jaetaan testiastioihin, joita on tämän jälkeen käsiteltävä satunnaistetusti. Jollei satunnaisteta, tästä saattaa aiheutua systemaattinen virhe, joka voidaan tulkita pitoisuudesta aiheutuvaksi vaikutukseksi. Erityisesti jos koeastioita käsitellään annostelu- tai pitoisuusjärjestyksessä, jokin aikaan liittyvä tekijä, kuten työntekijän väsymys tai muu virhe, saattaa aiheuttaa voimakkaampia vaikutuksia suuremmilla pitoisuuksilla. Jos lisäksi olosuhteet testin alussa tai ympäristöolosuhteet, kuten sijoituspaikka laboratoriossa, saattavat vaikuttaa testituloksiin, olisi harkittava testin eristämistä.

Ruokinta

Puolistaattisissa oloissa tehtävässä testissä vesikirppuja olisi ruokittava mieluiten joka päivä mutta ainakin kolmesti viikossa (ts. silloin kun viljelyneste vaihdetaan). Altistuspitoisuuksien mahdollinen laimentaminen ravinnon lisäämisellä on otettava huomioon ja sitä on vältettävä mahdollisimman paljon konsentroidussa leväsuspensioissa. Jos tästä poiketaan (esim. läpivirtaustestissä), siitä olisi ilmoitettava.

Testin aikana emojen ruokavalion pitäisi koostua mieluiten seuraavien lajien (yhden tai useamman) elävistä levistä: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (aikaisemmin *Selenastrum capricornutum*) ja *Desmodesmus subspicatus* (aikaisemmin *Scenedesmus subspicatus*). Ruokavalion pitäisi perustua siihen orgaanisen hiilen (C) määrään, joka on annettava kullekin emolle. Tutkimuksissa (14) on osoitettu, että annokset 0,1–0,2 mg C/vesikirppu/vrk riittävät vesikirpulla

▼M7

siihen, että eläviä jälkeläisiä saadaan riittävä määrä, jotta testin validiteettiperusteet täyttyvät. Ravintoannos voidaan annostella joko vakionopeudella koko testin ajan tai haluttaessa voidaan alussa käyttää alhaisempaa nopeutta, jota lisätään testin aikana emojen kasvun huomioon ottamiseksi. Tällöinkin annoksen on pysyttävä samana suositellulla alueella 0,1–0,2 mg C/vesikirppu/vuorokausi koko testin ajan.

Jos käytetään muita menetelmiä (kuten leväsolujen määrä tai valon absorptio) vaaditun ravintoannoksen määrittämiseksi esimerkiksi siksi, että hiilipitoisuuden määritys on aikaa vievää, laboratorioiden on laadittava omat nomogramminsa, joista saadaan leväviljelmän hiilipitoisuus (ks. lisäys 3, ohjeet nomogrammien laatimiseksi). Nomogrammit olisi tarkistettava vähintään kerran vuodessa ja useamminkin, jos levien viljelyolosuhteet muuttuvat. On havaittu että valon absorptio on parempi menetelmä hiilipitoisuuden määrittämiseksi kuin solumäärä (15).

Vesikirpulle olisi annettava ravinnoksi konsentroitua leväsuspensiota, jotta testiastioihin lisätyn levänviljelynesteen tilavuus olisi mahdollisimman pieni. Konsentroitu levä saadaan aikaan sentrifugoimalla, jota seuraa suspendointi uudelleen vesikirppuviljelmän viljelynesteessä.

Valo

16 tuntia valoa, jonka intensiteetti on enintään 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ mitattuna astian veden pinnasta. (Jos valonmittauslaitteet on kalibroitu lux-yksikköä varten, suositeltu valonvoimakkuus 15–20 μE·m–2·s–1 vastaa suunnilleen kylmänvalkoisen valon voimakkuusaluetta 1 000–1 500 lux.)

Lämpötila

Testissä käytettävän viljelynesteen lämpötilan on oltava 18–22 °C. Lämpötila ei saisi kuitenkaan, jos mahdollista, vaihdella missään testissä enempää kuin 2 °C kyseisissä rajoissa (esim. 18–20, 19–21 tai 20–22 °C) vuorokauden vaihteluvälinä. Lämpötilan seuraamista varten voi olla tarpeen lisätä yksi testiastia.

Ilmastus

Testiastioita ei saa ilmastaa testin aikana.

Testijärjestely

Raja-annostesti

Tarvittaessa pitoisuusalueen määritystesti toteutetaan esimerkiksi siten, että siinä on viisi testikemikaalipitoisuutta ja kaksi rinnakkaisnäytettä kutakin altistusta ja kontrollia kohti. Lisätiedot testeistä, joissa käytetään samankaltaisia kemikaaleja tai kirjallisuus välittömästä toksisuudesta vesikirpuille ja/tai muille vesieliöille, voivat olla hyödyllisiä päätettäessä pitoisuusalueen määritystestissä käytettävästä konsentraatioalueesta.

Pitoisuusalueen määritystestin kesto on 21 päivää tai riittävä kesto vaikutustasojen luotettavaan ennustamiseen. Testin lopussa arvioidaan vesikirppujen lisääntyneisyys. Vanhempien määrä ja jälkeläisten esiintyminen olisi kirjattava.

Varsinainen testi

Normaalisti pitäisi olla vähintään viisi testipitoisuutta, joissa haarukoidaan vaikuttava pitoisuus (esim. EC_x) ja jotka on järjestetty geometriseen sarjaan, jonka suhdeluvun ei tulisi olla suurempi kuin 3,2. Kutakin testipitoisuutta kohden olisi tehtävä asianmukainen määrä rinnakkaisnäytteitä (ks. 24–25 kohta). Vähemmän kuin viiden pitoisuuden käyttö on perusteltava. Kemikaaleja ei saisi testata niiden

▼M7

liukoisuusrajaa suuremmassa pitoisuudessa. Ennen kokeen tekemistä on suositeltavaa harkita testimallin tilastollista voimaa ja käyttää asianmukaisia tilastollisia menetelmiä (4). Pitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

i) jos arvioidaan EC_x lisääntymisvaikutuksille, suositellaan, että käytetään niin suurta määrää pitoisuuksia, että EC_x voidaan määrittää asianmukaisella luotettavuustasolla. Käytetyissä testipitoisuuksissa pitäisi mieluiten haarukoida arvioitu EC_x siten, että EC_x löydetään interpoloimalla ekstrapoloinnin sijaan. Seuraavan tilastollisen analyysin etuna on suurempi määrä testipitoisuuksia (esim. 10) ja pienempi määrä rinnakkaisnäytteitä kustakin pitoisuudesta (esim. 5, joten astioiden kokonaismäärä pidetään vakiona) ja 10 kontrollia;

ii) kun määritetään LOEC ja/tai NOEC, testin pienimmän pitoisuuden on oltava niin pieni, ettei lisääntymistuotos tällä pitoisuudella ole merkitsevästi pienempi kuin kontrollilla. Mikäli näin ei ole, testi on toistettava vielä pienemmällä pitoisuudella;

iii) kun määritetään LOEC ja/tai NOEC, testin suurimman pitoisuuden on oltava niin suuri, että lisääntymistuotos tällä pitoisuudella on merkitsevästi pienempi kuin kontrollilla. Jos näin ei ole, testi on toistettava lisäämällä suurinta pitoisuutta, ellei suurinta edellytettyä testin pitoisuutta kroonisten vaikutusten testaukseen (eli 10 mg/l) ole käytetty testin suurimpana pitoisuutena alkutestissä.

Jos mitään vaikutuksia ei havaita suurimmassa pitoisuudessa pitoisuusalueen määritystestissä (esim. 10 mg/l) tai jos testikemikaalilla on erittäin todennäköinen alhainen toksisuusvaikutus/ei ole toksisuusvaikutusta perustuen siihen, ettei muille eliöille aiheuteta toksisuusvaikutusta, ja/tai alhainen ottotaso tai ei ollenkaan ottotasoa, lisääntymistesti voidaan tehdä raja-annostestinä käyttäen testipitoisuutena esim. 10 mg/l ja kontrollia. Altistus- ja kontrolliryhmien osalta olisi tehtävä kymmenen rinnakkaisnäytettä. Jos raja-annostesti tehdään läpivirtausjärjestelmässä, vähempi määrä rinnakkaisnäytteitä riittää. Raja-annostesti antaa mahdollisuuden osoittaa, ettei rajapitoisuudessa ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta, mutta jos vaikutukset kirjataan, tavanomaisesti vaaditaan koko testin tekemistä.

Kontrollit

Testisarjan lisäksi on määritettävä yksi viljelynestettä sisältävä kontrollisarja ja tapauksen mukaan yksi liuotinta tai dispergointiainetta sisältävä kontrollisarja. Mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuuden olisi oltava sama kuin testikemikaalia sisältävissä testiastioissa. Riittävä määrä rinnakkaisnäytteitä olisi määritettävä (ks. 23–24 kohta).

Yleensä hyvin suoritetussa testissä kontrollinäytteissä emojen tuottamien elävien jälkeläisten määrän keskiarvon vaihtelukerroin saisi olla ≤ 25 %, ja tämä olisi ilmoitettava testimalleista, joissa käytetään yksittäin kasvatettuja eläimiä.

Testissä käytettävän viljelynesteen vaihto

Viljelynesteen vaihtoväli riippuu testikemikaalin stabiiliuudesta ja se pitäisi vaihtaa vähintään kolme kertaa viikossa. Jos testikemikaalin pitoisuus alustavien testien perusteella (ks. 7 kohta) ei ole stabiili (ts. ei ole välillä 80–120 prosenttia nimellispitoisuudesta tai laskee alle 80 prosentin mitatusta alkupitoisuudesta) pisimmän hyväksytyn vaihtovälin aikana (ts. 3 vrk), olisi harkittava viljelynesteen vaihtamista useammin tai siirtymistä läpivirtaustestiin.

▼M7

Kun viljelyneste vaihdetaan puolistaattisessa testissä, valmistetaan toinen sarja testiastioita ja emovesikirput siirretään niihin esim. sopivan kokoisella lasipipetillä. Vesikirpun kanssa siirrettävän viljelynesteen tilavuuden pitäisi olla mahdollisimman pieni.

Havainnot

Testin aikana tehtyjen havaintojen tulokset olisi kirjattava testilomakkeille (ks. lisäyksen 4 ja 5 esimerkit). Jos on tehtävä muita mittauksia (ks. 44 kohta), on ehkä tehtävä lisähavaintoja.

Jälkeläiset

Kunkin emon tuottamat jälkeläiset olisi mieluiten otettava astiasta ja laskettava päivittäin ensimmäisistä jälkeläisistä lähtien, jotta ne eivät söisi emoille tarkoitettua ravintoa. Tässä testimenetelmässä tarvitsee laskea vain elävät jälkeläiset, mutta kuolleiden munien tai poikasten esiintyminen olisi kirjattava.

Kuolleisuus

Emojen kuolleisuus olisi kirjattava mieluiten päivittäin tai ainakin yhtä usein, kun poikaset lasketaan.

Muut parametrit

Vaikka tämän testimenetelmän pääasiallisena tarkoituksena on lisääntymistuotosten arviointi, on mahdollista, että muitakin vaikutuksia esiintyy siinä määrin, että ne voidaan analysoida tilastollisesti. Lisääntymistuotos elossa olevaa eläintä kohti eli testin aikana tuotettujen elävien jälkeläisten lukumäärä elossa olevaa emoa kohti, voidaan kirjata. Tätä voidaan verrata tärkeimpään vastemuuttujaan (lisääntymistuotos emoa kohti testin alkaessa, joka ei kuole epähuomiossa tai vahingossa testin aikana). Jos emojen kuolleisuus ilmenee altistetuissa rinnakkaisnäytteissä, olisi harkittava, seuraako kuolleisuus pitoisuusvastesuhdetta, eli onko vasteen regressio huomattava verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen, joka on ylöspäin nouseva (tähän voidaan käyttää tilastollista testiä, kuten Cochran-Armitagen trenditestiä). Jos kuolleisuus ei seuraa pitoisuusvastesuhdetta, rinnakkaisnäytteet, joissa emo on kuollut, pitäisi jättää testin tuloksen arvioinnin ulkopuolelle. Jos kuolleisuus seuraa pitoisuusvastesuhdetta, emojen kuolleisuus pitäisi määrittää testikemikaalin vaikutukseksi, ja rinnakkaisnäytteitä ei pitäisi jättää testituloksen arvioinnin ulkopuolelle. Kasvumittaukset ovat hyvin toivottavia, koska niistä saa mahdollisia subletaaleja vaikutuksia koskevia tietoja, jotka voivat olla hyödyllisiä lisääntymisen määrittämisen lisäksi. Emojen pituuden (ts. pituus ilman pyrstörankaa) mittausta testin lopussa suositellaan. Muita muuttujia, jotka voidaan mitata tai laskea, ovat aika ensimmäisten sikiöiden (ja myöhempien sikiöiden) tuottamiseksi, sikiöiden määrä ja koko eläintä kohti, abortoitujen sikiöiden määrä, vastasyntyneiden koiraiden esiintyvyys (OECD, 2008) tai lepomunat ja mahdollisesti populaation kasvun ominaisnopeus (määritelmistä on tietoja liitteessä 1 ja vastasyntyneiden sukupuolen tunnistamisesta liitteessä 7).

Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus

Happipitoisuus, lämpötila, veden kovuus ja pH-arvot olisi mitattava vähintään kerran viikossa sekä tuoreesta että vanhasta viljelynesteestä, kontrolleista ja testistä, jossa on suurin testikemikaalin pitoisuus.

Testin aikana testikemikaalin pitoisuus määritetään säännöllisin väliajoin.

Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä, joissa testikemikaalin pitoisuuden odotetaan pysyvän ± 20 prosentissa (ts. välillä 80–120 prosenttia) nimellispitoisuudesta (ks. 6, 7 ja 39 kohta), suurimmat ja pienimmät testissä käytetyt pitoisuudet

▼M7

määritetään tuoreista testiliuoksista ja viljelynestettä vaihdettaessa kerran ensimmäisen testiviikon aikana (ts. määritys olisi tehtävä samasta liuoksesta, kun se on tuore ja kun se vaihdetaan). Nämä määritykset olisi tehtävä tämän jälkeen uudelleen vähintään viikon välein.

Testeissä, joissa testikemikaalin pitoisuuden ei odoteta pysyvän ± 20 prosentissa nimellispitoisuudesta, on välttämätöntä määrittää testipitoisuudet sekä tuoreesta liuoksesta että liuosta vaihdettaessa. Kuitenkin jos mitattu testikemikaalin alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta jos on riittävästi näyttöä siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä viikolla 2 ja 3 ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista. Joka tapauksessa testiaineen pitoisuus tarvitsee määrittää liuosta vaihdettaessa vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullekin pitoisuudelle.

Jos kyseessä on läpivirtaustesti, samanlainen näytteenotto-ohjelma on sopiva kuin puolistaattisissa testeissä (vaikka ”vanhasta” liuoksesta ei tehdä määritystä). Voi kuitenkin olla suositeltavaa lisätä näytteenottoajankohtia ensimmäisen viikon aikana (esim. kolme määrityssarjaa) sen varmistamiseksi, että testipitoisuudet ovat pysyneet muuttumattomina. Tällaisissa testeissä laimentimen ja testikemikaalin virtausnopeus on tarkistettava päivittäin.

Jos on näyttöä siitä, että testattavan kemikaalin pitoisuus on pysynyt tyydyttävällä tavalla ± 20 prosentissa nimellispitoisuudesta tai alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulokset voivat perustua nimellispitoisuuksiin tai alkupitoisuuksiin. Jos poikkeama nimellispitoisuudesta tai alkupitoisuudesta on suurempi kuin ± 20 prosenttia, tulokset olisi ilmaistava aikapainotettuna keskiarvona (ohjeet laskentaan ks. lisäys 6).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

Testin tarkoituksena on määrittää testikemikaalin vaikutukset lisääntymistuotoksiin. Elävien jälkeläisten kokonaismäärä emojen määrää kohti olisi laskettava jokaiselle testiastialle (ts. rinnakkaisnäytteille). Lisäksi lisääntyminen voidaan laskea elossa olevan emon tuottamien elävien jälkeläisten tuotannon perusteella. Kuitenkin ekologisesti merkittävin vastemuuttuja on elävien jälkeläisten kokonaismäärä emoa kohti, joka ei kuole vahingossa ([1]) tai epähuomiossa ([2]) testin aikana. Jos jossakin rinnakkaisnäytteessä emo kuolee vahingossa tai epähuomiossa testin aikana tai osoittautuu koiraaksi, kyseinen rinnakkaisnäyte jätetään testin ulkopuolelle. Analyysi perustuu silloin pienempään määrään rinnakkaisnäytteitä. Jos emojen kuolleisuus ilmenee altistetuissa rinnakkaisnäytteissä, olisi harkittava, seuraako kuolleisuus pitoisuusvastesuhdetta, eli onko vasteen regressio huomattava verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen, joka on ylöspäin nouseva (tähän voidaan käyttää tilastollista testiä, kuten Cochran-Armitagen trenditestiä). Jos kuolleisuus ei seuraa pitoisuusvastesuhdetta, rinnakkaisnäytteet, joissa emo on kuollut, pitäisi jättää testin tuloksen arvioinnin ulkopuolelle. Jos kuolleisuus seuraa pitoisuusvastesuhdetta, emojen kuolleisuus pitäisi määrittää testikemikaalin vaikutukseksi, ja rinnakkaisia eläimiä ei pitäisi jättää testituloksen arvioinnin ulkopuolelle.

Yhteenvetona, kun LOEC/NOEC-arvoa tai EC_x-arvoa käytetään ilmaisemaan vaikutuksia, on suositeltavaa laskea lisääntymisen vaikutus käyttämällä kumpaakin edellä mainittua vastemuuttujaa, eli

([1]) Vahingossa tapahtuva kuolema: muu kuin kemikaaliin liittyvä kuolema, jonka on aiheuttanut vahinko (tunnettu syy).

([2]) Epähuomiossa tapahtunut kuolema: muu kuin kemikaaliin liittyvä kuolema, jolla ei ole tunnettua syytä.

▼M7

— elävien jälkeläisten kokonaismäärää sellaista emoa kohden, joka ei kuole vahingossa tai epähuomiossa testin aikana, ja

— elossa olevan emon tuottamien elävien jälkeläisten määrää

ja sen jälkeen käyttää lopullisena tuloksena alhaisinta LOEC/NOEC-arvoa tai EC_x-arvoa, joka lasketaan käyttämällä jompaakumpaa näistä kahdesta vastemuuttujasta.

Ennen tilastollisen analyysin käyttöä, esim. ANOVA-menettelyt, käsittelyiden vertaaminen kontrolliin Student t-testillä, Dunnettin testillä, tai alaspäin askeltavalla Jonskheere-Terpstran testillä, on suositeltavaa tarkastella tietojen muutosta tarvittaessa, jotta tietyn tilastollisen testin vaatimukset täytetään. Ei-parametrisena vaihtoehtona voidaan harkita Sunnin tai Mann-Whitneyn testejä. Yksittäisille käsittelyille lasketaan 95 prosentin luottamusväli.

Elossa olevien emojen määrä käsittelemättömissä kontrolleissa on hyväksyttävyysperuste, joten sitä on dokumentoitava ja se on ilmoitettava. Myös kaikki muut haitalliset vaikutukset, esim. epänormaali käytös ja toksikologisesti merkittävät havainnot olisi ilmoitettava loppuraportissa.

ECx

ECx-arvot, mukaan lukien niitä koskevat alhaisemmat ja ylimmät luottamusvälit, lasketaan sopivien tilastollisten menetelmien avulla (esimerkiksi logistinen funktio tai Weibullin funktio, viritetty Spearmanin ja Kärberin menetelmä tai yksinkertainen interpolointi). Jos halutaan laskea EC10, EC_{50} tai jokin muu ECx-arvo, kaikista tiedoista on tehtävä regressioanalyysi.

NOEC/LOEC

Jos tilastollisella analyysilla on tarkoitus määrittää NOEC/LOEC-arvo, asianmukaisia tilastomenetelmiä tulee käyttää ekotoksisuustietojen tilastollisessa analyysissa sovellettavia nykyisiä lähestymistapoja koskevan OECD:n asiakirjan nro 54 mukaan (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application) (4). Yleensä testikemikaalin haitallisia vaikutuksia verrattuna kontrolliin tutkitaan käyttämällä yksisuuntaista hypoteesitestausta, jossa $p \leq 0,05$.

Normaalijakauman ja varianssin homogeenisuutta voidaan testata käyttämällä sopivaa tilastollista testiä, esim. Shapiron-Wilkin testiä ja Levenen testiä, vastaavasti ($p \leq 0,05$). Yksisuuntainen ANOVA sekä tämän jälkeisiä monivertailutestejä voidaan tehdä. Monivertailuja (esimerkiksi Dunnettin testiä) tai alaspäin askeltavia trenditestejä (esimerkiksi Williamsin testiä tai Jonckheere-Terpsrtan testiä) voidaan käyttää sen laskemiseen, onko kontrollien ja testikemikaalin eri pitoisuuksien välillä merkitseviä eroja ($p \leq 0,05$) (suositellun testin valinta OECD:n ohjeasiakirjan nro 54 mukaan (4)). Muutoin NOEC- ja LOEC-arvojen määrittämisessä voidaan käyttää parametrittomia menetelmiä (esimerkiksi Bonferroni-U-testiä Holmin mukaan tai Jonckheere-Terpstran trenditestiä).

Raja-annostesti

Jos raja-annostesti (kontrollin ja vain yhden käsittelyn vertailu) on tehty ja jos parametristen testimenetelmien vaatimukset (normaalius, homogeenisuus) täyttyvät, metrisiä vasteita voidaan arvioida Studentin testillä (t-testillä). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia (kuten Welchin testi) tai parametritonta testiä, kuten Mann-Whitney-U-testiä.

Kontrollien välisten (kontrolli ja liuotinkontrolli sekä dispergointiaineen kontrolli) merkitsevien erojen määrittämiseksi jokaisen kontrollin rinnakkaisnäytteet voidaan testata raja-annoksen yhteydessä kuvatulla tavalla. Jos näissä testeissä ei havaita merkitseviä eroja, kaikki kontrollin ja liuotinkontrollin rinnakkaisnäytteet voidaan yhdistää. Muussa tapauksessa kaikkia käsittelyjä tulee vertailla liuotinkontrolliin.

▼M7

Testiraportti

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtaus.

Testilajit:

— kyseessä oleva klooni (onko genotyyppi määritetty), hankintapaikka tai alkuperä (jos se tunnetaan) sekä käytetyt viljelyolosuhteet. Jos käytetään muuta lajia kuin *Daphnia magna*, tämä on perusteltava ja ilmoitettava.

Testiolosuhteet:

— käytetty testimenetelmä (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, vesikirppujen (*Daphnia magna*) lukumäärä litrassa kokeen alussa)

— valoisa aika ja valon intensiteetti

— testin suunnittelu (esim. rinnakkaisnäytteiden määrä, emojen määrä rinnakkaisnäytettä kohti)

— käytetty viljelyneste yksityiskohtaisesti

— mahdollisesti käytetyn orgaanisen aineen koostumus, alkuperä, valmistusmenetelmä, varastovalmisteiden TOC/COD, testissä käytetyn viljelynesteen TOC/COD:n arviointi

— yksityiskohtaiset ruokintaa koskevat tiedot, mukaan lukien määrä (mg C/vesikirppu/vrk) ja esim. rehujen tyyppi, myös mahdollisten levien spesifiset nimet (lajit) ja kanta, jos ne tunnetaan, sekä viljelyolosuhteet

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja viljelynesteen vaihtotaajuus (mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen nimi ja pitoisuus on ilmoitettava).

Tulokset:

— mahdollisista alustavista kokeista saadut testikemikaalin stabiilisuutta koskevat tulokset

— nimelliset testipitoisuudet sekä tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritetään testikemikaalin pitoisuus koeastioissa (ks. tuloslomakkeet, lisäys 5); lisäksi on ilmoitettava menetelmän saantoteho sekä määritysraja

— testiastioissa käytetyn veden laatu (ts. pH, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus sekä tarvittaessa TOC ja/tai COD ja veden kovuus) (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, lisäys 4)

— täydelliset rekisterit elävien jälkeläisten tuotannosta testin aikana kutakin emoa kohti (ks. esim. annettu tuloslomake, lisäys 4)

— emojen kuolemantapausten lukumäärä ja päivämäärät (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, lisäys 4)

— lisääntymistuotoksen vaihtelukerroin (joka perustuu elävien jälkeläisten kokonaismäärään testin lopussa elossa olevaa emoa kohti)

— kuvaaja emojen tuottamien elävien jälkeläisten kokonaismäärästä kussakin rinnakkaistestissä lukuun ottamatta emoja, jotka ovat kuolleet vahingossa tai epähuomiossa testin aikana vs. testikemikaalin pitoisuus

▼M7

— tarvittaessa kuvaaja elossa olevien emojen tuottamien elävien jälkeläisten kokonaismäärästä kussakin rinnakkaistestissä vs. testikemikaalin pitoisuus

— tarvittaessa pienin havaittavan vaikutuksen pitoisuus (LOEC) lisääntymiselle, mukaan lukien kuvaus käytetyistä tilastomenetelmistä ja ilmoitus havaitun vaikutuksen suuruudesta (tämän selvittämiseksi voidaan tehdä ennen kokeen alkua voima-analyysi) ja pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) lisääntymiselle; tiedot, siitä, mitä vastemuuttujaa on käytetty laskettaessa LOEC- ja NOEC-arvoa (joko elävien jälkeläisten kokonaismäärä emoa kohti, joka ei kuollut vahingossa tai epähuomiossa testin aikana tai elävien jälkeläisten kokonaismäärä elossa olevaa emoa kohti) ja tarvittaessa ilmoitetaan LOEC- tai NOEC-arvo emojen kuolleisuudesta

— tarvittaessa EC_x lisääntymiselle, luottamusvälit (esim. 90 tai 95 prosenttia), sen laskemiseen käytetyn sovitetun mallin graafinen kuvaaja, pitoisuus-vastekäyrän kulmakerroin ja sen keskivirhe

— muut havaitut biologiset vaikutukset tai muut mittaukset: ilmoitetaan kaikki mahdolliset havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset (esim. emojen kasvu) sekä kaikki asianmukaiset perustelut

— selitykset testimenetelmästä poikkeamiseen.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20–21 March 1993.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257–265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775–782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Teoksessa: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 – 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. Teoksessa: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) s. 144–148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1–8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053–2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459–466.

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Ecx: Veteen liuotetun testikemikaalin pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin laskun vesikirpun lisääntymisessä tietyllä altistusajanjaksolla.

Emoeläimet: Naarasvesikirput, jotka ovat mukana testin alussa ja joiden lisääntymistuotos määritetään.

Epähuomiossa tapahtunut kuolema: Muu kuin kemikaaliin liittyvä kuolema, jolla ei ole tunnettua syytä.

Havaitsemisraja: Pienin pitoisuus, joka voidaan osoittaa, mutta ei mitata kvantitatiivisesti.

Jälkeläiset: Nuoret vesikirput, joita emoeläimet tuottavat testin aikana.

Kemikaali: Aine tai seos.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se ei liiku, ts. ei pysty uimaan tai sen raajoissa tai takaruumiissa ei havaita mitään liikettä sen jälkeen kun testiastiaa on ravisteltu varovasti 15 sekuntia. (Jos käytetään muuta määritelmää, se on ilmoitettava testiselosteessa ja sille on annettava lähdeviite.)

Lisääntymistuotos: Emoeläinten elävien jälkeläisten kokonaismäärä testin ajankohdalla.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): Pienin testipitoisuus, jolla kemikaalin havaitaan aiheuttavan tilastollisesti merkittävän vaikutuksen (todennäköisyystasolla $p < 0,05$) lisääntymiseen ja emokuolleisuuteen kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla. Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Määritysraja: Pienin pitoisuus, joka voidaan mitata kvantitatiivisesti.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkittävää vaikutusta (todennäköisyystasolla $p < 0,05$).

Populaation ominaiskasvunopeus: Populaation kasvu, jossa yhdentyvät lisääntyminen ja ikäspesifinen kuolleisuus (1) (2) (3). Dynaamisessa tasapainossa olevassa populaatiossa ominaiskasvu on nolla. Suurenevissa populaatioissa se on positiivinen ja pienenevissä negatiivinen. Negatiivinen arvo johtaa luonnollisesti lopulta populaation häviämiseen.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

Vahingossa tapahtuva kuolema: Muu kuin kemikaaliin liittyvä kuolema, jonka on aiheuttanut vahinko (tunnettu syy).

Lähdekirjallisuus

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, s. 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

▼M7

Lisäys 2

KEMIALLISESTI MÄÄRITELTYJEN ELENDT M7- JA M4-VILJELYNESTEIDEN VALMISTUS

Totuttaminen Elendt M7- ja M4-viljelynesteeseen

Joissakin laboratorioissa on ollut vaikeuksia, kun ne ovat siirtäneet vesikirput suoraan M4- (1) tai M7-viljelynesteeseen. Siirto onnistuu paremmin totuttamalla vesikirput asteittain uuteen viljelynesteeseen: ensin siirretään entisestä viljelynesteestä 30-prosenttiseen, sitten 60-prosenttiseen ja lopulta 100-prosenttiseen Elendt-viljelynesteeseen. Totuttamisvaiheen pitää mahdollisesti olla jopa kuukauden pituinen.

Valmistaminen

Mineraalit

Ensin valmistetaan erilliset varastoliuokset (I) yksittäisistä mineraaleista sopivan puhtaaseen (esim. deionisoituun, tislattuun tai käänteisosmoosilla puhdistettuun) veteen. Näistä eri varastoliuoksista (I) valmistetaan yksi ainoa varastoliuos (II), jossa on kaikkia hivenaineita (yhdistetty liuos), ts.:

Varastoliuokset I (yksi aine)	Veteen lisätty määrä	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) -kertainen	Valmistettaessa yhdistettyä varastoliuosta II lisätään veteen seuraavat määrät varastoliuoksia I	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000-kertainen	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-kertainen	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-kertainen	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-kertainen	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-kertainen	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-kertainen	1,0	0,25
Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-kertainen	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-kertainen	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-kertainen	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-kertainen	1,0	1,0
KI	65	20 000-kertainen	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-kertainen	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-kertainen	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-kertainen	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-kertainen	—	—
Sekä Na_2EDTA- että $FeSO_4$-liuokset valmistetaan erikseen, yhdistetään ja autoklavoidaan välittömästi. Tuloksena on:				
Fe-EDTA-liuos		1 000	20,0	5,0

▼**M7**

M4- ja M7-viljelyneste

M4- ja M7-viljelynesteet valmistetaan käyttäen kantaliuosta II, makroravinteita ja vitamiineja seuraavasti:

	Veteen lisätty määrä	Pitoisuus (M4-viljelynesteessä) -kertainen	Viljelynesteen valmistamiseen tarvittava varastoliuoksen määrä	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Kantaliuos II (yhdistetyt hivenaineet)		20-kertainen	50	50
Makroravinteiden varastoliuos (yksittäisiä aineita)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-kertainen	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-kertainen	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-kertainen	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-kertainen	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-kertainen	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-kertainen	0,1	0,1
Yhdistetty vitamiinien kantaliuos	—	10 000-kertainen	0,1	0,1

Yhdistetty vitamiinien kantaliuos valmistetaan lisäämällä kaikkia kolmea vitamiinia 1 litraan vettä seuraavasti:

	mg/l			
Tiamiinihydrokloridi	750	10 000-kertainen		
Syaani-kobalamiini (B_{12})	10	10 000-kertainen		
Biotiini	7,5	10 000-kertainen		

Yhdistetty vitamiinien kantaliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä. Vitamiinit lisätään viljelynesteeseen vähän ennen käyttöä.*Huom.*
Jotta suolat eivät saostuisi lopullista viljelynesteliuosta valmistettaessa, kantaliuokset lisätään 500–800 ml:aan deionisoitua vettä ja täytetään sitten 1 litraksi.

Huom. M4-viljelynesteen kokoonpanoa koskeva ensimmäinen julkaisuviite on Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M7

Lisäys 3

ORGAANISIIN YHDISTEISIIN SITOUTUNEEN HIILEN KOKONAISMÄÄRÄN (TOC) MÄÄRITYS JA NOMOGRAMMIN LAATIMINEN LEVÄREHUN TOC-PITOISUUDELLE

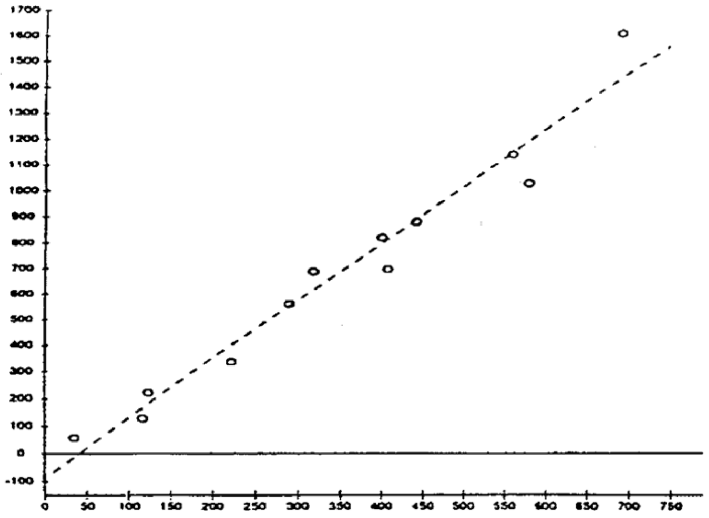
Levärehun hiilipitoisuutta ei tunnetusti mitata suoraan, vaan se määritetään korvaavilla menetelmillä kuten levysolujen määrän tai valon absorption perusteella laadittujen nomogrammien avulla.

TOC olisi mitattava mieluummin korkeassa lämpötilassa tapahtuvan oksidaation avulla kuin UV- tai persulfaattimenetelmällä. (Ks. ohjeeksi: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Nomogrammin laatimista varten levät olisi erotettava viljelynesteestä sentrifugoimalla, jonka jälkeen ne suspendoidaan uudelleen tislattuun veteen. Korvaava muuttuja ja TOC-pitoisuus määritetään kustakin näytteestä (kolme rinnakkaista). Tislattuun veteen perustuvat nollanäytteet määritetään ja niiden TOC-pitoisuus vähennetään levänäytteen TOC-pitoisuudesta.

Nomogrammien olisi oltava lineaarisia tarvittavalla hiilipitoisuusalueella. Jäljempänä annetaan esimerkkejä:

Huom. Näitä nomogrammeja ei saisi käyttää muuntamiseen. Jokaisen laboratorion on laadittava omat nomogrammit.



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

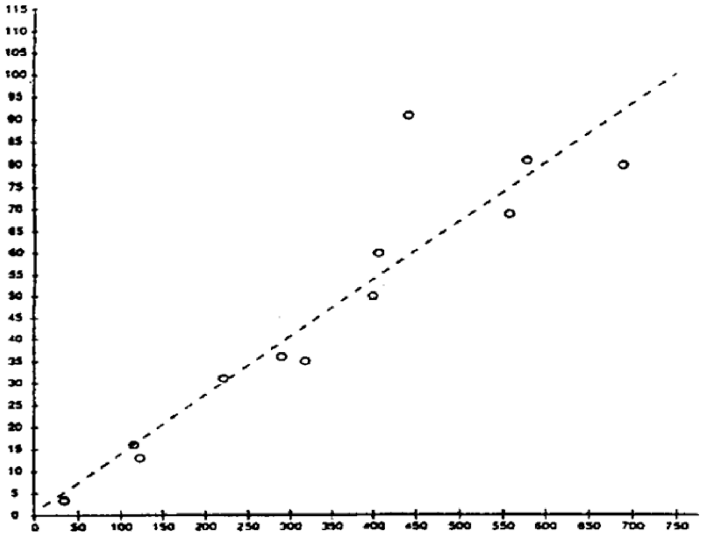
Regressiokuvaaja, mg/l kuivapaino vs. mg C/l. Mittaustiedot tislattuun veteen uudelleen suspendoitujen puolijatkuvasti erissä viljeltyjen solujen konsentroiduista suspensioista.

x-akseli: mg C/l konsentroitua levärehua

y-akseli: mg/l konsentroidun levärehun kuivapainoa

Korjauskerroin -0,980

▼**M7**



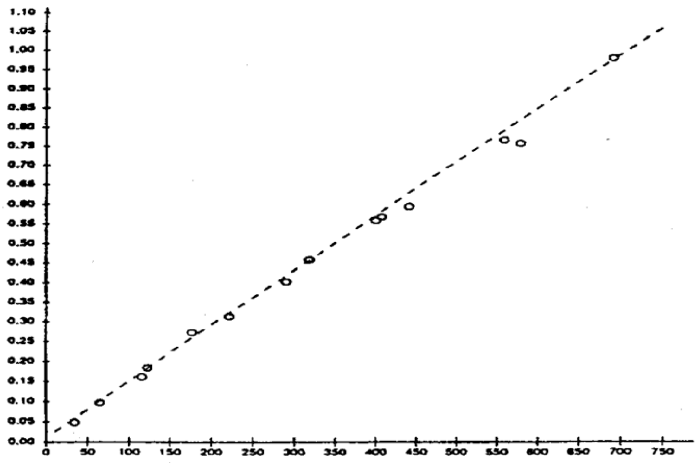
Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Regressiokuvaaja, solumäärä vs. mg C/l. Mittaustiedot tislattuun veteen uudelleen suspendoitujen puolijatkuvasti erissä viljeltyjen solujen konsentroiduista suspensioista.

x-akseli: mg C/l konsentroitua levärehua

y-akseli: solujen lukumäärä/1 konsentroitua levärehua

Korjauskerroin -0,926



Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12).

Valon absorption regressio mg C/1 (1 senttimetrin valotiellä). Mittaustiedot tislattuun veteen uudelleen suspendoitujen puolijatkuvasti erissä viljeltyjen solujen konsentroiduista suspensioista.

x-akseli: mg C/l konsentroitua levärehua

y-akseli: konsentroidun levärehun 1/10-laimennoksen absorbanssi aallonpituudella 440 nm

Korjauskerroin – 0,998

▼M7

Lisäys 4

ESIMERKKI LOMAKKEESTA, JOHON KIRJATAAN VILJELYNESTEEN VAIHDOT, FYSIKAALISET JA/TAI KEMIALLISET SEURANTATIEDOT, RUOKKIMINEN, VESIKIRPUN LISÄÄNTYMINEN JA EMOKUOLLEISUUS

Koe nro:	Aloituspvm:						Klooni:			Aine:				Ravintotyyppi:				Testikemikaali:					Nimellispitoisuus:	
Päivä	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Viljelynesteen vaihto (rasti)																								
pH (*)																							uusi	
																							vanha	
O_2 (mg/l) (*)																							uusi	
																							vanha	
Lämpötila (°C) (*)																							uusi	
																							vanha	
Ruokkiminen (rasti)																								
Elävien jälkeläisten määrä (**)																								Yhteensä
Astia 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — FI — 16.10.2019 — 008.001 — 1825

▼M7

Koe nro:	Aloituspvm:						Klooni:			Aine:				Ravintotyyppi:				Testikemikaali:					Nimellispitoisuus:	
Päivä	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Yhteensä	
Kumulatiivinen emokuolleisuus (***)																								

(*) Ilmoitettava, mitä astiaa käytettiin kokeeseen
(**) Abortoidut sikiöt kirjataan merkinnällä ”AB” asianomaiseen ruutuun
(***) Kuolleet aikuiset kirjataan merkinnällä ”M” asianomaiseen ruutuun

▼**M7**

Lisäys 5

ESIMERKKI LOMAKKEESTA, JOHON KIRJATAAN KEMIALLISTEN MÄÄRITYSTEN TULOKSET

(a) **Mitatut pitoisuudet**

Nimellispitoisuus	Viikon 1 näyte		Viikon 2 näyte		Viikon 3 näyte	
	tuore	vanha	tuore	vanha	tuore	vanha

(b) **Mitatut pitoisuudet prosentteina nimellisarvoista**

Nimellispitoisuus	Viikon 1 näyte		Viikon 2 näyte		Viikon 3 näyte	
	tuore	vanha	tuore	vanha	tuore	vanha

▼M7

Lisäys 6

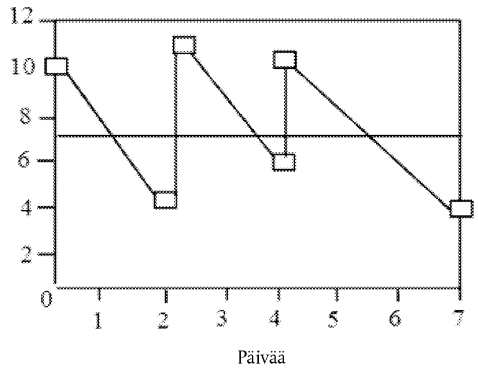
AIKAPAINOTETUN KESKIARVON LASKEMINEN

Aikapainotettu keskiarvo

Koska testikemikaalin pitoisuus voi laskea viljelynesteen vaihtojen välillä, on harkittava, mikä pitoisuus olisi valittava edustamaan sitä pitoisuusaluetta, jossa emovesikirppu on elänyt. Valinnan pitäisi perustua sekä biologisiin että tilastollisiin näkökohtiin. Jos esimerkiksi oletetaan, että lisääntymiseen vaikuttaa lähinnä huippupitoisuus, olisi käytettävä suurinta pitoisuutta. Jos taas oletetaan, että myrkyllisen kemikaalin kerääntynyt tai pitkän aikavälin vaikutus on tärkeämpi, keskipitoisuus sopii paremmin. Silloin käytettäväksi sopiva asianmukainen keskiarvo on aikapainotettu keskipitoisuus, koska siinä otetaan huomioon hetkellisten pitoisuuksien vaihtelu ajan funktiona.

Kuva 1

Esimerkki aikapainotetusta keskiarvosta



Kuvassa 1 on (yksinkertaistettu) esimerkki testistä, joka kestää seitsemän päivää ja jossa viljelyneste vaihdetaan päivinä 0, 2 ja 4.

— Ohut sahaviiva kuvaa pitoisuutta eri ajankohtina. Pitoisuuden laskun oletetaan noudattavan eksponentiaalista hajoamisprosessia.

— Kuusi kuvaajaan merkittyä pistettä edustavat havaittuja pitoisuuksia, jotka on mitattu kunkin vaihtoperiodin alussa ja lopussa.

— Paksu yhtenäinen viiva esittää aikapainotetun keskiarvon sijaintia.

Aikapainotettu keskiarvo lasketaan siten, että aikapainotetun keskiarvon kuvaajan alle jäävä pinta-ala on yhtä suuri kuin pitoisuuskäyrän alle jäävä pinta-ala. Edellä olevaa esimerkkiä varten tehty laskutoimitus kuvataan taulukossa 1.

Taulukko 1

Aikapainotetun keskiarvon laskeminen

Uudista-minen Nro	Päiviä	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pinta-ala
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼M7

Uudista-minen Nro	Päiviä	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pinta-ala
Päivien kokonais-määrä:	7				Kokonais-pinta-ala:	50,092
					Aikapaino-tettu keskiarvo:	7,156

”Päiviä” on vaihtojen välissä olevien päivien määrä

”Conc 0” on kunkin vaihtoperiodin alussa mitattu pitoisuus

”Conc 1” on kunkin vaihtoperiodin lopussa mitattu pitoisuus

”Ln(Concs 0)” on Conc 0:n luonnonlogaritmi

”Ln(Concs 1)” on Conc 1:n luonnonlogaritmi

”Pinta-ala” on kutakin vaihtoperiodia vastaavan eksponentiaalisen käyrän alle jäävä pinta-ala Se lasketaan seuraavasti:

$$Pinta - ala = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Aikapainotettu keskiarvo (*TW Mean*) on kokonaispinta-ala (*Total Area*) jaettuna päivien kokonaismäärällä (*Total Days*).

Vesikirpun lisääntymistestiä varten taulukon on tietysti katettava 21 päivää.

On selvää, että kun havaintoja tehdään vain kunkin vaihtoperiodin alussa ja lopussa, ei voida olla varmoja siitä, että hajoaminen on todella eksponentiaalista. Erilaisesta käyrästä olisi seurauksena erilainen pinta-ala. Eksponentiaalinen hajoamisprosessi ei kuitenkaan ole epätodennäköinen, ja sitä kuvaava käyrä on todennäköisesti paras, jota voidaan käyttää, kun muuta tietoa ei ole.

On kuitenkin esitettävä varoitus siltä varalta, että kemiallisessa määrityksessä ei havaita kyseistä kemikaalia lainkaan vaihtoperiodin lopussa. Ellei voida arvioida, kuinka nopeasti kemikaali on hävinnyt liuoksesta, on mahdotonta saada todenmukaista pinta-alaa käyrän alle ja myös mahdotonta määrittää järkevää aikapainotettua keskiarvoa.

▼M7

Lisäys 7

OHJEET VASTASYNTYNEEN SUKUPUOLEN TUNNISTAMISEKSI

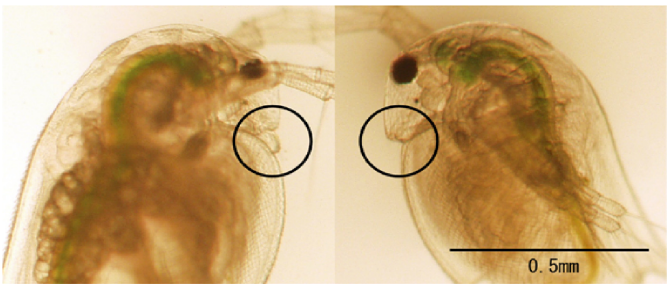
Vastasyntyneiden koiraiden tuotantoa voi esiintyä muuttuvissa ympäristöolosuhteissa, kuten lyhennetty valoisa aika, lämpötila, ravinnon pitoisuuden vähentäminen ja populaatiotiheyden lisääminen (Hobaek and Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992) Koiraiden tuotanto on myös tunnettu vaste tietyille hyönteisten kasvunsääteille (Oda *et al*., 2005). Olosuhteissa, joissa kemialliset stressitekijät aiheuttavat partenogeeneettisten naaraiden lisääntymiskykyisten jälkeläisten vähentymistä, koiraiden määrän odotetaan lisääntyvän (OECD, 2008). Käytettävissä olevien tietojen perusteella ei ole mahdollista ennustaa, mikä sukupuolten suhde tai lisääntymisen päätepiste on herkempi; on kuitenkin viitteitä siitä (viite ”validaatioraportti”, osa 1), että tämä koirasten määrän kasvu voi olla vähemmän herkkä kuin jälkeläisten vähentyminen. Koska tämän testimenetelmän pääasiallinen tarkoitus on arvioida tuotettujen jälkeläisten määrä, koirasten ilmaantuminen on valinnainen havainto. Jos tätä valinnaista päätepistettä arvioidaan tutkimuksessa, olisi sovellettavaa täydentävää testin validiteettiperustetta, jonka mukaan kontrollissa olisi käytettävä enintään 5 prosenttia koiraita.

Käytännöllisin ja helpoin tapa erottaa vesikirpun sukupuoli on käyttää fenotyyppisiä ominaisuuksia, koska koiraat ja naaraat ovat geneettisesti identtisiä ja niiden sukupuolen määrää ympäristö. Koiraat ja naaraat ovat eri pituisia ja niiden ensimmäisillä tuntosarvilla on eri morfologia, koiraiden ovat pidemmät kuin naaraiden (kuva 1). Tämä ero on tunnistettavissa heti syntymän jälkeen, vaikka muut toissijaiset sukupuoliominaisuudet kehittyvät iän myötä (ks. esim. kuva 2, Olmstead and LeBlanc, 2000).

Morfologisen sukupuolen havainnointia varten kunkin koe-eläimen tuottamat vastasyntyneet olisi siirrettävä pipetillä ja asetettava petrimaljaan viljelynesteen kanssa. Viljelyneste pidetään minimissä eläinten liikkumisen hillitsemiseksi. Ensimmäisiä tuntosarvia koskevat havainnoinnit voidaan tehdä stereomikroskoopilla (× 10–60).

Kuva 1

24 tuntia vanha vesikirppukoiras (vasemmalla) ja vesikirppunaaras (oikealla). Koiraat voidaan erottaa naaraista pituuden ja niiden ensimmäisten tuntosarvien morfologian perusteella, kuten esitetään ympyröissä (Tatarazako *et al*., 2004).



VIITTEET

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255–2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197–206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168–1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19: 2107–2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439–449.

▼B

C.21. MAAPERÄN MIKROBIT: TYPEN MUUNTUMISTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 216 (2000).

1.1 JOHDANTO

Tämän menetelmän tarkoitus on tutkia laboratoriomenetelmin kemikaalien pitkäaikaisvaikutuksia maaperän mikrobien typpeä muuntavaan toimintaan (typen transformaatioon) kerta-altistuksen jälkeen. Menetelmä perustuu pääosin EPPO:n (Euroopan ja Välimeren maiden kasvinsuojelujärjestön) (1) suosituksiin. Myös muita, esimerkiksi Saksan Biologische Bundesanstaltin (2), Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston (3), SETACin (4) ja Kansainvälisen standardisoimisjärjestön (5) laatimia ohjeita on otettu huomioon. Menetelmässä käytettävien maanäytteiden määrästä ja tyypistä on sovittu maalajin ja sedimentin valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmässä, joka kokoontui Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 (6). Maanäytteiden keräämiseen, käsittelyyn ja varastointiin liittyvät suositukset perustuvat ISO:n ohjeisiin (7) sekä Belgiraten työryhmän suosituksiin. Testiaineiden toksisten ominaisuuksien arvioinnin yhteydessä voi olla tarpeen määrittää niiden vaikutukset maaperän mikrobien toimintaan, esimerkiksi kun tarvitaan tietoja kasvinsuojeluaineiden mahdollisista sivuvaikutuksista maaperän pieneliöstöön tai kun on odotettavissa maaperän mikrobien altistuminen muille kemikaaleille kuin kasvinsuojeluaineille. Typen muuntumistestin avulla voidaan määrittää kyseisten kemikaalien vaikutukset maaperän pieneliöstöön. Jos testattavat aineet ovat maatalouskemikaaleja (esimerkiksi kasvinsuojeluaineita, lannoitteita tai metsätalouskemikaaleja), on tehtävä sekä typen että hiilen muuntumistestit. Jos testattavat aineet ovat muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, pelkkä typen muuntumistesti riittää. Mikäli kyseisten kemikaalien typen muuntumistestistä saadut EC_{50}-arvot ovat kaupallisissa nitrifikaatiota estävissä aineissa (esimerkiksi nitrapyriini) esiintyvällä alueella, hiilen muuntumistesti voidaan tehdä lisätietojen saamiseksi.

Maaperä muodostuu elävästä ja elottomasta aineesta, joka esiintyy erilaisina, heterogeenisina seoksina. Mikrobeilla on tärkeä osuus viljavien maannosten orgaanisen aineen hajottamisessa ja muuttamisessa, ja monet eliölajit vaikuttavat maannoksen viljavuuden eri tekijöihin. Kaikki pitkäaikaiset vaikutukset näihin biokemiallisiin prosesseihin saattavat muuttaa ravinnekiertoa, jolloin maannoksen viljavuus saattaa muuttua. Hiilen ja typen muuntuminen tapahtuu kaikissa viljavissa maannoksissa. Vaikka nämä prosessit aiheuttava mikrobiyhteisö on erilainen eri maalajeissa, muuntumisreitit ovat olennaisilta osin samat.

Tässä kuvatun menetelmän tarkoitus on osoittaa testiaineen pitkäaikaiset haittavaikutukset typen muuntumisprosessiin aerobisissa pintamaissa. Menetelmän avulla voidaan myös arvioida aineiden vaikutusta maaperän pieneliöstön aiheuttamaan hiilen muuntumiseen. Nitraatin muodostuminen tapahtuu hiili-typpisidosten hajoamisen jälkeen. Jos siis nitraatin tuotannon havaitaan olevan samalla tasolla käsitellyissä maanäytteissä ja kontrollinäytteissä, on hyvin todennäköistä, että pääasialliset hiilisidosten hajoamisreitit toimivat hyvin. Menetelmässä käytettävän kasvualustan (jauhettu sinimailasseos) hiili-typpisuhde on edullinen (yleensä 12/1-16/1). Tästä syystä hiilen puute ei ole merkittävää testin aikana, ja jos kemikaali vahingoittaa mikrobiyhteisöjä, ne saattavat toipua 100 päivän kuluessa.

▼B

Tämän menetelmän perustana olevat testit ovat olleet tarkoitettuja pääasiassa aineille, joiden maaperään päätyvä määrä on ennakoitavissa. Tällaisia aineita ovat esimerkiksi kasvinsuojeluaineet, sillä niiden annostelu pellolle tiedetään. Maataloudessa käytettävien kemikaalien kohdalla riittää, kun testataan kaksi annostasoa oletetun annostelutiheyden mukaan. Maataloudessa käytettävien kemikaalien osalta voidaan testata tehoaine tai kaupallinen valmiste. Tässä esitetyn menetelmän soveltamisala ei kuitenkaan rajoitu maataloudessa käytettäviin kemikaaleihin. Muuttamalla sekä maaperään annosteltavan testiaineen määrää että tulosten arviointia menetelmällä voidaan testata myös sellaisia kemikaaleja, joiden maaperään päätyvästä määrästä ei ole tietoa. Muista kuin maataloudessa käytettävistä kemikaaleista määritetään useiden konsentraatioiden vaikutukset typen muuntumiseen. Testitulosten perusteella laaditaan annos-vastekäyrä ja lasketaan EC_x-arvot, joissa x on määritelty vaikutus prosentteina.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Typen muuntuminen: mikrobien toiminnan tuloksena ammonifikaatio- ja nitrifikaatioprosessin kautta tapahtuva, typpeä sisältävän orgaanisen aineen lopullinen hajoaminen vastaavaksi epäorgaaniseksi lopputuotteeksi, nitraatiksi.

EC_X (efektiivinen konsentraatio): maaperässä esiintyvä testiaineen konsentraatio, joka estää typen muuntumista nitraatiksi x prosentilla.

EC_{50} **(efektiivinen mediaanikonsentraatio):** maaperässä esiintyvä testiaineen konsentraatio, joka estää typen muuntumista nitraatiksi 50 prosentilla.

1.3 VERTAILUAINE

Ei käytössä.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Seulottua maa-ainesta parannetaan jauhetulla kasviseoksella, ja se joko käsitellään testiaineella tai jätetään käsittelemättä (kontrollinäyte). Maataloudessa käytettäviä kemikaaleja testattaessa suositellaan käytettäväksi vähintään kahta testikonsentraatiota, ja ne tulee valita suhteessa suurimpaan konsentraatioon, jonka odotetaan esiintyvän kentällä. Näytteitä inkuboidaan, päivinä 0, 7, 14 ja 28 käsitellyt näytteet ja kontrollinäytteet uutetaan sopivaan liuottimeen, ja uutteista määritetään nitraattimäärät. Nitraatinmuodostuksen nopeutta käsitellyissä näytteissä verrataan vastaavaan nopeuteen kontrollinäytteissä ja käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden välinen prosentuaalinen ero lasketaan. Kaikkia testejä jatketaan vähintään 28 päivän ajan. Jos päivänä 28 käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden välinen ero on 25 % tai enemmän, mittauksia jatketaan (enintään 100 päivään asti). Jos testattavana on muu kuin maataloudessa käytettävä kemikaali, maanäytteisiin lisätään sarja testiaineen konsentraatioita ja muodostuneen nitraatin määrä mitataan käsitellyistä näytteistä ja kontrollinäytteistä 28 päivän inkubaation jälkeen. Useita konsentraatioita käyttäneiden testien tulokset analysoidaan regressiomallia käyttäen ja EC_x-arvot lasketaan (EC_{50}, EC_{25} ja/tai EC_{10}). Katso kohta Määritelmät.

1.5 TESTIN VALIDITEETTI

Maataloudessa käytettävien kemikaalien testitulosten arviot perustuvat suhteellisen pieniin eroihin (esimerkiksi keskiarvo ± 25 %) käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden nitraattikonsentraatioiden välillä, joten kontrollinäytteiden suuri vaihtelu voi johtaa virheellisiin tuloksiin. Tästä syystä rinnakkaisten kontrollinäytteiden välisen vaihtelun tulisi olla alle ± 15 %.

▼B

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Laitteet**

Testissä käytetään säiliöitä, jotka on valmistettu kemiallisesti inertistä materiaalista. Säiliöiden koon tulee sopia maanäytteiden inkubaatiomenettelyyn (joko massana tai sarjana erillisiä maanäytteitä, katso kohta 1.7.1.2). On syytä varmistaa, että veden haihtuminen testin aikana on minimaalista ja kaasujen vaihtuminen on mahdollista (testisäiliö voidaan esimerkiksi peittää rei'itetyllä polyetyleenikalvolla). Testattaessa helposti haihtuvia aineita tulee käyttää kannellisia ja kaasutiiviitä säiliöitä. Niiden koon tulisi olla sellainen, että maanäyte täyttää noin neljäsosan niiden tilavuudesta.

Testissä käytetään seuraavia tavanomaisia laboratoriovälineitä:

— sekoituslaite: mekaaninen ravistin tai vastaava laite,

— sentrifugi (3 000 g) tai suodatin (käytetään nitraattia sisältämätöntä suodatinpaperia),

— nitraattianalyysia varten riittävän herkkä mittalaite, jonka mittaustulos on toistettavissa.

1.6.2 **Testattavien maalajien valinta ja määrä**

Testissä käytetään yhtä maalajia. Näytteeksi valittavan maannoksen suositeltavat ominaisuudet ovat seuraavat:

— hiekkapitoisuus: vähintään 50 % ja enintään 75 %,

— pH: 5,5 - 7,5,

— orgaanisen hiilen pitoisuus: 0,5 - 1,5 %

— mikrobibiomassa mitataan (8)(9), ja sen hiilipitoisuuden tulee olla vähintään 1 % maaperän orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta.

Useimmissa tapauksissa tällainen maannos edustaa pahinta mahdollista tapausta, koska testiaineen adsorboituminen on minimaalista ja sen saatavuus pieneliöstölle maksimaalista. Tämän takia ei yleensä ole tarpeen testata muita maalajeja. Kuitenkin joissain olosuhteissa, esimerkiksi kun testiainetta ennakoidaan käytettäväksi ennen kaikkea happamien metsämaiden tapaisissa maannoksissa tai kun kemikaali on elektrostaattisesti varautunut, voi olla tarpeen käyttää testissä myös toista maalajia.

▼B

1.6.3 **Maanäytteiden kerääminen ja varastointi**

1.6.3.1 *Kerääminen*

Käytettävissä tulisi olla yksityiskohtaiset tiedot näytteenkeräyspaikan historiasta. Näitä tietoja ovat tarkka paikka, kasvipeite, kasvinsuojeluainekäsittelyjen päivämäärät, käsittelyt orgaanisilla ja epäorgaanisilla lannoitteilla, biologisten materiaalien lisäykset tai satunnaiset saastumiskerrat. Näytteenkeräyspaikaksi valitun paikan tulisi olla pitkäaikainen. Sopivia paikkoja ovat jatkuvasti laidunmaana käytettävät alueet, vuosittain korjattavien viljakasvien (paitsi maissin) pellot tai tiheään kylvetyt viherkesannot. Näytteenottopaikaksi soveltuu alue, jota ei ole käsitelty kasvinsuojeluaineilla vähintään vuoteen ennen näytteenottoa. Soveltuvalla alueella ei myöskään ole käytetty orgaanista lannoitetta vähintään kuuteen kuukauteen. Mineraalilannoitteiden käyttö on hyväksyttävää vain silloin, kun se on viljeltävän kasvin vaatimusten mukaista, ja maanäytteet voidaan tällöin ottaa vasta vähintään kolmen kuukauden kuluttua lannoitteen käytöstä. Näytteiden ottamista maasta, jota on käsitelty biosidin tavoin vaikuttavalla lannoitteella (esimerkiksi kalsiumsyanamidilla), tulisi välttää.

Näytteenottoa tulisi välttää pitkien (yli 30 päivää) kuivien tai vedellä kyllästymisjaksojen aikana tai välittömästi niiden jälkeen. Auratuilla mailla näytteet on otettava 0-20 cm:n syvyydestä. Nurmimailla (laitumilla) tai muilla maa-alueilla, joita ei aurata pitkään aikaan (vähintään yhteen kasvukauteen), näytteenoton enimmäissyvyys voi olla hiukan yli 20 cm (esimerkiksi 25 cm).

Maanäytteet tulee kuljettaa säiliöissä ja sellaisessa lämpötilassa, jossa maanäytteen alkuperäiset ominaisuudet eivät muutu merkittävästi.

1.6.3.2 *Varastointi*

Käytetyn maa-aineksen on mahdollisuuksien mukaan oltava äskettäin maasta otettua. Jos varastointi on välttämätöntä, maanäytteet voidaan varastoida pimeässä 4 (±2) C:n lämpötilassa enintään kolmen kuukauden ajan. Näytteiden varastoinnin aikana on varmistettava, että olosuhteet ovat aerobiset. Jos näytteet on kerätty alueilta, joilla maaperä on jäässä vähintään kolme kuukautta vuodesta, varastointi kuuden kuukauden ajan - 18 — - 22 ^{o}C:n lämpötilassa voi tulla kysymykseen. Varastoitavien näytteiden mikrobibiomassa mitataan ennen kutakin koetta. Biomassan hiilipitoisuuden tulee olla vähintään 1 % näytteen orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta (katso kohta 1.6.2).

1.6.4 **Näytteiden käsittely ja valmistelu testiä varten**

1.6.4.1 *Esi-inkubaatio*

Jos näytettä on varastoitu (katso kohta 1.6.3.2), suositellaan sen esi-inkuboimista 2-28 päivän ajan. Esi-inkubaation aikana näytteen lämpötilan ja kosteuspitoisuuden tulisi olla samanlaiset kuin testissä käytetyt (katso kohdat 1.6.4.2 ja 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Fysiko-kemialliset ominaisuudet*

Näytteestä puhdistetaan manuaalisesti suuret hiukkaset (esimerkiksi kivet ja kasvinosat), minkä jälkeen se märkäseulotaan liikaa kuivaamatta 2 mm:n tai tätä pienempään raekokoon. Näytteen kosteuspitoisuus tulee säätää tislatulla tai ionipuhdistetulla vedellä 40-60 %:iin maksimaalisesta vedenpidätyskyvystä.

1.6.4.3 *Parannus orgaanisella substraatilla*

Maanäytettä tulee parantaa sopivalla orgaanisella substraatilla, esimerkiksi jauhetulla sinimailas-ruohoseoksella (pääaineksena *Medicago sativa),* jonka hiili-typpisuhde on 12/1-16/1. Suositeltu sinimailasen ja maa-aineksen suhde on 5 g sinimailasta yhteen kiloon maa-ainesta (kuivapaino).

1.6.5 **Testiaineen valmistelu näytteeseen annostelua varten**

Testiaine annostellaan tavallisesti kantaja-aineen avulla. Kantaja-aineena voi olla vesi (vesiliukoisten testiaineiden tapauksessa) tai inertti kiintoaine, kuten hieno kvartsihiekka (raekoko 0,1 - 0,5 mm). Muita nestemäisiä kantaja-aineita kuin vettä (esimerkiksi orgaanisia liuottimia, kuten asetonia ja kloroformia) tulee välttää, koska ne saattavat vahingoittaa pieneliöstöä. Jos kantaja-aineena käytetään hiekkaa, se voidaan pinnoittaa testiaineella, joka on liuotettu tai suspendoitu sopivaan liuottimeen. Tällaisissa tapauksissa liuotin tulee poistaa haihduttamalla ennen kuin kantaja-aine sekoitetaan maa-ainekseen. Jotta testiaine leviäisi näytteessä optimaalisesti, suositellaan suhteeksi 10 g hiekkaa yhtä näytteen kuivapainokiloa kohti. Kontrollinäytteet käsitellään vastaavalla määrällä pelkkää vettä ja/tai kvartsihiekkaa.

Testattaessa helposti haihtuvia kemikaaleja tulisi mahdollisuuksien mukaan välttää aineen hävikkiä käsittelyn aikana ja pyrkiä varmistamaan aineen tasainen leviäminen näytteeseen (esimerkiksi ruiskuttamalla testiaine näytteeseen useisiin kohtiin).

1.6.6 **Testikonsentraatiot**

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee käyttää ainakin kahta konsentraatiota. Pienemmän konsentraation tulee kuvastaa vähintään testiaineen käytännössä maaperään pääsevää maksimimäärää, ja suuremman konsentraation puolestaan tulee olla pienemmän kerrannainen. Maanäytteeseen lisättävät testiaineen konsentraatiot lasketaan olettaen, että aine imeytyy tasaisesti 5 cm:n syvyyteen ja että maamassan tiheyden arvo on 1,5. Testattaessa maataloudessa käytettäviä, suoraan maaperään annosteltavia kemikaaleja tai kemikaaleja, joiden maaperään pääsevä määrä on ennakoitavissa, suositeltavat testikonsentraatiot ovat suurin odotettavissa oleva konsentraatio ympäristössä (Predicted Environmental Concentration, PEC) sekä mainittu konsentraatio kerrottuna viidellä. Testattaessa aineita, joita ennakoidaan annosteltaviksi maaperään useita kertoja kasvukaudessa, testikonsentraatio tulee johtaa kertomalla odotettavissa oleva ympäristössä havaittava enimmäiskonsentraatio ennakoitujen annostelukertojen määrällä. Suurin testikonsentraatio ei kuitenkaan saa olla suurempi kuin kymmenen kertaa suurin yksittäinen annos. Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee testissä käyttää vähintään viiden konsentraation geometrista sarjaa. Valittujen testikonsentraatioiden tulee kattaa EC_x-arvojen määrittämiseksi tarvittava alue.

▼B

1.7 TESTIN SUORITUS

1.7.1 **Altistusolosuhteet**

1.7.1.1 *Testinäytteet ja kontrollinäytteet*

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäyte jaetaan kolmeen samanpainoiseen osaan. Kahteen osaan sekoitetaan testiaineen sisältävää kantaja-ainetta ja kolmanteen sekoitetaan kantaja-ainetta, joka ei sisällä testiainetta (kontrollinäyte). On suositeltavaa käyttää vähintään kolmea rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä. Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäyte jaetaan kuuteen samanpainoiseen osaan. Viiteen osaan sekoitetaan testiaineen sisältävää kantaja-ainetta ja kuudenteen sekoitetaan kantaja-ainetta, joka ei sisällä testiainetta. On suositeltavaa käyttää kolmea rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä. Testiaineen tasainen leviäminen testinäytteisiin tulee varmistaa. Sekoittamisen aikana on vältettävä näytteen tiivistämistä tai muotoutumista palloksi.

1.7.1.2 *Maanäytteiden inkubointi*

Maanäytteiden inkubointi voidaan toteuttaa kahdella tavalla: massana testi- ja kontrollinäytteestä tai sarjana yksittäisiä, samankokoisia osanäytteitä testi- ja kontrollinäytteestä. Helposti haihtuvien aineiden testi on kuitenkin toteutettava sarjalle yksittäisiä osanäytteitä. Kun maanäytteet inkuboidaan massana, kutakin testi- ja kontrollinäytettä valmistetaan suuri määrä, josta analysoitavat osanäytteet otetaan tarpeen mukaan testin aikana. Alun perin valmistettava testi- ja kontrollinäytteen määrä riippuu osanäytteiden koosta, analysoitavien rinnakkaisnäytteiden määrästä sekä arvioitujen näytteenottokertojen enimmäismäärästä. Massana inkuboidut maanäytteet tulee sekoittaa huolellisesti ennen osanäytteen ottoa. Kun maanäytteet inkuboidaan yksittäisten näytteiden sarjana, kukin testi- ja kontrollimassanäyte jaetaan tarvittaviin osanäytteisiin, joita sitten käytetään tarpeen mukaan. Kokeissa, joissa näytteenottokertoja ennakoidaan olevan enemmän kuin kaksi, osanäytteitä tulee valmistaa riittävästi kaikkia rinnakkaisnäytteitä ja näytteenottokertoja varten. Vähintään kolme testattavan maanäytteen rinnakkaisnäytettä tulee inkuboida aerobisissa olosuhteissa (katso kohta 1.7.1.1). Kaikkien testien aikana tulee käyttää asianmukaisia säiliöitä, joissa on riittävästi ilmatilaa, jotta vältetään anaerobisten olosuhteiden kehittyminen. Kun testataan haihtuvia aineita, testi tulee aina tehdä sarjalle yksittäisiä osanäytteitä.

1.7.1.3 *Testiolosuhteet ja testin kesto*

Testi toteutetaan pimeässä 20 (±2) ^{o}C:n huoneenlämmössä. Maanäytteiden kosteuspitoisuus tulee pitää testin aikana 40-60 %:ssa näytteen maksimaalisesta vedenpidätyskyvystä (katso kohta 1.6.4.2) vaihteluvälillä ± 5 %. Tarvittaessa voidaan lisätä tislattua, ionipuhdistettua vettä.

Testien vähimmäiskesto on 28 päivää. Testattaessa maataloudessa käytettäviä kemikaaleja verrataan testi- ja kontrollinäytteiden nitraatinmuodostusnopeutta. Jos näiden ero on yli 25 % päivänä 28, testiä jatketaan, kunnes saavutetaan 25 %:n tai tätä pienempi ero, tai sadan päivän ajan sen mukaan, kumpaan menee vähemmän aikaa. Testattaessa muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja testi lopetetaan 28 päivän kuluttua. Päivänä 28 määritetään nitraattimäärät testi- ja kontrollinäytteissä sekä lasketaan EC_x-arvot.

▼B

1.7.2 **Näytteenotto ja näytteiden analyysi**

1.7.2.1 *Näytteenottoaikataulu*

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäytteistä analysoidaan nitraatti päivinä 0, 7, 14 ja 28. Jos testiä on jatkettava, jatkomittaukset tehdään 14 päivän välein päivästä 28 lähtien.

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee käyttää vähintään viittä testikonsentraatiota ja näytteistä analysoidaan nitraatti testin alussa (päivä 0) ja altistusjakson lopussa (28 päivää). Tarvittaessa voidaan tehdä välimittaus esimerkiksi päivänä 7. Päivänä 28 saatavien tietojen mukaan määritetään kemikaalin EC_x-arvo. Haluttaessa voidaan raportoida maanäytteen alkuperäinen nitraattimäärä päivän 0 tietojen perusteella.

1.7.2.2 *Maanäytteiden analyysi*

Muodostuneen nitraatin määrä määritetään kaikista testi- ja kontrollinäytteiden rinnakkaisnäytteistä kullakin näytteenottokerralla. Nitraatti erotetaan maanäytteestä ravistamalla näytettä sopivassa liuottimessa, esimerkiksi kaliumkloridiliuoksessa (0,1 M). Suositeltava suhde on 5 ml kaliumkloridiliuosta maanäytteen yhtä kuivapainogrammaa kohti. Erotuksen optimoimiseksi maanäytteen ja liuottimen sisältävien säiliöiden tulee olla täytetty vain puolilleen. Sekoituksia ravistellaan 150 rpm 60 minuutin ajan. Sekoitukset sentrifugoidaan tai suodatetaan ja nestefaasista analysoidaan nitraatti. Nestemäiset uutteet, joissa ei ole hiukkasia, voidaan säilyttää ennen analyysia - 20 ± 5 ^{o}C:n lämpötilassa enintään kuuden kuukauden ajan.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Jos tutkitaan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, kaikissa rinnakkaisnäytteissä muodostuneen nitraatin määrä raportoidaan ja kaikkien rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista laaditaan taulukko. Typen muuntumisnopeudet tulee arvioida asianmukaisilla ja yleisesti hyväksytyillä tilastollisilla menetelmillä (esimerkiksi F-testi, 5 %:n merkitsevyystaso). Muodostuneen nitraatin määrät ilmoitetaan milligrammoina per maanäytteen kuivapainokilo per päivä. Kunkin käsittelyn yhteydessä ilmenevää nitraatinmuodostusnopeutta verrataan kontrollinäytteeseen ja prosentuaalinen ero kontrollinäytteeseen verrattuna lasketaan.

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, kussakin rinnakkaisnäytteessä muodostuneen nitraatin määrä määritetään ja laaditaan annos-vastekäyrä EC_x-arvojen arvioimista varten. Testinäytteissä 28 päivän jälkeen havaittuja nitraattimääriä (mg / maanäytteen kuivapainokilo) verrataan kontrollinäytteissä havaittuihin nitraattimääriin. Näistä tiedoista lasketaan prosentuaaliset estoarvot kaikille testikonsentraatioille. Laaditaan kuvaaja, jossa nämä prosenttiarvot esitetään konsentraation funktiona, ja EC_x-arvot lasketaan tilastollisin menetelmin. Luottamusvälit ($p = 0,95$) lasketuille EC_x-arvoille määritetään myös standardimenetelmillä (10)(11)(12).

Suuria typpimääriä sisältävät testiaineet saattavat vaikuttaa testin aikana syntyvän nitraatin määrään. Jos näitä aineita testataan suurilla konsentraatioilla (esimerkiksi kemikaalit, joita ennakoidaan annosteltavan toistuvasti), testiin tulee sisällyttää asianmukaiset kontrollit (esimerkiksi maanäyte ja testiaine ilman kasviseosta). Näistä kontrolleista saadut tiedot tulee ottaa huomioon EC_x-arvojen laskennassa.

▼B

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Kun maataloudessa käytettävien kemikaalien testituloksia arvioitaessa nitraatinmuodostusnopeuden ero alimman testiaineannostuksen (joka vastaa ennakoitua enimmäiskonsentraatiota) ja kontrollinäytteen välillä on 25 % tai vähemmän millä tahansa näytteenottokerralla päivän 28 jälkeen, voidaan arvioida, että testiaineella ei ole pitkäaikaista vaikutusta typen muuntumiseen maaperässä. Arvioitaessa muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja tuloksissa esitetään EC_{50}-, EC_{25}- ja/tai EC_{10}-arvot.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot.

Tunnistetiedot testinäytteestä, mukaan lukien:

— näytteenottopaikan maantieteellinen sijainti (leveys- ja pituusaste),

— näytteenottopaikan historia (esimerkiksi kasvipeite, käsittelyt kasvinsuojeluaineilla, lannoitekäsittelyt, satunnainen saastuminen),

— käyttötapa (esimerkiksi maanviljelysmaa, metsä),

— näytteenottosyvyys (cm),

— hiekka-/siltti-/savipitoisuus (% kuivapainosta),

— pH (vedessä),

— orgaanisen hiilen pitoisuus (% kuivapainosta),

— typpipitoisuus (% kuivapainosta),

— alkuperäinen nitraattikonsentraatio (mg nitraattia / kg kuivapainoa),

— kationinvaihtokyky (mmol/kg),

— mikrobibiomassa prosentteina orgaanisen hiilen kokonaismäärästä,

— viitetiedot kunkin parametrin määritysmenetelmästä,

— tiedot maanäytteiden keräämisestä ja varastoinnista,

— maaperän esi-inkubointitiedot tarvittaessa.

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysiko-kemialliset ominaisuudet,

— tarvittaessa kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien rakennekaava, puhtaus (esimerkiksi kasvinsuojeluaineista tehoaineen prosenttiosuus), typpipitoisuus.

Kasvualusta:

— kasvualustan lähde,

— koostumus (esimerkiksi sinimailanen, sinimailas-ruohoseos),

— hiili- ja typpipitoisuus (% kuivapainosta),

— seulan reiän koko (mm).

▼B

Testiolosuhteet:

— tiedot maanäytteen parantamisesta orgaanisella kasvualustalla,

— testiaineen konsentraatioiden määrä ja tarvittaessa niiden valintaperusteet,

— tiedot testiaineen annostelusta maahan,

— inkubaatiolämpötila,

— näytteen kosteuspitoisuus testin alussa ja sen aikana,

— näytteen inkubointitapa (massana tai useina erillisinä osanäytteinä),

— rinnakkaisnäytteiden määrä,

— näytteenottoajankohdat,

— menetelmä nitraatin uuttamiseksi näytteestä.

Tulokset:

— nitraatin analysoinnissa käytetty menetelmä ja laitteisto,

— taulukko nitraattimittausten yksittäisistä arvoista ja keskiarvoista,

— testi -ja kontrollinäytteiden rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu,

— laskuihin tehtyjen korjausten selitykset tarvittaessa,

— nitraatinmuodostusnopeuden prosentuaalinen vaihtelu kullakin näytteenottokerralla tai soveltuvin osin EC_{50}-arvo 95 %:n luottamusvälein, muu EC_x-arvo (joko EC_{25} tai EC_{10}) luottamusvälein ja annos-vastekäyrä,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— kaikki tulosten tulkinnan kannalta hyödylliset tiedot ja havainnot.

4. **LÄHDELUETTELO**

(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 (toinen painos 1990).

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

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

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

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italia, 18. -20. tammikuuta 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

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

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. Kolmas painos, Cambridge, Lontoo ja New York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Iso-Britannia.

▼B

C.22. MAAPERÄN MIKROBIT: HIILEN MUUNTUMISTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 217 (2000).

1.1 JOHDANTO

Tämän menetelmän tarkoitus on tutkia laboratoriomenetelmin kasvinsuojeluaineiden ja mahdollisesti muiden kemikaalien pitkäaikaisia vaikutuksia maaperän mikrobien hiiltä muuntavaan toimintaan kerta-altistuksen jälkeen. Testi perustuu pääosin Euroopan ja Välimeren alueen kasvinsuojelujärjestön (OEPP) antamiin suosituksiin (1). Myös muiden elinten, esimerkiksi Saksan Biologische Bundesanstaltin (2), Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston (3), ja SETACin (4) laatimat ohjeet on otettu huomioon. Menetelmässä käytettävien maanäytteiden määrästä ja tyypistä on sovittu maalajin ja sedimentin valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmässä, joka kokoontui Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 (5). Maanäytteiden keräämiseen, käsittelyyn ja varastointiin liittyvät suositukset perustuvat ISO:n ohjeisiin (6) sekä Belgiraten työryhmän suosituksiin.

Testiaineiden toksisten ominaisuuksien arvioinnin yhteydessä voi olla tarpeen määrittää niiden vaikutukset maaperän mikrobien toimintaan, esimerkiksi silloin kun tarvitaan tietoja kasvinsuojeluaineiden mahdollisista sivuvaikutuksista maaperän pieneliöstöön tai kun on odotettavissa maaperän mikrobien altistuminen muille kemikaaleille kuin kasvinsuojeluaineille. Hiilen muuntumistestin tarkoituksena on määrittää kyseisten kemikaalien vaikutukset maaperän pieneliöstöön. Jos testattavat aineet ovat maatalouskemikaaleja (esimerkiksi kasvinsuojeluaineita, lannoitteita tai metsätalouskemikaaleja), on tehtävä sekä hiilen että typen muuntumistestit. Jos testattavat aineet ovat muita kuin maatalouskemikaaleja, pelkkä typen muuntumistesti riittää. Mikäli kyseisten kemikaalien typen muuntumistestistä saadut EC_{50}-arvot ovat kaupallisissa nitrifikaatiota estävien aineiden (esimerkiksi nitrapyriini) alueella, hiilen muuntumistesti voidaan tehdä lisätietojen saamiseksi.

Maaperä muodostuu elävästä ja elottomasta aineesta, joka esiintyy erilaisina, heterogeenisina seoksina. Mikrobeilla on tärkeä osuus viljavien maannosten orgaanisen aineen hajottamisessa ja muuntamisessa, ja monet eliölajit vaikuttavat maannoksen viljavuuden eri tekijöihin. Kaikki pitkäaikaiset vaikutukset näihin biokemiallisiin prosesseihin saattavat muuttaa ravinnekiertoa, jolloin maannoksen viljavuus saattaa muuttua. Hiilen ja typen muuntumista tapahtuu kaikissa viljavissa maannoksissa. Vaikka nämä prosessit aiheuttava mikrobiyhteisö on erilainen eri maalajeissa, muuntumisreitit ovat olennaisilta osin samat.

▼B

Tässä kuvatun menetelmän tarkoitus on todeta testiaineen pitkäaikaiset haittavaikutukset hiilen muuntumisprosessiin aerobisissa pintamaissa. Testin avulla voidaan havaita hiiltä muuntavien mikrobiyhteisöjen koon ja toiminnan muutoksia, koska testi altistaa mikrobiyhteisöt sekä kemialliselle stressille että hiilenpuutteelle. Testissä käytetään hiekkaista maannosta, joka sisältää niukasti orgaanista ainetta. Maannos käsitellään testiaineella ja inkuboidaan olosuhteissa, joissa mikrobien aineenvaihdunta on nopeaa. Tällaisissa olosuhteissa maannoksen sisältämä helposti saatava hiili loppuu nopeasti. Tämä aiheuttaa hiilenpuutteen, joka sekä tappaa mikrobisoluja että aiheuttaa horroksen ja/tai lepoitiöiden muodostumisen. Jos testiä jatketaan yli 28 päivän ajan, näiden reaktioiden summa voidaan mitata (käsittelemätöntä maa-ainesta sisältävistä) kontrollinäytteistä metabolisesti aktiivisen mikrobibiomassan asteittain etenevänä vähenemisenä (7). Jos hiilikadosta kärsivän maa-aineksen biomassaan kohdistuu testiolosuhteissa jonkin kemikaalin vaikutus, testinäytteen biomassa ei mahdollisesti palaudu samalle tasolle kuin kontrollinäytteen. Niinpä testiaineen milloin tahansa testin aikana aiheuttamat häiriöt kestävät usein testin loppuun asti.

Tämän menetelmän perustana olevat testit ovat olleet tarkoitetut pääasiassa aineille, joiden maaperään päätyvä määrä on ennakoitavissa. Tällaisia aineita ovat esimerkiksi kasvinsuojeluaineet, sillä niiden levitystiheys pellolle tiedetään. Maataloudessa käytettävien kemikaalien osalta riittää kahden sellaisen annoksen testaaminen, jotka kuvastavat oletettua levitysannosta. Maatalouskemikaalit voidaan testata tehoaineena tai (kaupallisena) valmisteena. Tässä esitetyn menetelmän soveltamisala ei kuitenkaan rajoitu kemikaaleihin, joiden ympäristössä havaittavat konsentraatiot ovat ennustettavissa. Muuttamalla sekä maannokseen levitettävän testiaineen määrää että tulosten arviointitapaa menetelmällä voidaan testata myös sellaisia kemikaaleja, joiden maaperään päätyvää määrää ei tunneta. Muista kuin maataloudessa käytettävistä kemikaaleista määritetään useiden konsentraatioiden vaikutukset hiilen muuntumiseen. Testitulosten perusteella laaditaan annos-vastekäyrä ja lasketaan EC_x-arvot, joissa x on määritelty vaikutus prosentteina.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Hiilen muuntuminen: mikrobien toiminnan tuloksena tapahtuva orgaanisen aineen hajoaminen epäorgaaniseksi lopputuotteeksi, hiilidioksidiksi.

EC_X (efektiivinen konsentraatio): maaperässä esiintyvä testiaineen konsentraatio, joka estää hiilen muuntumista hiilidioksidiksi x prosentilla.

EC_{50} **(efektiivinen mediaanikonsentraatio):** maaperässä esiintyvä testiaineen konsentraatio, joka estää hiilen muuntumista hiilidioksidiksi 50 prosentilla.

1.3 VERTAILUAINE

Ei käytössä.

▼B

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Seulottua maa-ainesta joko käsitellään testiaineella tai käsittely jätetään tekemättä (kontrollinäyte). Maataloudessa käytettäviä kemikaaleja testattaessa suositellaan käytettäväksi vähintään kahta testikonsentraatiota, ja ne tulee valita suhteessa suurimpaan konsentraatioon, jonka odotetaan esiintyvän testattavassa ympäristössä. Inkubaatioajan (0, 7, 14 ja 28 päivää) jälkeen käsiteltyihin näytteisiin ja kontrollinäytteisiin sekoitetaan glukoosia, ja glukoosin aiheuttaman soluhengityksen nopeutta mitataan yhtäjaksoisesti 12 tunnin ajan. Soluhengitysnopeus ilmoitetaan vapautuneena hiilidioksidina (milligrammaa hiilidioksidia/kuivapainokilo/tunti) tai kulutettuna happena (milligrammaa happea / maanäytteen kilo / tunti). Soluhengitysnopeuden keskiarvoa käsitellyissä näytteissä verrataan vastaavaan nopeuteen kontrollinäytteissä ja käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden välinen prosentuaalinen ero lasketaan. Kaikkia testejä jatketaan vähintään 28 päivän ajan. Jos päivänä 28 käsiteltyjen näytteiden ja kontrollinäytteiden välinen ero on 25 % tai enemmän, mittauksia jatketaan 14 päivän välein enintään 100 päivään asti. Jos testattavana on muu kuin maataloudessa käytettävä kemikaali, maanäytteisiin lisätään sarja testiaineen konsentraatioita, ja muodostuneen glukoosin aiheuttama soluhengitysnopeus (muodostuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen määrän keskiarvo) mitataan käsitellyistä näytteistä ja kontrollinäytteistä 28 päivän inkubaation jälkeen. Useita konsentraatioita käyttäneiden testien tulokset analysoidaan regressiomallia käyttäen ja EC_x-arvot lasketaan (EC_{50}, EC_{25} ja/tai EC_{10}). Katso kohta Määritelmät.

1.5 TESTIN VALIDITEETTI

Maatalouskemikaalien testitulosten arviot perustuvat suhteellisen pieniin eroihin (esimerkiksi keskiarvo ±25 %) käsitellyissä näytteissä ja kontrollinäytteissä vapautuneen hiilidioksidin tai näytteiden kuluttaman hapen välillä, joten kontrollinäytteiden suuri vaihtelu voi johtaa virheellisiin tuloksiin. Tästä syystä rinnakkaisten kontrollinäytteiden välisen vaihtelun pitäisi olla alle ±15 %.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 **Laitteet**

Testissä käytetään säiliöitä, jotka on valmistettu kemiallisesti inertistä materiaalista. Säiliöiden on sovittava kooltaan maanäytteiden inkubaatiomenettelyyn (joko koko massana tai sarjana erillisiä maanäytteitä, katso kohta 1.7.1.2). Testin aikana on syytä varmistaa, että veden haihtuminen on mahdollisimman vähäistä ja että kaasujen vaihtuminen on mahdollista (testisäiliö voidaan esimerkiksi peittää rei'itetyllä polyetyleenikalvolla). Testattaessa helposti haihtuvia aineita tulee käyttää kannellisia ja kaasutiiviitä säiliöitä. Niiden koon tulisi olla sellainen, että maanäyte täyttää noin neljäsosan niiden tilavuudesta.

Glukoosin aiheuttaman soluhengityksen mittaamiseksi tarvitaan inkubointijärjestelmä ja mittauslaitteet, joilla voidaan mitata hiilidioksidin tuotantoa tai hapen kulutusta. Tällaisia järjestelmiä ja mittauslaitteita kuvataan jäljempänä mainituissa kirjallisuusviitteissä (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Testattavien maalajien valinta ja määrä**

Testissä käytetään yhtä maalajia. Näytteeksi valittavan maannoksen suositeltavat ominaisuudet ovat seuraavat:

— hiekkapitoisuus: vähintään 50 % ja enintään 75 %,

▼B

— pH: 5,5 - 7,5,

— orgaanisen hiilen pitoisuus: 0,5 - 1,5 %,

— mikrobibiomassa mitataan (12)(13), ja sen hiilipitoisuuden tulee olla vähintään 1 % maaperän orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta.

Useimmissa tapauksissa tällainen maannos on hankalin mahdollinen tapaus, koska testiaineen adsorboituminen on minimaalista ja sen saatavuus pieneliöstölle maksimaalista. Tämän vuoksi ei yleensä ole tarpeen testata muita maalajeja. Kuitenkin joissain olosuhteissa, esimerkiksi kun testiainetta ennakoidaan käytettäväksi runsaasti ennen kaikkea happamien metsämaiden tapaisissa maannoksissa tai kun kemikaali on elektrostaattisesti varautunut, voi olla tarpeen käyttää testissä toista maalajia.

1.6.3 **Maanäytteiden kerääminen ja varastointi**

1.6.3.1 *Kerääminen*

Näytteenkeräyspaikasta tulisi olla käytettävissä yksityiskohtaiset taustatiedot. Näitä tietoja ovat tarkka sijainti, kasvipeite, kasvinsuojeluainekäsittelyjen päivämäärät, käsittelyt orgaanisilla ja epäorgaanisilla lannoitteilla, biologisten materiaalien lisäykset tai satunnaiset saastumiskerrat. Näytteenkeräyspaikaksi valitun paikan tulisi olla pitkäaikainen. Sopivia paikkoja ovat jatkuvasti laidunmaana käytettävät alueet, vuosittain korjattavien viljakasvien (paitsi maissin) pellot tai tiheään kylvetyt viherkesannot. Näytteenottopaikaksi soveltuu alue, jota ei ole käsitelty kasvinsuojeluaineilla vähintään vuoteen ennen näytteenottoa. Soveltuvalla alueella ei myöskään ole käytetty orgaanista lannoitetta vähintään kuuteen kuukauteen. Mineraalilannoitteiden käyttö on hyväksyttävää vain silloin, kun se on viljeltävän kasvin kannalta tarpeen; maanäytteet voidaan tällöin ottaa vasta vähintään kolmen kuukauden kuluttua lannoitteen käytöstä. Näytteiden ottamista maasta, jota on käsitelty biosidin tavoin vaikuttavalla lannoitteella (esimerkiksi kalsiumsyanamidilla), tulisi välttää.

Näytteenottoa tulisi välttää pitkien (yli 30 päivän) kuivuuden tai vettymisjaksojen aikana tai välittömästi niiden jälkeen. Auratuilla mailla näytteet on otettava 0-20 cm:n syvyydestä. Nurmimailla (laitumilla) tai muilla maa-alueilla, joita ei aurata pitkään aikaan (vähintään yhteen kasvukauteen), näytteenoton enimmäissyvyys voi olla hiukan yli 20 cm (esimerkiksi enintään 25 cm). Maanäytteet on kuljetettava säiliöissä sellaisessa lämpötilassa, jossa maanäytteen alkuperäiset ominaisuudet eivät muutu merkittävästi.

1.6.3.2 *Varastointi*

Käytetyn maa-aineksen on oltava mieluiten äskettäin maasta otettua. Jos on välttämätöntä käyttää laboratoriossa varastoitua maa-ainesta, maanäytteet voidaan varastoida pimeässä 4 (±2) °C:n lämpötilassa enintään kolmen kuukauden ajan. Näytteiden varastoinnin aikana on varmistettava, että olosuhteet ovat aerobiset. Jos näytteet on kerätty alueilta, joilla maaperä on jäässä vähintään kolme kuukautta vuodesta, varastointi kuuden kuukauden ajan - 18 °C:n lämpötilassa voi tulla kysymykseen. Varastoitavien näytteiden mikrobibiomassa mitataan ennen kutakin koetta. Biomassan hiilipitoisuuden on oltava vähintään 1 % näytteen orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta (katso kohta 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Näytteiden käsittely ja valmistelu testiä varten**

1.6.4.1 *Esi-inkubaatio*

Jos näytettä on varastoitu (katso kohta 1.6.4.2 ja 1.7.1.3), suositellaan sen esi-inkuboimista 2-28 päivän ajan. Esi-inkubaation aikana näytteen lämpötilan ja kosteuspitoisuuden tulisi olla samanlaiset kuin testissä käytetyt (katso kohdat 1.6.4.2 ja 1.7.1.3)

1.6.4.2 *Fysiko-kemialliset ominaisuudet*

Näytteestä puhdistetaan manuaalisesti suuret vieraat esineet (esimerkiksi kivet ja kasvinosat), minkä jälkeen se märkäseulotaan liikaa kuivaamatta enintään 2 mm:n raekokoon. Näytteen kosteuspitoisuus tulee säätää tislatulla tai ionipuhdistetulla vedellä 40-60 %:iin maksimaalisesta vedenpidätyskyvystä.

1.6.5 **Testiaineen valmistelu näytteeseen annostelua varten**

Testiaine annostellaan tavallisesti kantaja-aineen avulla. Kantaja-aineena voi olla vesi (vesiliukoisten testiaineiden yhteydessä) tai inertti kiintoaine, kuten hieno kvartsihiekka (raekoko 0,1 - 0,5 mm). Muita nestemäisiä kantaja-aineita kuin vettä (esimerkiksi orgaanisia liuottimia, kuten asetonia ja kloroformia) tulee välttää, koska ne saattavat vahingoittaa pieneliöstöä. Jos kantaja-aineena käytetään hiekkaa, se voidaan pinnoittaa testiaineella, joka on liuotettu tai suspendoitu sopivaan liuottimeen. Tällaisissa tapauksissa liuotin tulee poistaa haihduttamalla ennen kuin kantaja-aine sekoitetaan maannokseen. Jotta testiaine leviäisi näytteessä optimaalisesti, suositellaan suhteeksi 10 g hiekkaa yhtä näytteen kuivapainokiloa kohti. Kontrollinäytteet käsitellään vastaavalla määrällä pelkkää vettä ja/tai kvartsihiekkaa.

Testattaessa helposti haihtuvia kemikaaleja tulisi mahdollisuuksien mukaan välttää aineen hävikkiä käsittelyn aikana ja pyrkiä varmistamaan aineen tasainen leviäminen näytteeseen (esimerkiksi ruiskuttamalla testiaine näytteeseen useisiin kohtiin).

1.6.6 **Testikonsentraatiot**

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja tai muita kemikaaleja, joiden pitoisuus ympäristössä on ennustettavissa, tulee käyttää ainakin kahta konsentraatiota. Pienemmän konsentraation tulee kuvastaa vähintään testiaineen käytännössä maaperään pääsevää enimmäismäärää, ja suuremman konsentraation puolestaan tulee olla pienemmän kerrannainen. Maanäytteeseen lisättävät testiaineen konsentraatiot lasketaan olettaen, että aine imeytyy tasaisesti 5 cm:n syvyyteen ja että maamassan tiheyden arvo on 1,5. Testattaessa maataloudessa käytettäviä, suoraan maaperään levitettäviä kemikaaleja tai kemikaaleja, joiden maaperään pääsevä määrä on ennakoitavissa, suositeltavat testikonsentraatiot ovat suurin odotettavissa oleva konsentraatio ympäristössä sekä mainittu konsentraatio kerrottuna viidellä. Testattaessa mahdollisesti useita kertoja kasvukaudessa maaperään levitettäviä aineita testikonsentraatio johdetaan kertomalla suurin odotettavissa oleva konsentraatio ympäristössä ennakoitujen levityskertojen määrällä. Suurin testikonsentraatio voi kuitenkin olla enintään kymmenen kertaa suurempi kuin suurin yksittäinen annos.

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee testissä käyttää vähintään viiden konsentraation geometrista sarjaa. Valittujen testikonsentraatioiden tulee kattaa EC_x-arvojen määrittämiseksi tarvittava alue.

▼B

1.7 TESTIN SUORITUS

1.7.1 **Altistusolosuhteet**

1.7.1.1 *Testinäytteet ja kontrollinäytteet*

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäyte jaetaan kolmeen samanpainoiseen osaan. Kahteen osaan sekoitetaan testiaineen sisältävää kantaja-ainetta ja kolmanteen sekoitetaan kantaja-ainetta, joka ei sisällä testiainetta (kontrollinäyte). On suositeltavaa käyttää vähintään kolmea rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä. Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäyte jaetaan kuuteen samanpainoiseen osaan. Viiteen osaan sekoitetaan testiaineen sisältävää kantaja-ainetta ja kuudenteen sekoitetaan kantaja-ainetta, joka ei sisällä testiainetta. On suositeltavaa käyttää kolmea rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä. Testiaineen tasainen leviäminen testinäytteisiin tulee varmistaa. Sekoittamisen aikana on vältettävä näytteen tiivistämistä tai muotoutumista palloksi.

1.7.1.2 *Maanäytteiden inkubointi*

Maanäytteiden inkubointi voidaan toteuttaa kahdella tavalla: massana testi- ja kontrollinäytteestä tai sarjana yksittäisiä, samankokoisia osanäytteitä testi- ja kontrollinäytteestä. Helposti haihtuvien aineiden testi on kuitenkin toteutettava sarjalle yksittäisiä osanäytteitä. Kun maanäytteet inkuboidaan massana, kutakin testi- ja kontrollinäytettä valmistetaan suuri määrä, josta analysoitavat osanäytteet otetaan tarpeen mukaan testin aikana. Alun perin valmistettava testi- ja kontrollinäytteen määrä riippuu osanäytteiden koosta, analysoitavien rinnakkaisnäytteiden määrästä sekä arvioitujen näytteenottokertojen enimmäismäärästä. Massana inkuboidut maanäytteet tulee sekoittaa huolellisesti ennen osanäytteen ottoa. Kun maanäytteet inkuboidaan yksittäisten näytteiden sarjana, kukin testi- ja kontrollimassanäyte jaetaan tarvittaviin osanäytteisiin, joita sitten käytetään tarpeen mukaan. Kokeissa, joissa näytteenottokertoja ennakoidaan olevan enemmän kuin kaksi, osanäytteitä tulee valmistaa riittävästi kaikkia rinnakkaisnäytteitä ja näytteenottokertoja varten. Vähintään kolme testattavan maanäytteen rinnakkaisnäytettä tulee inkuboida aerobisissa olosuhteissa (katso kohta 1.7.1.1). Kaikkien testien aikana tulee käyttää asianmukaisia säiliöitä, joissa on riittävästi ilmatilaa, jotta vältetään anaerobisten olosuhteiden kehittyminen. Kun testataan haihtuvia aineita, testi tulee aina tehdä sarjalle yksittäisiä osanäytteitä.

1.7.1.3 *Testiolosuhteet ja testin kesto*

Testi toteutetaan pimeässä 20 (±2) °C:n huoneenlämmössä. Maanäytteiden kosteuspitoisuus tulee pitää testin aikana 40-60 %:ssa näytteen maksimaalisesta vedenpidätyskyvystä (katso kohta 1.6.4.2) vaihteluvälillä ±5 %. Tarvittaessa voidaan lisätä tislattua, ionipuhdistettua vettä.

Testien vähimmäiskesto on 28 päivää. Testattaessa maataloudessa käytettäviä kemikaaleja verrataan testi- ja kontrollinäytteissä vapautuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen määrää. Jos näiden ero on yli 25 % päivänä 28, testiä jatketaan, kunnes saavutetaan enintään 25 % suuruinen ero, tai 100 päivän ajan sen mukaan, kumpaan kuluu vähemmän aikaa. Testattaessa muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja testi lopetetaan 28 päivän kuluttua. Päivänä 28 määritetään vapautuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen määrät testi- ja kontrollinäytteissä sekä lasketaan EC_x-arvot.

▼B

1.7.2 **Näytteenotto ja näytteiden analyysi**

1.7.2.1 *Näytteenottoaikataulu*

Jos testataan maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, maanäytteistä analysoidaan glukoosin aiheuttama soluhengitysnopeus päivinä 0, 7, 14 ja 28. Jos testiä on jatkettava, jatkomittaukset tehdään 14 päivän välein päivästä 28 lähtien.

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, tulee käyttää vähintään viittä testikonsentraatiota, ja näytteistä analysoidaan glukoosin aiheuttama soluhengitys testin alussa (päivä 0) ja altistusjakson lopussa (28 päivää). Tarvittaessa voidaan tehdä välimittaus esimerkiksi päivänä 7. Päivänä 28 saatuja tietoja käytetään kemikaalin EC_x-arvon määrittämiseksi. Haluttaessa voidaan arvioida maanäytteen alkuperäinen metabolisesti aktiivisen mikrobibiomassan määrä päivän 0 tietojen perusteella (12).

1.7.2.2 *Glukoosin aiheuttaman soluhengitysnopeuden mittaaminen*

Glukoosin aiheuttama soluhengitysnopeus mitataan kustakin testi- ja kontrollinäytteestä jokaisella näytteenottokerralla. Maanäytteisiin sekoitetaan sellainen glukoosimäärä, joka riittää aiheuttamaan välittömästi maksimaalisen soluhengitysvasteen. Kullekin maalajille riittävä määrä voidaan määrittää testaamalla esitestissä sarja glukoosipitoisuuksia (14). Hiekkamaannoksille, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus on 0,5 - 1,5 %, riittävä annos on kuitenkin yleensä 2 000 - 4 000 mg glukoosia / maanäytteen kuivapainokilo. Glukoosi voidaan jauhaa hienoksi yhdessä puhtaan kvartsihiekan kanssa (10 g hiekkaa / maanäytteen kuivapainokilo) ja sekoittaa tasaisesti maanäytteeseen.

Glukoosilla parannettuja maanäytteitä inkuboidaan laitteessa, josta soluhengitysnopeus voidaan mitata joko jatkuvasti, joka tunti tai joka toinen tunti (katso kohta 1.6.1) 20 ^{o}C:n (±2) lämpötilassa. Vapautunut hiilidioksidi tai kulutettu happi mitataan yhtäjaksoisesti 12 tunnin aikana. Mittaukset tulee aloittaa mahdollisimman pian eli 1-2 tunnin kuluttua glukoosin lisäämisestä. Mitataan 12 tunnin aikana vapautuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen kokonaismäärä ja määritetään soluhengityksen keskinopeus.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Jos tutkitaan maatalouskemikaaleja, kunkin rinnakkaisnäytteessä vapautuneen hiilidioksidin tai kunkin maanäytteen kuluttaman hapen määrä raportoidaan, ja kaikkien rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista laaditaan taulukko. Tulokset tulee arvioida asianmukaisilla ja yleisesti hyväksytyillä tilastollisilla menetelmillä (esimerkiksi F-testi, 5 %:n merkitsevyystaso). Glukoosin aiheuttama soluhengitysnopeus ilmoitetaan milligrammoina hiilidioksidia / maanäytteen kuivapainokilo / tunti tai milligrammoina happea / maanäytteen kuivapainokilo / tunti. Kustakin testinäytteestä saatua hiilidioksidin muodostumisnopeuden keskiarvoa tai hapen kulutusnopeuden keskiarvoa verrataan kontrollinäytteen arvoihin ja lasketaan prosentuaalinen poikkeama kontrollista.

▼B

Jos testataan muita kuin maataloudessa käytettäviä kemikaaleja, kussakin rinnakkaisnäytteessä vapautuneen hiilidioksidin tai kulutetun hapen määrä määritetään ja laaditaan annos-vastekäyrä EC_x-arvojen arvioimista varten. Testinäytteistä 28 päivän jälkeen havaittuja glukoosin aiheuttaman soluhengitysnopeuden arvoja (mg hiilidioksidia / maanäytteen kuivapainokilo / tunti tai mg happea / maanäytteen kuivapainokilo / tunti) verrataan kontrollinäytteistä havaittuihin arvoihin. Näistä tiedoista lasketaan prosentuaaliset estoarvot kaikille testikonsentraatioille. Laaditaan kuvaaja, jossa esitetään prosenttiosuudet konsentraation funktiona, ja EC_x-arvot lasketaan tilastollisin menetelmin. Luottamusvälit ($p = 0,95$) lasketuille EC_x-arvoille määritetään myös standardimenetelmillä (15)(16)(17).

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Kun maatalouskemikaalien testituloksia arvioitaessa soluhengitysnopeuden ero alimman testiaineannostuksen (joka vastaa ennakoitua enimmäiskonsentraatiota) ja kontrollinäytteen välillä on 25 % tai vähemmän millä tahansa näytteenottokerralla päivän 28 jälkeen, voidaan arvioida, että testiaineella ei ole pitkäaikaista vaikutusta hiilen muuntumiseen maaperässä. Arvioitaessa muita kuin maatalouskemikaaleja tuloksissa esitetään EC_{50}-, EC_{25}-ja/tai EC_{10}-arvot.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testinäytteen täydelliset tunnistetiedot mukaan luettuina

— näytteenottopaikan maantieteellinen sijainti (leveys- ja pituusaste),

— näytteenottopaikkaa koskevat taustatiedot (esimerkiksi kasvipeite, käsittelyt kasvinsuojeluaineilla, lannoitekäsittelyt, satunnainen saastuminen),

— käyttötapa (esimerkiksi viljelysmaa, metsä),

— näytteenottosyvyys (cm),

— hiekka-/siltti-/savipitoisuus (% kuivapainosta)

— pH (vedessä),

— orgaanisen hiilen pitoisuus (% kuivapainosta),

— typpipitoisuus (% kuivapainosta),

— kationinvaihtokyky (mmol/kg),

— alkuperäinen mikrobibiomassa prosentteina orgaanisen hiilen kokonaismäärästä,

— viitetiedot kunkin parametrin määrittelymenetelmästä,

— tiedot maanäytteen keräämisestä ja varastoinnista,

— tiedot maanäytteen esi-inkubaatiosta.

▼B

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysiko-kemialliset ominaisuudet,

— tarvittaessa kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna rakennekaava, puhtaus (esimerkiksi kasvinsuojeluaineista tehoaineen prosenttiosuus), typpipitoisuus.

Testiolosuhteet:

— tiedot maanäytteen parantamisesta orgaanisella kasvualustalla,

— testiaineen käytettyjen konsentraatioiden määrä ja tarvittaessa niiden valintaperusteet,

— tiedot testiaineen annostelusta näytteeseen,

— inkubaatiolämpötila,

— näytteen kosteuspitoisuus testin alussa ja sen aikana,

— näytteen inkubointitapa (massana tai useina erillisinä osanäytteinä),

— rinnakkaisnäytteiden määrä,

— näytteenottoajankohdat.

Tulokset:

— soluhengitysnopeuden mittauksessa käytetty menetelmä ja laitteisto,

— taulukko hiilidioksidi- tai happimittausten yksittäisistä arvoista ja keskiarvoista,

— testi- ja kontrollinäytteiden rinnakkaisnäytteiden välinen vaihtelu,

— laskuihin tehtyjen korjausten selitykset tarvittaessa,

— glukoosin aiheuttaman soluhengitysnopeuden prosentuaalinen vaihtelu kullakin näytteenottokerralla tai soveltuvin osin EC_{50}-arvo 95 %:n luottamusvälein, muu EC_x-arvo (joko EC_{25} tai EC_{10}) luottamusvälein ja annos-vastekäyrä,

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa,

— kaikki tulosten tulkinnan kannalta hyödylliset tiedot ja havainnot.

4. **LÄHDELUETTELO**

(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 (toinen painos, 1990).

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

▼B

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

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italia, 18. -20. tammikuuta 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, teoksessa ”Pesticide Effects on Soil Microflora”. Toim. L. Somerville and M.P. Greaves, luku 3: 45-60.

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

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

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

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation- extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). 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. 3. painos, toim., Cambridge, Lontoo ja New York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, Iso-Britannia.

▼B

(1) **C.23. KEMIKAALIEN AEROBINEN JA ANAEROBINEN HAJOAMINEN MAAPERÄSSÄ**

1. **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 307 (2002)

1.1 JOHDANTO

Tämä menetelmä perustuu aikaisempiin ohjeisiin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ja 9. Kuvatun testimenetelmän tarkoitus on arvioida kemikaalien aerobista ja anaerobista hajoamista maaperässä. Testien avulla määritetään i) testiaineen hajoamisnopeus sekä ii) sellaisten hajoamistuotteiden laatu, joille kasvit ja maaperän mikrobit saattavat altistua, ja niiden muodostumis- ja häviämisnopeus. Nämä tutkimukset on tehtävä kemikaaleille, joita levitetään suoraan maaperään tai jotka todennäköisesti päätyvät maaperään. Laboratoriotutkimusten tulosten pohjalta voidaan myös kehittää vastaavissa kenttätutkimuksissa käytettäviä näytteenotto- ja analyysikäytäntöjä.

Hajoamisreittien arvioimiseksi riittää yleensä aerobinen ja anaerobinen testi yhdellä maannostyypillä (8)(10)(11). Hajoamisnopeuksien määrittämiseksi on käytettävä sen lisäksi vähintään kolmea maannostyyppiä (8)(10).

Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 pidetyssä maannosten ja sedimenttien valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmän kokouksessa sovittiin erityisesti tässä testissä käytettävien maannosten määrästä ja tyypeistä (10). Testattavien maannostyyppien pitää edustaa kattavasti ympäristöolosuhteita, joissa testiainetta käytetään tai joissa päästöt tapahtuvat. Esimerkiksi testattaessa kemikaaleja, joiden päästöjä saattaa tapahtua subtrooppisissa tai trooppisissa ilmastotyypeissä, täytyy käyttää FAO:n järjestelmän mukaisia Ferrasol (rauta-alu-maannos)- ja Nitosol (hohtosavimaannos) -tyyppejä. Työryhmä esitti myös maanäytteiden keräämiseen, käsittelyyn ja varastointiin liittyviä suosituksia, jotka perustuvat ISO:n ohjeisiin (15). Menetelmässä otetaan huomioon myös riisin kosteikkoviljelyyn käytettävät maannokset.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Testiaine: mikä tahansa aine, joko alkutuote tai merkitykselliset hajoamistuotteet.

Hajoamistuotteet: kaikki aineet, jotka syntyvät testiaineen bioottisista tai abioottisista hajoamisreaktioista, mukaan luettuina CO_2 ja tuotteet, jotka ovat sitoutuneissa jäämissä.

Sitoutuneet jäämät: maaperässä, kasveissa tai eläimissä esiintyvät yhdisteet, jotka uuttamisen jälkeen säilyvät matriisissa alkutuotteen tai sen metaboliitin (metaboliittien) / hajoamistuotteiden muodossa. Uuttomenetelmä ei saa olennaisesti muuttaa itse yhdisteitä tai matriisin rakennetta. Sidoksen luonnetta voidaan osittain selventää matriisia muuttavilla uuttomenetelmillä ja kehittyneillä analyysitekniikoilla. Tähän mennessä on tunnistettu tällä tavalla esimerkiksi kovalentit ioni- ja sorptiosidokset sekä sulkeuma-aineet. Yleisesti voidaan todeta, että sitoutuneiden jäämien muodostuminen vähentää aineen biologista saatavuutta ja hyötyosuutta merkittävästi (12) [vuodelta 1984 olevaan IUPAC-nimikkeistön tehty muutos (13)].

Aerobinen hajoaminen: reaktiot, joihin osallistuu molekyylistä happea (14).

▼B

Anaerobinen hajoaminen: reaktiot, joihin ei osallistu molekyylistä happea (14).

Maaperä: pienten organismien (pääasiassa mikro-organismien) eloperäiseksi tekemä sekoitus mineraalisia ja orgaanisia kemiallisia ainesosia, joista jälkimmäisiin sisältyy suuren hiili- ja typpipitoisuuden sisältäviä yhdisteitä sekä molekyylipainoltaan suuria yhdisteitä. Maaperää voidaan käsitellä kahdessa eri tilassa:

a) luonnontilaisena eli siinä muodossa, johon se on ajan kuluessa kehittynyt maannostyypilleen luonteenomaisiksi kerrostumiksi;

b) häiriintyneenä eli siinä muodossa, jossa se yleensä esiintyy viljellyissä peltomaissa tai tätä testimenetelmää varten kaivetuissa näytteissä (14).

Mineralisaatio: orgaanisen yhdisteen täydellinen hajoaminen CO_2:ksi ja H_2O:ksi aerobisissa olosuhteissa sekä CH_4:ksi, CO_2:ksi ja H_2O:ksi anaerobisissa olosuhteissa. Tässä testimenetelmässä käytettäessä merkkiaineena ^{14}C:ta mineralisaatio tarkoittaa laajaa hajoamista, jonka aikana merkitty hiiliatomi hapettuu ja vapautuu asianmukainen määrä $^{14}CO_2$:ta (14).

Puoliintumisaika: $t_{0,5}$ on aika, joka kuluu testiaineen 50-prosenttiseen hajoamiseen tapauksissa, joissa hajoaminen voidaan kuvata ensimmäisen asteen kinetiikan avulla. Puoliintumisaika ei riipu konsentraatiosta.

Häviämisaika 50 (DT_{50}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 50 %:lla; tämä arvo on eri kuin puoliintumisaika $t_{0,5}$ silloin kun hajoamista ei voi kuvata ensimmäisen asteen kinetiikan avulla.

Häviämisaika 75 (DT_{75}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 75 %:lla.

Häviämisaika 90 (DT_{90}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 90 %:lla.

1.3 VERTAILUAINEET

Hajoamistuotteiden karakterisointiin ja/tai tunnistukseen spektroskopia- ja krotomatografiamenetelmillä olisi käytettävä vertailuaineita.

1.4 TESTIN SOVELLUSALA

Menetelmää voidaan soveltaa kaikkiin kemiallisiin aineisiin (joita ei ole merkitty merkkiaineella tai jotka on merkitty radioaktiivisella merkkiaineella), joiden analysointiin on olemassa riittävän tarkka ja herkkä menetelmä. Tässä kuvattua menetelmää voidaan soveltaa lievästi haihtuviin, haihtumattomiin, vesiliukoisiin tai veteen liukenemattomiin yhdisteisiin. Menetelmää ei voida soveltaa kemikaaleihin, jotka haihtuvat helposti maaperästä (esimerkiksi savuavat aineet tai orgaaniset liuottimet) ja jotka eivät siis säily maaperässä tässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

▼B

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Hajoamisnopeuden mittaamiseen voidaan käyttää merkittyä tai merkitsemätöntä testiainetta. Merkkiaineen (leiman) käyttö on välttämätöntä tutkittaessa hajoamisreittejä ja määritettäessä massatasetta. ^{14}C on suositeltava merkkiaine, mutta muitakin isotooppeja, kuten ^{13}C:ta, ^{15}N:ta, ^{3}H:ta tai ^{32}P:ta voidaan käyttää. Leiman pitäisi mahdollisuuksien mukaan sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa ([1]). Testiaineen puhtausasteen tulisi olla vähintään 95 %.

Ennen kuin tehdään testi, joka koskee aerobista ja anaerobista hajoamista maaperässä, testiaineesta täytyy selvittää seuraavat tiedot:

a) vesiliukoisuus (menetelmä A.6);

b) liukoisuus orgaanisiin liuottimiin;

c) höyrynpaine (menetelmä A.4) ja Henryn lain vakio

d) n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin (menetelmä A.8);

e) kemiallinen pysyvyys pimeässä (hydrolyysi) (menetelmä C.7);

f) pK_a, jos molekyylilla on taipumus protonoitua tai deprotonoitua [OECD:n ohje 112] (16).

Muita tarpeellisia tietoja saattavat olla tiedot testiaineen myrkyllisyydestä maaperän mikrobeille [testimenetelmät C.21 ja C.22] (16).

Testiaineen sekä sen hajoamistuotteiden määrien mittaamiseen ja tunnistukseen on oltava käytettävissä sopivat analyysimenetelmät (myös uutto-ja puhdistusmenetelmät).

1.6 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Maanäytteet käsitellään testiaineella ja inkuboidaan pimeässä Erlenmeyer-pulloissa tai läpivirtausjärjestelmässä valvotuissa laboratorio-olosuhteissa (lämpötilan ja maaperänäytteen kosteuspitoisuuden ollessa vakio). Maanäytteet uutetaan sopivin väliajoin ja niistä analysoidaan alkutuote ja hajoamistuotteet. Myös helposti haihtuvat hajoamistuotteet kerätään analysoitaviksi sopivien absorptiolaitteiden avulla. Kun käytetään ^{14}C-merkkiainetta, voidaan eri mineralisaationopeudet mitata ottamalla talteen näytteessä kehittynyt $^{14}CO_2$, jolloin massatase sekä muodostuneet maannokseen sitoutuneet jäämät voidaan määrittää.

1.7 LAATUVAATIMUKSET

1.7.1 **Saanto**

Vähintään kahden maanäytteen uutto ja analysointi heti testiaineen lisäämisen jälkeen antaa alustavia tietoja analyysimenetelmän toistettavuudesta ja sen testiaineeseen lisäämisen tasaisuudesta. Saanto testin myöhemmissä vaiheissa saadaan massataseista. Saantojen tulisi olla 90-110 % käytettäessä merkkiainetta (S) ja 70-110 %, kun merkkiainetta ei käytetä (3).

([1]) Jos testiainemolekyyli sisältää esimerkiksi yhden renkaan, tämä rengas täytyy merkitä; jos testiainemolekyyli sisältää kaksi tai useampia renkaita, saatetaan tarvita erillinen testi kunkin merkityn renkaan reitin arvioimiseksi ja tarvittavan tiedon saamiseksi hajoamistuotteiden muodostumisesta.

▼B

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Analyysimenetelmän toistettavuus (lukuun ottamatta alussa tehtävän uuton tehokkuutta) testiaineen ja hajoamistuotteiden kvantifioinnin osalta voidaan varmistaa kaksoismäärittämällä samasta maannoksesta tehty uute, jota on inkuboitu niin kauan, että hajoamistuotteita on ehtinyt muodostua.

Testiaineen ja hajoamistuotteiden osalta analyysimenetelmän osoitusrajan (LOD) on oltava vähintään 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ maanäytettä (testiaine) tai 1 % käytetystä annoksesta sen mukaan, kumpi on pienempi. Kvantifiointiraja (LOQ) on myös määritettävä.

1.7.3 **Hajoamisreaktiossa saatujen mittaustulosten tarkkuus (luotettavuus)**

Hajoamista kuvaavan käyrän luotettavuudesta saadaan tarvittavat tiedot tekemällä regressioanalyysi testiaineen konsentraatioista ajan funktiona, jolloin voidaan laskea puoliintumisaikojen luottamusvälit (kun reaktio noudattaa näennäistä ensimmäisen asteen kinetiikkaa) tai DT_{50}-arvot sekä tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvot.

1.8 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Laitteet ja kemialliset reagenssit**

Inkubointijärjestelmänä voi olla staattinen suljettu järjestelmä tai sopiva läpivirtausjärjestelmä (7)(17). Esimerkit maanäytteen inkubointiin soveltuvasta läpivirtausjärjestelmästä ja Erlenmeyer-pullosta ovat kuvissa 1 ja 2. Molemmilla järjestelmillä on omat etunsa ja rajoituksensa (7)(17).

Testiin tarvitaan tavanomaisia laboratoriolaitteita ja erityisesti seuraavia:

— analyyttisiä laitteita, kuten GLC-, HPLC- ja TLC-laitteet, mukaan luettuina radioaktiivisten tai muiden kuin radioaktiivisten merkkiaineiden osoittamiseen soveltuvat järjestelmät tai käänteinen isotooppilaimennusmenetelmä,

— tunnistukseen käytettävät laitteet (esimerkiksi MS-, GC-MS-, HPLC-MS-spektrometri tai NMR-laite),

— nestetuikelaskin,

— hapetin radioaktiivisten aineiden polttamista varten,

— sentrifugi,

— uuttovälineet (esimerkiksi sentrifugiputkia kylmäuuttoa varten ja Soxhlet-uuttolaite jatkuvaa takaisinvirtausuuttoa varten),

— liuosten ja uutteiden konsentrointivälineet (esimerkiksi pyöröhaihdutin),

— vesihaude,

— mekaaninen sekoituslaite (esimerkiksi sekoituskone tai pyörivä sekoitin).

▼B

Esimerkiksi seuraavia kemiallisia reagensseja tarvitaan:

— NaOH, analyysilaatu, 2 mol · dm^{-3}, tai muu sopiva emäs (esimerkiksi KOH, etanoliamiini),

— H_2SO_4, analyysilaatu, 0,05 mol · dm^{-3},

— etyleeniglykoli, analyysilaatu,

— kiinteät absorptiomateriaalit, kuten natronkalkki ja polyuretaanitulpat,

— orgaaniset liuottimet, analyysilaatu, kuten asetoni tai metanoli,

— tuikeneste.

1.8.2 **Testiaineen annostelu**

Maanäytteeseen annostelua ja levittämistä varten testiaine voidaan liuottaa (ionipuhdistettuun tai tislattuun) veteen tai tarvittaessa pienimpään mahdolliseen määrään asetonia tai muuta orgaanista liuotinta (6), jossa testiaine on riittävän liukoinen ja stabiili. Valittu liuotin ei kuitenkaan saa vaikuttaa merkittävästi maaperän mikrobien toimintaan (katso kohdat 1.5 ja 1.9.2-1.9.3). Testissä on vältettävä käyttämästä mikrobien toimintaa estävien liuottimien, kuten kloroformin, dikloorimetaanin ja muiden halogenoitujen liuottimien käyttöä.

Testiaine voidaan annostella myös kiinteässä muodossa, esimerkiksi sekoitettuna kvartsihiekkaan (6) tai pieneen maanäytteen osanäytteeseen, joka on ilmakuivattu ja steriloitu. Jos testiaine lisätään liuottimen avulla, liuottimen on annettava haihtua ennen testiainetta sisältävän osanäytteen lisäämistä alkuperäiseen epästeriiliin maanäytteeseen.

Testattaessa yleiskemikaaleja, jotka joutuvat maaperään pääasiassa jätevesilietteen kautta tai maatalouskäytön yhteydessä, testiaine on ensin lisättävä lietteeseen, joka sitten annostellaan maanäytteeseen (katso kohdat 1.9.2 ja 1.9.3).

Kaupallisten valmisteiden käyttäminen testissä ei ole yleensä suositeltavaa. Se voi kuitenkin tulla kysymykseen esimerkiksi heikosti liukenevien testiaineiden kohdalla.

1.8.3 **Maannokset**

1.8.3.1 *Muunnoksen valinta*

Hajoamisreitin määrittämiseksi voidaan käyttää edustavaa maannostyyppiä. Suositeltava maannostyyppi on [FAO:n ja USDA:n luokituksen mukaan (18)] hiekkapitoinen hiesu, silttipitoinen hiesu, hiesu tai hiesupitoinen hiekka, jonka pH on 5,5 - 8,0, orgaanisen hiilen pitoisuus 0,5 - 2,5 % ja mikrobibiomassa vähintään 1 % orgaanisen hiilen kokonaismäärästä (10).

Hajoamisnopeuden määrittämiseksi on lisäksi testattava vähintään kolme erilaista edustavaa maannostyyppiä. Kunkin maannostyypin orgaanisen hiilen pitoisuuden, pH:n, savipitoisuuden ja mikrobibiomassan on oltava erilaiset (10).

▼B

Kaikista maannostyypeistä on tutkittava ainakin rakenne (hiekka-, siltti- ja saviprosentti) [FAO:n ja USDA:n luokituksen mukaan (18)] ja määritettävä pH, kationinvaihtokyky, orgaaninen hiili, bulkkitiheys, vedenpidätyskyky ([1]) ja mikrobibiomassa (vain aerobisissa testeissä). Tulosten tulkinnassa muistakin maannoksen ominaisuuksia koskevista tiedoista voi olla hyötyä. Maannoksen ominaisuuksia voidaan määrittää lähteissä (19), (20), (21), (22) ja (23) suositeltujen menetelmien avulla. Mikrobibiomassa on määritettävä substraatin indusoiman soluhengityksen (SIR) menetelmällä (25)(26) tai muulla vastaavalla menetelmällä (20).

1.8.3.2 *Maanäytteiden kerääminen, käsittely ja varastointi*

Yksityiskohtaiset taustatiedot maanäytteiden keruupaikasta on oltava saatavilla. Tarvittavat tiedot ovat tarkka paikka, kasvipeite, kemikaalikäsittelyt, käsittelyt orgaanisilla ja epäorgaanisilla lannoitteilla, biologisten materiaalien lisääminen tai muu saastuminen. Hajoamistestissä ei pitäisi käyttää maannoksia, joita on käsitelty testiaineella tai sen kanssa rakenteellisesti analogisella aineella edeltävän neljän vuoden aikana (10)(15).

Maa-aineksen on oltava äskettäin maasta otettua (A-horisontista eli ylimmän 20 cm:n kerroksesta), ja sen vesipitoisuuden tulisi olla seulomiseen sopiva. Näytteenottoa muista maannostyypeistä kuin kosteikkoviljelmistä on vältettävä pitkien (> 30 päivää) kuivuus-, jäätymis- tai tulvajaksojen (14) aikana tai heti niiden jälkeen. Maanäytteet on kuljetettava siten, että niiden vesipitoisuus muuttuu mahdollisimman vähän, ja ne on säilytettävä pimeässä ja ilmavassa tilassa. Tähän tarkoitukseen sopii yleensä löyhästi sidottu polyetyleenipussi.

Maanäytteet on käsiteltävä mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Kasvit, maaperän suuremmat eliöt ja kivet on poistettava ennen näytteen seulomista 2 mm:n seulalla, joka poistaa pikkukivet, eläimet ja kasvinosat. Näytteen liiallista kuivaamista ja murskaamista ennen seulontaa on vältettävä (15).

Kun näytteen ottaminen pellolta on talvella vaikeaa (maan ollessa jäässä tai lumikerroksen peitossa), näyte voidaan ottaa maannoserästä, joka on varastoitu kasvihuoneessa kasvipeitteen alla (esimerkiksi ruohon tai ruohon ja apilan sekoituksen alla). Testissä on erittäin suotavaa käyttää juuri kerättyjä näytteitä, mutta jos kerätty ja käsitelty näyte on varastoitava ennen testin alkua, varastointiolosuhteiden on oltava asianmukaiset ja varastointiajan lyhyt (4 ± 2 °C enintään kolmen kuukauden ajan), jotta mikrobien toiminta ei keskeydy ([2]). Biomuuntumiskokeissa käytettävien maanäytteiden keräämistä, käsittelyä ja varastointia koskevat yksityiskohtaiset ohjeet esitetään lähdeviitteissä (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) Maannoksen vedenpidätyskyky voidaan mitata joko vedenpidätyslukuna, vedenpidätyskykynä tai imupaineena (pF). Lisätietoja asiasta on liitteessä 1. Testiraportissa on ilmoitettava, onko maannoksen vedenpidätysominaisuudet ja bulkkitiheys määritetty luonnontilaisista vai häiriintyneistä (käsitellyistä) maannosnäytteistä.

([2]) Viimeaikaiset tutkimustulokset osoittavat, että myös lauhkeilta ilmastovyöhykkeiltä kerätyt maannokset voidaan varastoida - 20 °C:ssa yli kolmen kuukauden ajan (28)(29) mikrobien toiminnan siitä merkittävästi häiriintymättä.

▼B

Ennen kuin käsitelty maannos testataan, se on esi-inkuboitava, jotta siinä olevat siemenet saadaan itämään ja voidaan poistaa ja jotta mikrobien aineenvaihdunnan tasapaino ehtii palautua ennalleen, kun näyte siirretään näytteenotto- tai varastointiolosuhteista inkubointiolosuhteisiin. Yleensä riittää 2-28 päivän inkubointijakso, jonka aikana lämpötila- ja kosteusolosuhteet vastaavat varsinaisen testin olosuhteita (15). Yhteenlaskettu varastointi- ja esi-inkubointiaika saa olla enintään kolme kuukautta.

1.9 TESTIN SUORITUS

1.9.1 **Testiolosuhteet**

1.9.1.1 *Testilämpötila*

Koko testijakson aikana maanäytteitä on inkuboitava pimeässä tasaisessa lämpötilassa, joka muistuttaa niitä ilmasto-olosuhteita, joissa testiainetta käytetään tai joissa sen päästöt tapahtuvat. Kaikkien lauhkeissa ilmasto-olosuhteissa maaperään päätyvien testiaineiden lämpötilaksi suositellaan 20 (± 2) °C. Lämpötilaa on tarkkailtava testin aikana.

Testattaessa kemikaaleja, joiden käyttö tai päästöt tapahtuvat kylmemmissä ilmasto-olosuhteissa (esimerkiksi pohjoisen pallonpuoliskon maissa, syys-/talvikauden aikana), on inkuboitava lisänäytteitä myös alhaisemmassa lämpötilassa (esimerkiksi 10 (± 2) °C).

1.9.1.2 *Kosteuspitoisuus*

Aerobisissa olosuhteissa tehtävissä hajoamistesteissä maanäytteen kosteuspitoisuuden ([1]) pF-arvoa tulisi säädellä niin, että se on 2,0 - 2,5 (3). Maaperän kosteuspitoisuus ilmoitetaan veden massana kuivan maannoksen massaa kohti, ja sitä on tarkkailtava säännöllisesti (esimerkiksi kahden viikon välein) punnitsemalla inkubointiastiat ja korvaamalla veden menetys lisäämällä näytteeseen vettä (mieluiten steriilisti suodatettua vesijohtovettä). Nestettä lisättäessä testiaineen ja/tai hajoamistuotteiden hävikki haihtumalla ja/tai fotolyysi (jos sitä tapahtuu) on estettävä tai pidettävä mahdollisimman vähäisenä.

Kun hajoamistesti on tehtävä anaerobisissa olosuhteissa ja kosteikkoviljellyissä maanäytteissä, maanäyte kyllästetään vedellä upottamalla se veteen.

1.9.1.3 *Aerobiset inkubaatio-olosuhteet*

Läpivirtausjärjestelmissä aerobiset olosuhteet säilytetään vaihtamalla näyteastian ilma säännöllisin väliajoin tai ilmastamalla jatkuvasti kosteutetulla ilmalla. Erlenmeyer-pulloissa ilmanvaihtoa pidetään yllä diffuusion avulla.

1.9.1.4 *Steriilit aerobiset olosuhteet*

Haluttaessa selvittää abioottisen hajoamisen merkitystä testiaineelle maanäytteet voidaan steriloida (lisätietoja sterilointimenetelmistä on lähdeviitteissä 16 ja 29), käsitellä steriilillä testiaineella (esimerkiksi suodattamalla liuos steriilin suodattimen läpi) ja ilmastaa se kosteutetulla steriilillä ilmalla kohdan 1.9.1.3 mukaisesti. Kosteikkoviljellyissä maanäytteissä maannos ja vesi steriloidaan ja näyte inkuboidaan kohdassa 1.9.1.6 kuvatulla tavalla.

([1]) Maanäyte ei saa olla liian kostea eikä liian kuiva, jotta maaperän pieneliöiden ilmastus ja ravitsemustila pysyy sopivana. Optimaalisen mikrobien kasvun kannalta suositeltava kosteuspitoisuus on 40-60 % vedenpidätyskyvystä ja paine 0,1 - 0,33 bar (6). Jälkimmäinen arvo vastaa pF-arvoja 2,0 - 2,5. Eri maannostyyppien tyypilliset kosteuspitoisuudet esitetään liitteessä 2.

▼B

1.9.1.5 *Anaerobiset inkubaatio-olosuhteet*

Anaerobisten olosuhteiden luomiseksi ja ylläpitämiseksi testiaineella käsitelty maanäyte, joka on inkuboitu aerobisissa olosuhteissa 30 päivän tai yhden puoliintumisajan tai DT_{50}:n ajan (sen mukaan, mihin kuluu vähimmin aikaa) kyllästetään vedellä (1-3 cm:n vesikerros), ja inkubointijärjestelmä huuhdellaan inertillä kaasulla (esimerkiksi typellä tai argonilla) ([1]). Testijärjestelmästä on voitava mitata pH, happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali, ja siinä on oltava haihtuvien aineiden talteenottolaitteet. Käytettäessä Erlenmeyer-pulloista koostuvaa järjestelmää sen on oltava suljettu, jotta vältetään ilman tunkeutuminen järjestelmään diffuusion kautta.

1.9.1.6 *Kosteikkoviljellyn maanäytteen inkubaatio-olosuhteet*

Testattaessa aineen hajoamista riisin kosteikkoviljelyyn käytetyssä maannoksessa maanäyte upotetaan noin 1-5 cm:n syvyiseen veteen ja testiaine lisätään vesifaasiin (9). Suositeltava maakerroksen paksuus on vähintään 5 cm. Järjestelmän ilmansaannista huolehditaan samaan tapaan kuin aerobisissakin olosuhteissa. Vesikerroksen pH:ta, happipitoisuutta ja hapetus-pelkistyspotentiaalia tarkkaillaan ja ne ilmoitetaan testiselosteessa. Ennen hajoamistestin aloittamista näytettä on esi-inkuboitava vähintään kahden viikon ajan (katso kohta 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Testin kesto*

Nopeutta ja hajoamisreittejä koskevat tutkimukset eivät tavallisesti saa kestää yli 120 päivää ([2]) (3)(6)(8), koska sen jälkeen mikrobien toiminnan odotetaan vähenevän keinotekoisessa laboratoriojärjestelmässä, johon ei tule luonnollista ravinnetäydennystä. Testiä voidaan jatkaa pitempään (esimerkiksi 6 tai 12 kuukautta) (8) silloin kun se on tarpeen testiaineen ja pääasiallisten hajoamistuotteiden muodostumisen ja hajoamisen määrittämiseksi. Tätä pidemmät inkubointiajat on perusteltava testiselosteessa, ja niiden yhteydessä on esitettävä biomassan mittaustulokset inkubointijaksojen aikana ja niiden lopussa.

1.9.2 **Testin suoritus**

Noin 50-200 g maanäytettä (kuivapaino) asetetaan kuhunkin inkubaatiopulloon (katso liitteessä 3 olevat kuvat 1 ja 2) ja maanäyte käsitellään testiaineella käyttäen jotakin kohdassa 1.8.2 kuvattua menetelmää. Jos testiaine annostellaan orgaanisten liuotinten avulla, ne on poistettava näytteestä haihduttamalla. Sen jälkeen maanäyte sekoitetaan huolellisesti lastalla ja/tai ravistamalla pulloa. Jos testi tehdään kosteikkoviljellylle maanäytteelle, maannos ja vesi on sekoitettava huolellisesti testiaineen lisäämisen jälkeen. Käsitellyistä näytteistä on analysoitava pieniä määräosia (esimerkiksi 1 g), jotta voidaan varmistua sen tasaisesta leviämisestä näytteeseen. Vaihtoehtoinen tapa on kuvattu alla.

([1]) Pintamaissa ja jopa jankossa vallitsevat yleensä aerobiset olosuhteet, kuten käy ilmi EY:n rahoittamasta tutkimushankkeesta [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, Ruotsi]. Anaerobisia olosuhteita esiintyy vain ajoittain maannosten tulvimisen aikaan rankkasateiden jälkeen tai riisipeltojen kosteikkoviljelyssä.

([2]) Aerobiset testit voidaan lopettaa paljon ennen 120:tä päivää, jos lopullinen hajoamisreitti ja lopullinen mineralisaatio on selkeästi tapahtunut siihen mennessä. Testi voidaan lopettaa 120 päivän kuluttua tai silloin kun vähintään 90 % testiaineesta on hajonnut, mutta vasta silloin kun CO_2:ta on muodostunut vähintään 5 %.

▼B

Annostellaan määrä siten, että se vastaa kasvinsuojeluaineen käyttöohjeissa suositeltua suurinta annostusta ja tasaista leviämistä käytettyyn syvyyteen (esimerkiksi maannoksen ylin 10 cm:n kerros ([1]). Esimerkiksi kemikaaleille, jotka levitetään kasvien lehtiin tai maannoksen päälle ilman, että ne tunkeutuvat kasviin tai maannokseen, sopiva annostelumäärä kuhunkin astiaan lasketaan 2,5 cm:n annostelusyvyyden mukaan. Kemikaaleille, jotka tunkeutuvat maannokseen, sopiva annostelusyvyys on aineen käyttöohjeissa ilmoitettu tunkeutumissyvyys. Yleiskemikaaleille annostus on arvioitava tärkeimmän leviämisreitin mukaan. Jos aineen pääasiallinen leviäminen maannokseen tapahtuu esimerkiksi jätevesilietteen kautta, kemikaali on annosteltava lietteeseen konsentraationa, joka vastaa lietteen ennakoitua konsentraatiota. Maannokseen lisättävän lietteen määrän on vastattava maatalousmaihin tavanomaisesti lisättävää lietemäärää. Jos tämä konsentraatio ei ole riittävä pääasiallisten hajoamistuotteiden havaitsemiseksi, erillisten suuremman konsentraation sisältävien näytteiden inkubointi voi olla hyödyllistä. On kuitenkin syytä välttää liian suuria annosmääriä, koska ne haittaavat maaperän mikrobien toimintaa (katso kohdat 1.5 ja 1.8.2).

Vaihtoehtoisesti myös suurempi maanäyte-erä (esimerkiksi 1-2 kg) voidaan käsitellä testiaineella, sekoittaa seos huolellisesti sopivassa sekoituslaitteessa ja sitten siirtää se pienissä 50-200 g:n annoksissa inkubointipulloihin (esimerkiksi näytekauhan avulla). Käsitellystä maanäyte-erästä on analysoitava testiaine pieninä määräosina (esimerkiksi 1 g) aineen tasaisen leviämisen varmistamiseksi. Tämä menetelmä on suositeltava, koska sen avulla testiaine saadaan levitettyä maanäytteeseen tasaisesti.

Myös käsittelemättömät maanäytteet inkuboidaan samoissa (aerobisissa) olosuhteissa kuin testiaineella käsitellyt näytteet. Näitä näytteitä käytetään biomassan mittaamiseen testien aikana ja niiden lopuksi.

Jos testiaine annostellaan maanäytteeseen orgaanisen liuottimen tai liuottimien avulla, samalla määrällä liuotinta tai liuottimia käsitellyt maanäytteet inkuboidaan samoissa (aerobisissa) olosuhteissa kuin testiaineella käsitellyt näytteet. Näistä näytteistä mitataan biomassa testin aluksi, sen aikana ja sen lopuksi, jotta liuottimen tai liuottimien vaikutus mikrobibiomassaan voidaan tarkistaa.

Pullot, jotka sisältävät käsitellyt maanäytteet, joko kiinnitetään kuvassa 1 esitettyyn läpivirtausjärjestelmään tai suljetaan kuvassa 2 esitettyyn absorptiokolonnilla. (katso liite 3).

([1]) Alkuperäinen konsentraatio pinta-alan perusteella voidaan laskea seuraavasta yhtälöstä:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = Alkuperäinen konsentraatio maanäytteessä [$mg \cdot kg^{-1}$]

A = Annostus [$kg \cdot ha^{-1}$]; l = maannoksen paksuus tutkittavassa ympäristössä [m]; d = maannoksen kuivabulkkitiheys [$kg \cdot m^{-3}$].

Nyrkkisääntö on, että annostuksella 1 $kg \cdot ha^{-1}$ maannoksen konsentraatioksi tulee noin 1 $mg \cdot kg^{-1}$ kymmenen sentin kerroksena (olettaen, että bulkkitiheys on 1 $g \cdot cm^{-3}$).

▼B

1.9.3 **Näytteenotto ja mittaus**

Rinnakkaiset inkubaatiopullot poistetaan sopivin väliajoin, maanäytteet uutetaan sopivilla liuottimilla, joilla on eri polariteetti, ja niistä analysoidaan testiaine ja/tai hajoamistuotteet. Hyvin suunnitellussa testissä on varauduttava siihen, että joka näytteenottokerralla tarvitaan kaksi pulloa. Myös absorptioliuokset tai kiinteät absorptiomateriaalit poistetaan tietyin väliajoin (7 päivän välein ensimmäisen kuukauden aikana ja sen jälkeen 17 päivän välein) kunkin maanäytteen inkuboinnin aikana ja sen lopuksi, ja niistä analysoidaan haihtuvat hajoamistuotteet. Heti testiaineen annostelun jälkeen (päivän 0 näyte) otetun maanäytteen lisäksi testeihin tulisi sisällyttää ainakin viisi eri väliajoin tehtyä testiä. Näytteenottoajat on valittava siten, että testiaineen hajoamisajat sekä hajoamistuotteiden muodostumis- ja hajoamisajat voidaan määrittää (esimerkiksi 0, 1, 3 ja 7 päivää; 2 ja 3 viikkoa; 1, 2 ja 3 kuukautta).

Käytettäessä ^{14}C-merkkiainetta uuttumattomien radioaktiivisten aineiden määrä määritetään polttamalla, ja kullekin näytteenottoajalle lasketaan massatase.

Anaerobisen ja kosteikkoviljelynäytteen osalta testiaine ja hajoamistuotteet analysoidaan yhdistetystä maa- ja vesifaasista, tai maa- ja vesifaasit erotetaan suodattamalla tai sentrifugoimalla ennen uuttoa ja analyysia.

1.9.4 **Vapaaehtoiset lisätestit**

Aerobisella epästeriilillä testillä, joissa käytetään muita lämpötiloja ja näytteen kosteuspitoisuuksia, voidaan arvioida maaperän lämpötilan ja kosteuspitoisuuden vaikutusta testiaineen ja/tai sen hajoamistuotteiden hajoamisnopeuteen maaperässä.

Uuttumattomia radioaktiivisia aineita voidaan lisäksi yrittää karakterisoida esimerkiksi ylikriittisellä nesteuutolla.

2. **MITTAUSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Testiaineen, hajoamistuotteiden, haihtuvien aineiden (vain prosentteina) ja uuttumattomien aineiden määrät on ilmoitettava prosentteina alkuperäisestä konsentraatiosta ja tarvittaessa $mg \cdot kg^{-1}$ maanäytettä (kuivapaino) kutakin näytteenottokertaa kohti. Massatase ilmoitetaan prosenttina alkuperäisestä konsentraatiosta kutakin näytteenottokertaa kohti. Esittämällä testiaineen konsentraatiot ajan funktiona voidaan arvioida aineen hajoamisen puoliintumisaika tai DT_{50}-arvo. Pääasialliset hajoamistuotteet olisi tunnistettava ja niiden konsentraatiot olisi myös esitettävä ajan funktiona, jolloin voidaan määrittää niiden muodostumis- ja hajoamisnopeus. Pääasiallinen hajoamistuote on mikä tahansa tuote, jota esiintyy milloin tahansa testin aikana $\geq$ 10 % testiaineen annoksesta.

Talteen otetut haihtuvat yhdisteet antavat viitteitä testiaineen ja sen hajoamistuotteiden haihtuvuuspotentiaalista maaperässä.

▼B

Tarkemmat puoliintumisaikojen tai DT_{50}-arvojen sekä tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvojen määritykset on tehtävä asianmukaisen kineettisen mallin mukaisilla laskelmilla. Puoliintumisajan ja DT_{50}-arvojen ilmoittamisen yhteydessä on kuvattava käytetty malli, kinetiikan aste ja määrityskerroin (r^2). Ensimmäisen asteen kinetiikan käyttö on yleensä suositeltavaa paitsi silloin, kun $r^2 < 0,7$. Tarvittaessa laskelmat on tehtävä myös pääasiallisista hajoamistuotteista. Esimerkkejä sopivista malleista on esitetty lähteissä 31-35.

Testattaessa muodostumis- ja hajoamisnopeuksia eri lämpötiloissa hajoamisnopeudet on kuvattava lämpötilan funktiona testissä käytetyn lämpötila-alueen sisällä käyttäen Arrheniuksen lakia muodossa:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or} \ln k = 1n\ A - \frac{B}{T}$$

missä ln A ja B ovat Y-akselin leikkauspisteestä ja kulmakertoimesta saatavat regressiovakiot suoralle, joka saadaan ln k- ja 1/T-arvon lineaarisen regressioanalyysin tuloksena, k on nopeusvakio lämpötilassa T ja T on lämpötila Kelvin-asteina. Jos aineen hajoamista säätelee mikrobien toiminta, on otettava huomioon lämpötila-alue, jolla Arreheniuksen laki on validi.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Vaikka testit toteutetaan keinotekoisessa laboratoriojärjestelmässä, tulosten perusteella voidaan arvioida testiaineen hajoamisnopeutta sekä hajoamistuotteiden muodostumis- ja hajoamisnopeutta kenttäolosuhteissa (36)(37).

Testiaineen hajoamisreitin tutkimus antaa tietoja siitä, miten aineen rakenne muuttuu maaperässä kemiallisten reaktioiden ja mikrobien toiminnan tuloksena.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot.

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysiko-kemialliset ominaisuudet (katso kohta 1.5),

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineena käytetyn kemikaalin radiokemiallinen puhtaus ja spesifinen aktiivisuus (tarvittaessa).

Vertailuaineet:

— hajoamistuotteen karakterisointiin ja/tai tunnistukseen käytettävän vertailuaineen kemiallinen nimi ja rakenne.

Testimaannokset:

— keruupaikkaa koskevat tiedot,

— näytteenottopäivä ja -menetelmä,

▼B

— maannosten ominaisuudet, kuten pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, rakenne (hiekka-, siltti- ja saviprosentti), kationinvaihtokyky, bulkkitiheys, vedenpidätysominaisuudet ja mikrobibiomassa,

— jos maannosta on varastoitu, varastointiaika ja varastointiolosuhteet.

Testiolosuhteet:

— testien suorituspäivämäärät,

— testiaineen annosteltu määrä,

— käytetyt liuottimet ja testiaineen annostelutapa,

— käsitellyn maanäytteen alkuperäinen paino ja sen paino kullakin näytteenottokerralla,

— kuvaus käytetystä inkubointijärjestelmästä,

— ilman virtausnopeus (vain läpivirtausjärjestelmien osalta),

— koejärjestelmän lämpötila,

— maanäytteen kosteuspitoisuus inkuboinnin aikana,

— mikrobibiomassa aerobisten testien aluksi, niiden aikana ja niiden lopuksi,

— pH, happikonsentraatio ja hapetus-pelkistyspotentiaali anaerobisten testien ja kosteikkoviljeltyjen näytteiden testien aluksi, niiden aikana ja niiden lopuksi,

— erotusmenetelmä(t),

— testiaineen ja pääasiallisten hajoamistuotteiden kvantifiointi- ja tunnistusmenetelmät maanäytteissä ja absorptiomateriaaleissa,

— rinnakkaisnäytteiden ja kontrollinäytteiden määrä.

Tulokset:

— mikrobien aktiivisuuden määritystulos,

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys,

— saanto (validin testin prosenttiarvot on esitetty kohdassa 1.7.1),

— tulokset taulukkomuodossa, ilmoitetaan prosentteina alkuperäisestä annoksesta ja tarvittaessa $mg \cdot kg^{-1}$ maanäytettä (kuivapaino),

— massatase testien aikana ja niiden lopuksi,

— maannoksen uuttumattoman (sitoutuneen) radioaktiivisuuden tai jäämien karakterisointi,

— vapautuneen CO_2:n ja muiden helposti haihtuvien yhdisteiden määritys,

— testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden konsentraatiot maanäytteessä esitettynä ajan funktiona,

— testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden puoliintumisaika tai DT_{50}-, DT_{75}- ja DT_{90}-arvot luottamusvälein,

▼B

— arvio abioottisen hajoamisen nopeudesta steriileissä olosuhteissa,

— arvio testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden hajoamiskinetiikasta,

— arvio oletetuista hajoamisreiteistä tarvittaessa,

— tulosten pohdinta ja tulkinta,

— käsittelemättömät tulokset (esimerkiksi näytteestä saadut kromatogrammit, hajoamisnopeutta koskevat laskelmat ja hajoamistuotteiden tunnistusmenetelmät).

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality — Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, toim.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation Studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italia, 18.-20. tammikuuta 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. Teoksessa Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, toim.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. Teoksessa Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, toim. 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, toim. Agronomy Series No 9, 2. painos.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, toim. Agronomy Series No 9, 2. painos.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. 1. painos.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of soils for pesticide experiments. Teoksessa Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, toim. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. Teoksessa Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. Teoksessa Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some Chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. Teoksessa ”Environmental Dynamics of Pesticides”. R. Haque and V.H. Freed, toim., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. Teoksessa Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, toim.), Academic Press, 83-122.

▼B

LIITE 1

VEDEN JÄNNITYS, KENTTÄKAPASITEETTI (FC) JA VEDENPIDÄTYSKYKY (WHC) ([1])

Vesipatsaan korkeus [cm]	PF ([a])	bar ([b])	Huomautuksia
10^7	7	10^4	kuiva maannos
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	lakastumisraja
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 ([c])	kenttäkapasiteetin alue ([d])
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	vedenpidätyskyky (arvio)
1	0	0,001	vedellä kyllästetty maannos

([a]) pF = vesipatsaan korkeuden (cm) logaritmi.
([b]) 1 bar= 10^5 Pa.
([c]) Vastaa noin 10 %:n vesipitoisuutta hiekassa, 35 %:n hiesussa ja 45 %:n savessa.
([d]) Kenttäkapasiteetti ei ole vakio, vaan vaihtelee maannostyypin mukaan pF-arvojen 1,5 ja 2,5 välillä.

Veden jännitys mitataan vesipatsaan korkeutena (cm) tai baareina. Imupaineen laajan vaihtelun vuoksi jännitys ilmaistaan yksinkertaisesti pF-arvona, joka vastaa vesipatsaan korkeuden (cm) logaritmia.

Kenttäkapasiteetti on veden määrä, joka voi varastoitua ilmakehän paineessa luonnonmaannokseen 2 päivän kuluessa pitkästä sadejaksosta tai riittävästä kastelusta. Tämä arvo määritetään luonnontilaisesta maannoksesta tutkittavassa ympäristössä. Mittausta ei siis voida soveltaa käsiteltyihin maanäyte-eriin laboratorio-olosuhteissa. FC-arvoissa, jotka on määritetty käsiteltyjen maanäytteiden perusteella, voi esiintyä suurta järjestelmällistä vaihtelua.

Vedenpidätyskyky (WHC) määritetään laboratoriossa sekä luonnontilaisesta että käsitellystä maannoksesta kyllästämällä maapatsas vedellä kapillaari-ilmiön avulla. Tämä arvo on erityisen käyttökelpoinen käsiteltyjen maannosten yhteydessä ja se voi olla jopa 30 % suurempi kuin kenttäkapasiteetti (1). Se on myös kokeellisesti helpompi määrittää kuin luotettava FC-arvo.

Huomautukset

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

LIITE 2

ERILAISTEN MAANNOSTYYPPIEN KOSTEUSPITOISUUDET (g vettä per 100 g kuivaa maannosta) ERI VALTIOISSA

Maannos	Valtio	Maannoksen kosteuspitoisuus arvolla		
		WHC ([1])	pF= 1,8	pF = 2,5
Hiekka	Saksa	28,7	8,8	3,9
Hiesupitoinen hiekka	Saksa	50,4	17,9	12,1
Hiesupitoinen hiekka	Sveitsi	44,0	35,3	9,2
Silttipitoinen hiesu	Sveitsi	72,8	56,6	28,4
Savipitoinen hiesu	Brasilia	69,7	38,4	27,3
Savipitoinen hiesu	Japani	74,4	57,8	31,4
Hiekkapitoinen hiesu	Japani	82,4	59,2	36,0
Silttipitoinen hiesu	USA	47,2	33,2	18,8
Hiekkapitoinen hiesu	USA	40,4	25,2	13,3

([1]) Vedenpidätyskyky

▼B

LIITE 3

Kuva 1

Esimerkki läpivirtausjärjestelmästä, jolla tutkitaan kemikaalien hajoamista maannoksessa ([1]) ([2])

1: neulaventtiili

2: vettä sisältävä kaasunpesupullo

3: ultramembraani (vain steriileissä olosuhteissa), huokoskoko 0,2 µm

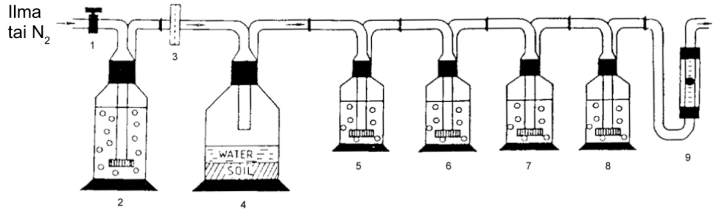
4: maannoksen aineenvaihduntapullo (vedellä kyllästetty vain testattaessa anaerobisia ja kosteikkoviljelyolosuhteita)

5: etyleeniglykolilukko orgaanisia helposti haihtuvia yhdisteitä varten

6: rikkihappolukko emäksisiä helposti haihtuvia yhdisteitä varten

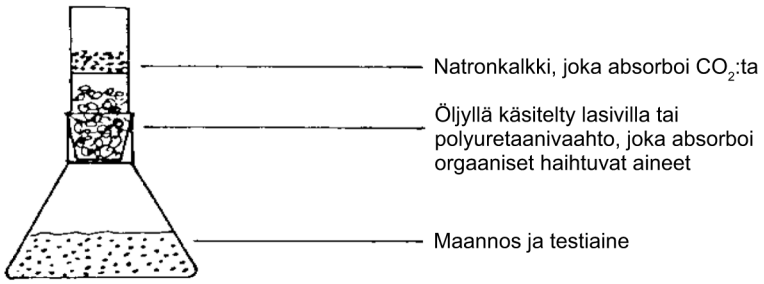
7, 8: natriumhydroksidilukko CO_2:ta ja muita happamia helposti haihtuvia yhdisteitä varten

9: virtausmittari



Kuva 2

Esimerkki Erlenmeyer-pullosta, jolla tutkitaan kemikaalien hajoamista maannoksessa ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. Teoksessa Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, toim.), Academic Press, 123–157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. Teoksessa Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, toim. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B

C.24. AEROBINEN JA ANAEROBINEN HAJOAMINEN VESIYMPÄRISTÖN SEDIMENTTIJÄRJESTELMISSÄ

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 308 (2002).

1.1 JOHDANTO

Kemikaalit voivat päästä mataliin tai syviin pintavesiin esimerkiksi suoraan annosteltuina, lentosumutuksen yhteydessä, valumana sekä viemäröinnin, jätteiden käsittelyn, teollisuuden, kotitalouden tai maanviljelyn päästöinä ja ilmakehän laskeumina. Kuvatun testimenetelmän tarkoitus on arvioida laboratorio-olosuhteissa orgaanisten kemikaalien aerobista ja anaerobista hajoamista vesiympäristön sedimenttijärjestelmissä. Menetelmä perustuu aikaisempiin ohjeisiin (1)(2)(3)(4)(5)(6). Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 pidetyssä maannosten ja sedimenttien valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmän kokouksessa sovittiin erityisesti tässä testissä käytettävien sedimenttien lukumäärästä ja tyypeistä (7). Työryhmä esitti myös sedimenttinäytteiden keräämiseen, käsittelyyn ja varastointiin liittyviä suosituksia, jotka perustuvat ISO:n ohjeisiin (8). Testit ovat pakollisia kemikaaleille, jotka tarkoituksella tai todennäköisesti päätyvät vesiympäristöön edellä mainituilla tavoilla.

Luonnollisten vesiympäristön sedimenttijärjestelmien olosuhteet ovat usein aerobiset ylemmässä vesifaasissa. Sedimentin pintakerros voi olla joko aerobinen tai anaerobinen, kun taas syvemmällä sijaitseva sedimenttikerros on yleensä anaerobinen. Kaikkien näiden vaihtoehtojen huomioon ottamiseksi tässä asiakirjassa selostetaan sekä aerobisia että anaerobisia testejä. Aerobisessa testissä simuloidaan aerobista vesipatsasta, jonka alla on aerobinen sedimenttikerros ja sen alla anaerobinen gradientti. Anaerobisessa testissä simuloidaan täysin anaerobista vesi-sedimenttijärjestelmää. Jos olosuhteet edellyttävät merkittävää poikkeamista näistä suosituksista, esimerkiksi sedimentistä otettujen käsittelemättömien kairausnäytteiden tai testiaineelle mahdollisesti altistuneiden sedimenttien käyttöä, voidaan käyttää muita testimenetelmiä (9).

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kaikissa tapauksissa on käytettävä kansainvälisen SI-standardin mukaisia yksikköjä.

Testiaine: mikä tahansa aine, joko alkutuote tai merkitykselliset hajoamistuotteet.

Hajoamistuotteet: kaikki aineet, jotka syntyvät testiaineen bioottisista tai abioottisista hajoamisreaktioista, mukaan luettuina CO_2 ja tuotteet, jotka ovat sitoutuneissa jäämissä.

Sitoutuneet jäämät: maaperässä, kasveissa tai eläimissä esiintyvät yhdisteet, jotka uuttamisen jälkeen säilyvät matriisissa alkutuotteen tai sen metaboliitin/hajoamistuotteen muodossa. Uuttomenetelmä ei saa olennaisesti muuttaa itse yhdisteitä tai matriisin rakennetta. Sidoksen luonnetta voidaan osittain selventää matriisia muuttavilla uuttomenetelmillä ja kehittyneillä analyysitekniikoilla. Tähän mennessä on tunnistettu esimerkiksi kovalenttisia ioni- ja sorptiosidoksia sekä eri materiaalien sisään jääneitä aineita (sulkeuma-aineita) tällä menetelmällä. Yleisesti voidaan todeta, että sitoutuneiden jäämien muodostuminen vähentää aineen biologista saatavuutta ja käytettävyyttä merkittävästi (10) [vuodelta 1984 olevaan IUPAC-nimikkeistöön tehty muutos (11)].

▼B

Aerobinen hajoaminen (muuntuminen): reaktiot, jotka tapahtuvat molekyylisen hapen läsnäollessa (12).

Anaerobinen hajoaminen: reaktiot, joihin ei osallistu molekyylistä happea (12).

Luonnonvedet: esimerkiksi lammista, joista ja virroista saadut pintavedet.

Sedimentti: sekoitus mineraalisia ja orgaanisia kemiallisia aineksia, joista jälkimmäiset sisältävät paljon hiiltä ja typpeä sisältäviä suurimolekyylisiä aineita. Sedimentti kerrostuu luonnonvesiin ja muodostaa rajapinnan veteen.

Mineralisaatio: orgaanisen yhdisteen täydellinen hajoaminen CO_2:ksi ja H_2O:ksi aerobisissa olosuhteissa sekä CH_4:ksi, CO_2:ksi ja H_2O:ksi anaerobisissa olosuhteissa. Kun käytetään leimana ^{14}C:ta tässä testimenetelmässä, mineralisaatio tarkoittaa laajaa hajoamista, jonka aikana leimattu hiiliatomi hapettuu tai pelkistyy ja vapauttaa vastaavan määrän $^{14}CO_2$:ta tai CH^4:ää.

Puoliintumisaika: $t_{0,5}$ on aika, joka kuluu testiaineen 50-prosenttiseen hajoamiseen tapauksissa, joissa hajoaminen voidaan kuvata ensimmäisen asteen kinetiikan avulla. Puoliintumisaika ei riipu konsentraatiosta.

Häviämisaika 50 (DT_{50}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 50 %:lla.

Häviämisaika 75 (DT_{75}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 75 %:lla.

Häviämisaika 90 (DT_{90}): aika, jonka kuluessa testiaineen konsentraatio vähenee 90 %:lla.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita on käytettävä hajoamistuotteiden karakterisointiin ja/tai tunnistukseen spektroskopia- ja krotomatografiamenetelmillä.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Hajoamisnopeuden mittaamiseen voidaan käyttää leimattua tai leimaamatonta testiainetta, vaikka leimatun aineen käyttöä suositellaan. Merkkiaineen käyttö on välttämätöntä tutkittaessa hajoamisreittejä ja määritettäessä massatasetta. ^{14}C on suositeltava leima, mutta muitakin isotooppeja, kuten ^{13}C:ta, ^{15}N:ta, ^{3}H:ta tai ^{32}P:ta, voidaan käyttää. Leiman pitäisi mahdollisuuksien mukaan sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa ([1]). Testiaineen kemiallisen ja/tai radiokemiallisen puhtausasteen on oltava vähintään 95 %.

Ennen testin tekemistä testiaineesta on oltava saatavilla seuraavat tiedot:

(a) vesiliukoisuus (menetelmä A.6);

(b) liukoisuus orgaanisiin liuottimiin;

(c) höyrynpaine (menetelmä A.4) ja Henryn lain vakio;

([1]) Jos testiaine sisältää esimerkiksi yhden renkaan, tämä rengas täytyy merkitä; jos testiaine sisältää kaksi tai useampia renkaita, saatetaan tarvita erillinen testi kunkin merkityn renkaan reitin arvioimiseksi ja tarvittavan tiedon saamiseksi hajoamistuotteiden muodostumisesta.

▼B

(d) n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin (menetelmä A.8);

(e) adsorptiokerroin (K_d, K_f tai K_{oc}, tapauksen mukaan) (menetelmä C. 18);

(f) hydrolyysi (menetelmä C.7);

(g) dissosiaatiovakio (pK_a) [OECD:n ohje 112] (13);

(h) testiaineen kemiallinen rakenne ja merkkiaineen isotoopin sijainti, jos merkkiainetta käytetään.

Huomautus: Raportissa on ilmoitettava lämpötila, jossa mittaukset on tehty.

Muita tarpeellisia tietoja saattavat olla tiedot testiaineen myrkyllisyydestä mikrobeille, tiedot nopeasta ja/tai inherentistä biologisesta hajoavuudesta sekä tiedot testiaineen aerobisesta ja anaerobisesta hajoamisesta maaperässä.

Käytettävissä on oltava analyysimenetelmät (myös uutto- ja puhdistusmenetelmät) testiaineen sekä sen hajoamistuotteiden kvantifioimiseksi ja tunnistamiseksi vedestä ja sedimentistä (katso kohta 1.7.2).

1.5 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tässä kuvatussa menetelmässä käytetään yhtä aerobista ja yhtä anaerobista vesiympäristön sedimenttijärjestelmää (katso liite 1), jolloin voidaan

i) mitata testiaineen muuttumisnopeus vesi-sedimenttijärjestelmässä;

ii) mitata testiaineen muuttumisnopeus sedimentissä;

iii) mitata testiaineen ja/tai sen hajoamistuotteiden mineralisaationopeus (kun leimana on ^{14}C);

(iv) tunnistaa ja määrittää hajoamistuotteet vesi- ja sedimenttifaasissa, mukaan luettuna massatase (kun käytetään merkkiainetta);

(v) mitata testiaineen ja sen hajoamistuotteiden jakautuminen kahteen faasiin pimeässä (esimerkiksi leväkukinnan välttämiseksi) tietyn inkubaatiojakson aikana vakiolämpötilassa. Puoliintumisajat, DT_{50}-, DT_{75}- ja DT_{90}-arvot määritetään, jos mittaustulokset sallivat sen, mutta arvoja ei pidä ekstrapoloida pitkälle koejakson yli (katso kohta 1.2).

Sekä aerobiseen että anaerobiseen tutkimukseen tarvitaan vähintään kaksi sedimenttinäytettä ja näytteet niihin kuuluvista vesistä (7). Joissakin tapauksissa voi kuitenkin olla tarpeen käyttää useampia kuin kahta vesiympäristön sedimenttiä, esimerkiksi jos kemikaali voi esiintyä makean veden ympäristössä ja/tai merivesiympäristössä.

▼B

1.6 TESTIN SOVELLUSALA

Menetelmää voidaan soveltaa kaikkiin kemiallisiin aineisiin (leimaamattomiin tai radioaktiivisella isotoopilla leimattuihin), joiden analysoimiseen on riittävän tarkka ja herkkä menetelmä. Tässä kuvattua menetelmää voidaan soveltaa lievästi haihtuviin, haihtumattomiin, vesiliukoisiin tai veteen liukenemattomiin yhdisteisiin. Menetelmää ei voida soveltaa kemikaaleihin, jotka haihtuvat helposti vedestä (esimerkiksi savuavat aineet tai orgaaniset liuottimet) ja jotka eivät siis säily vedessä ja/tai sedimentissä tässä kuvatuissa testiolosuhteissa.

Tähän mennessä menetelmällä on tutkittu kemikaalien muuntumista makeassa vedessä ja sedimenteissä, mutta periaatteessa menetelmää voidaan soveltaa jokisuisto- ja meriympäristöihin. Menetelmä ei sovellu virtaavien vesien, kuten jokien, tai avomeren olosuhteiden simulointiin.

1.7 LAATUVAATIMUKSET

1.7.1 **Saanto**

Vähintään kahden maaperänäytteen uutto ja analysointi heti testiaineen lisäämisen jälkeen antaa alustavia tietoja analyysimenetelmän toistettavuudesta ja sen testiaineeseen lisäämisen tasaisuudesta. Saanto testin myöhemmissä vaiheissa määritetään vastaavan massataseen mukaan. Saantojen tulisi olla 90-110 % käytettäessä merkkiainetta (6) ja 70-110 %, kun merkkiainetta ei käytetä.

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Analyysimenetelmän toistettavuus (lukuun ottamatta alussa tehtävän uuton tehokkuutta) testiaineen ja hajoamistuotteiden määritysten osalta voidaan tarkistaa kaksoismäärittämällä samasta vesi- tai sedimenttinäytteestä tehty uute, jota on inkuboitu niin kauan, että hajoamistuotteita on ehtinyt muodostua.

Testiaineen ja hajoamistuotteiden osalta analyysimenetelmän osoitusrajan (LOD) on oltava vähintään 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ vesi- tai sedimenttinäytettä (testiaine) tai 1 % käytetystä annoksesta sen mukaan, kumpi on pienempi. Määritysraja (LOQ) on myös määritettävä.

1.7.3 **Hajoamistesteissä saatujen tulosten luotettavuus**

Tiedot hajoamista kuvaavan käyrän luotettavuudesta saadaan tekemällä regressioanalyysi testiaineen konsentraatioista ajan funktiona, jolloin voidaan laskea puoliintumisaikojen luottamusvälit (näennäisen ensimmäisen asteen kinetiikan osalta) tai DT_{50}-arvot sekä tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvot.

1.8 MENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Testijärjestelmä ja -laitteet**

Testi on suoritettava lasiastioissa (esimerkiksi pulloissa tai sentrifugiputkissa), paitsi jos esitiedot (kuten n-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin tai sorptiotiedot) osoittavat, että testiaine saattaa kiinnittyä lasiin; tällöin voidaan harkita jonkin muun materiaalin, esimerkiksi teflonin, käyttöä. Jos testiaineen tiedetään kiinnittyvän lasiin, ongelmaa voidaan helpottaa yhdellä tai usealla seuraavista tavoista:

▼B

— Määritetään lasiin kiinnittyneen testiaineen ja hajoamistuotteiden massa.

— Pestään kaikki lasitavarat liuottimella testin päätyttyä.

— Käytetään kaupallisia valmisteita (katso myös kohta 1.9.2).

— Lisätään testiaine järjestelmään lisäliuottimen avulla; tällöin lisäliuottimen on oltava aine, joka ei aiheuta testiaineen hajaantumista.

Esimerkkejä tyypillisistä testilaitteista, eli läpivirtaus- ja Erlenmeyer-tyyppisistä järjestelmistä, on liitteissä 2 ja 3 (14). Muita käyttökelpoisia inkubointijärjestelmiä on esitetty lähteessä 15. Testilaitteiston on oltava rakenteeltaan sellainen, että ilman tai typen vaihto ja helposti haihtuvien tuotteiden talteenotto on mahdollista. Laitteiston mittojen täytyy täyttää testivaatimukset (katso kohta 1.9.1). Ilmanvaihto voidaan järjestää joko varovaisena kuplailmastuksena tai viemällä ilmaa tai typpeä veden pinnalle. Jälkimmäisessä tapauksessa on suositeltavaa sekoittaa vettä varovasti ylhäältäpäin, jotta happi tai typpi leviäisi paremmin veteen. CO_2:ta sisältämätöntä ilmaa ei pidä käyttää, koska se saattaa nostaa veden pH-arvoa. Molemmissa tapauksissa sedimentin häiritseminen ei ole suotavaa, ja sitä pitää mahdollisuuksien mukaan välttää. Haihtuvat kemikaalit on testattava Erlenmeyer-tyyppisessä järjestelmässä sekoittamalla veden pintaa varovasti. Voidaan myös käyttää suljettuja säiliöitä, joiden ilmatilassa on joko ilmakehän ilmaa tai typpeä ja astiat helposti haihtuvien aineiden talteen ottamiseksi (16). Aerobisessa testissä vaatimuksena on ilmatilan kaasun säännöllinen vaihtuminen, jolla kompensoidaan biomassan hapenkulutusta.

Sopivia erottimia helposti haihtuvien hajoamistuotteiden keräämiseen ovat muun muassa, mutta eivät ainoastaan, kaliumhydroksidi- tai natriumhydroksidiliuokset ($1\ mol \cdot dm^{-3}$) hiilidioksidin [1] keräämiseen sekä etyleeniglykoli, etanoliamiini tai ksyleeniin liuotettu 2-prosenttinen parafiini orgaanisten yhdisteiden keräämiseen. Anaerobisissa olosuhteissa muodostuneet helposti haihtuvat aineet, kuten metaani, voidaan kerätä esimerkiksi molekyyliseulalla. Tällaiset helposti haihtuvat aineet voidaan hapettaa esimerkiksi CO_2:ksi viemällä kaasu CuO:lla täytetyn kvartsiputken läpi 900 ^{o}C:n lämpötilassa ja erottamalla muodostunut CO_2 absorboivaan emäksiseen aineeseen (17).

Testiaineen ja sen hajoamistuotteiden kemiallista analyysia varten tarvitaan laboratoriolaitteita (esimerkiksi GLC eli kaasu-nestekromatograafi, HPLC eli korkean suorituskyvyn nestekromatograafi ja TLC eli ohutlevykromatografialaite, MS eli massaspektrometri tai GC-MS eli kaasukromatograafi-massaspektrometri tai NMR eli ydinmagneettiseen resonanssiin perustuva tutkimuslaite) sekä detektiojärjestelmät radioaktiivisia merkkiaineita sisältäville tai leimaamattomille kemikaaleille. Käytettäessä radioaktiivisia merkkiaineita tarvitaan myös nestetuikelaskin ja poltto- eli hapetinlaite (sedimenttinäytteiden polttamiseen ennen radioaktiivisten aineiden analyysia.

Testissä voidaan tarvita myös muita tavanomaisia laboratoriolaitteita fysikaalis-kemiallisiin tai biologisiin määrityksiin (katso taulukko 1, kohta 1.8.2.2), lasitavaraa, kemikaaleja ja reagensseja.

[1] Koska nämä emäksiset absorptioliuokset imevät myös tuuletusilman hiilidioksidin sekä aerobisissa testeissä soluhengityksen tuloksena syntyneen hiilidioksidin, ne on vaihdettava säännöllisesti, jotta vältetään niiden kyllästyminen ja siitä seuraava absorptiokyvyn menettäminen.

▼B

1.8.2 **Vesiympäristön sedimenttien valinta ja määrä**

Näytteenottopaikat on kaikissa tilanteissa valittava testin tarkoituksen mukaan. Näytteenottopaikkojen valinnassa on otettava huomioon valuma-alueen ja yläjuoksun mahdolliset maanviljely-, teollisuus- tai kotitaloussyötteet. Testissä ei saa käyttää sedimenttejä, jotka ovat altistuneet testiaineelle tai sen kanssa rakenteellisesti analogiselle aineelle viimeisten neljän vuoden aikana.

1.8.2.1 Sedimentin valinta

Aerobisissa testeissä käytetään tavallisesti kahta sedimenttiä (7). Valittujen kahden sedimentin on poikettava toisistaan orgaanisen hiilen pitoisuuden ja rakenteen osalta. Yhdessä sedimentissä on oltava suuri orgaanisen hiilen pitoisuus (2,5 - 7,5 %) ja hieno rakenne, toisessa taas pieni orgaanisen hiilen pitoisuus (0,5 - 2,5 %) ja karkea rakenne. Orgaanisen hiilen pitoisuuksien eron pitäisi yleensä olla vähintään 2 %. ”Hieno rakenne” merkitsee määritelmän mukaan > 50 %:n [savi + siltti] ([1]) -pitoisuutta, ja ”karkea rakenne” merkitsee < 50 %:n [savi + siltti]-pitoisuutta. Kahden sedimentin [savi + siltti]-pitoisuuden välisen eron pitäisi yleensä olla vähintään 20 %. Jos kemikaali saattaa päästä myös merivesiin, vähintään yhden vesiympäristösedimenttijärjestelmän on oltava peräisin merestä.

Pelkässä anaerobisessa testissä näytteet on otettava kahdesta sedimentistä (ja niihin kuuluvista vesistä) pintavesimassan anaerobiselta alueelta (7). Sekä sedimentti- että vesifaasi on käsiteltävä ja kuljetettava huolellisesti hapettomissa olosuhteissa.

Sedimenttien valintaan saattavat vaikuttaa muutkin parametrit, jotka on harkittava kussakin tapauksessa erikseen. Jos esimerkiksi testataan kemikaaleja, joiden muuntuminen ja/tai sorptio saattaa riippua pH-arvosta, sedimenttien pH-arvoalue on merkitsevä parametri. Sorption pH-riippuvuus saattaa heijastua testiaineen pK_a-arvossa.

1.8.2.2 Vesi-sedimenttinäytteiden karakterisointi

Seuraavassa taulukossa on esitetty keskeiset parametrit, jotka on mitattava ja raportoitava (käytetyn menetelmän lisäksi) sekä veden että sedimentin osalta, sekä testin vaihe, jonka kuluessa ne on määritettävä. Näiden parametrien määritysmenetelmät esitetään lähteissä 18, 19, 20 ja 21.

Lisäksi voi olla tarpeen mitata ja raportoida muitakin parametreja tapauskohtaisesti (esimerkiksi makean veden järjestelmistä hiukkaset, emäksisyys, kovuus, sähkönjohtokyky, NO_3/PO_4 (suhde ja erilliset arvot); sedimenteistä kationinvaihtokyky, vedenpidätyskyky, karbonaatti, typen ja fosforin kokonaismäärä; merivesijärjestelmistä suolaisuus). Nitraatin, sulfaatin, biologisesti käyttökelpoisen raudan ja mahdollisesti muiden elektronin vastaanottajien analysoiminen sedimenteistä ja vedestä voi myös olla tarpeen hapetus-pelkistysolosuhteiden arviointia varten, erityisesti anaerobisen muuttumisen osalta.

([1]) [Savi + siltti] on sedimentin mineraaliosa, jonka raekoko on <50 μm.

▼B

Vesi-sedimenttinäytteiden karakterisointiin tarvittavien parametrien mittaaminen (7)(22)(23)

Parametri	Testin vaihe					
	Näytteenotto kentältä	Jälkikäsittely	Akklimatisoitumisen alku	Testin alku	Testin aikana	Testin loppu
Vesi						
Alkuperä/lähde	X					
Lämpötila	X					
pH	X		X	X	X	X
Orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus			X	X		X
O_2-pitoisuus (*)	X		X	X	X	X
Hapetus-pelkistvspotentiaali (*)			X	X	X	X
Sedimentti						
Alkuperä/lähde	X					
Kerroksen paksuus	X					
pH		X	X	X	X	X
Partikkelien kokojakauma		X				
Orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus		X	X	X		X
Mikrobibiomassa (*)		X		X		X
Hapetus-pelkistyspotentiaali (**)	Havainnot (väri/haju)		X	X	X	X

(*) Aerobisissa tutkimuksissa mikrobien hengitysnopeusmenetelmä (26), savutusmenetelmä (27) tai pesäkkeiden laskeminen Petri-maljassa (esimerkiksi bakteerit, aktinomykeetit eli sädesienet, sienet ja pesäkkeiden kokonaismäärä); anaerobisissa tutkimuksissa metaanin muodostumisnopeus.

(**) Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että veden happipitoisuuden ja hapetus-pelkistyspotentiaalin mittauksilla ei ole sen paremmin mekanistista kuin ennustavaa arvoa, kun kysymys on pintavesien mikrobipopulaatioiden kasvusta ja kehityksestä (24)(25). Parempia välineitä aerobisen biomuuntumisen nopeuden ja reittien tulkintaan ja arvioimiseen voivat olla biokemiallinen hapenkulutus (näytteenoton yhteydessä sekä testin alussa ja lopussa mitattuna) sekä hivenaineiden/makroravinteiden Ca, Mg ja Mn konsentraatiot (testin alussa ja lopussa) vedessä sekä N:n ja P:n kokonaismäärät sedimentissä (näytettä otettaessa sekä testin lopussa).

1.8.3 **Näytteiden kerääminen, käsittely ja varastointi**

1.8.3.1 *Kerääminen*

Sedimenttinäytteitä otettaessa on sovellettava ISO:n pohjasedimenttinäytteiden ottamista koskevaa alustavaa ohjetta (S). Sedimenttinäytteet on otettava sedimentin ylimmästä kerroksesta (5-10 cm yläarajasta) koko kerroksen alueelta. Sedimenttiin kuuluvat vesinäytteet on kerättävä samasta paikasta ja samaan aikaan kuin sedimenttinäytekin. Anaerobisia tutkimuksia varten sedimenttinäyte ja siihen kuuluva vesinäyte on otettava ja kuljetettava hapettomissa olosuhteissa (28)(katso kohta 1.8.2.1). Joitakin näytteenottovälineitä kuvataan lähteissä (8)(23).

▼B

1.8.3.2 *Käsittely*

Sedimentti erotetaan vedestä suodattamalla ja märkäseulotaan 2 mm:n seulalla käyttäen ylimäärää tutkimuspaikalta otettua vettä, joka sitten heitetään pois. Tunnetut määrät sedimenttiä ja vettä sekoitetaan halutussa suhteessa (katso kohta 1.9.1) inkubointipulloissa ja valmistellaan akklimatisaatiojaksoa varten (katso kohta 1.8.4). Kun kyseessä on anaerobinen tutkimus, kaikki käsittelyn vaiheet on tehtävä hapettomissa olosuhteissa (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 *Varastointi*

Sedimentti- ja vesinäytteet on mieluiten käytettävä juuri kerättyinä, mutta jos näytteiden varastointi on välttämätöntä, sedimentti ja vesi on seulottava edellä kuvatulla tavalla ja varastoitava yhdessä vedellä kyllästettynä (6-10 cm:n vesikerroksessa) pimeässä, 4 ± 2 °C ([1]) -asteen lämpötilassa enintään neljän viikon ajan (7)(8)(23). Aerobisiin tutkimuksiin tarkoitetut näytteet on varastoitava niin, että ilmaa on vapaasti saatavilla (esimerkiksi avoimissa säiliöissä); anaerobisiin tutkimuksiin tarkoitetut näytteet puolestaan on varastoitava hapettomissa olosuhteissa. Kuljetuksen ja varastoinnin aikana sedimentti- ja vesinäytteet eivät saa jäätyä eikä sedimentti kuivua.

1.8.4 **Sedimentti- ja vesinäytteiden valmistelu testiä varten**

Ennen testiaineen lisäämistä näytteen on käytävä läpi akklimatisaatiojakso, jonka aikana kukin sedimentti- ja vesinäyte sijoitetaan varsinaisessa testissä käytettävään inkubaatiosäiliöön, ja akklimatisaation on tapahduttava täsmälleen samoissa olosuhteissa kuin testin inkubaatiojakson (katso kohta 1.9.1). Akklimatisaatiojakso on tarpeen, jotta järjestelmä saavuttaa kohtuullisen stabiilin tilan pH:n, veden happikonsentraation, sedimentin ja veden hapetus-pelkistyspotentiaalin sekä faasien makroskooppisen erottumisen osalta. Akklimatisaatiojakson suositeltu kesto on tavallisesti viikosta kahteen viikkoon, kuitenkin enintään neljä viikkoa. Tänä aikana mitatut määritystulokset on raportoitava.

1.9 TESTIN SUORITUS

1.9.1 **Testiolosuhteet**

Testi on suoritettava inkubointilaitteistossa (katso kohta 1.8.1), jossa veden ja sedimentin tilavuuden suhde on 3:1-4:1 ja sedimenttikerroksen paksuus on 2,5 cm (± 0,5 cm). Vähintään 50 g sedimenttiä (kuivapaino) suositellaan laitettavaksi inkubaatiosäiliöön.

Testi on suoritettava pimeässä vakioidussa lämpötilassa, jonka alue voi olla 10-30 °C. Suositeltava lämpötila on 20 ± 2 °C. Tarvittaessa voidaan tapauskohtaisesti käyttää toista, alempaa lämpötilaa (esimerkiksi 10 °C), sen mukaan, millaisia tietoja testistä halutaan saada. Inkubointilämpötilaa on tarkkailtava ja se on raportoitava.

([1]) Viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että varastointi 4 °C:n lämpötilassa saattaa vähentää sedimentin orgaanisen hiilen pitoisuutta, mikä puolestaan saattaa vähentää mikrobien toimintaa (34).

▼B

1.9.2 **Testiaineen käsittely ja annostelu**

Testissä käytetään yhtä testiaineen konsentraatiota ([1]). Kun testiaine on suoraan vesimassaan annosteltava kasvinsuojeluaine, aineen käyttöohjeissa oleva enimmäisannos tulkitaan enimmäisannostelumääräksi, joka lasketaan testisäiliössä olevan veden pinta-alan mukaan. Muissa tapauksissa testikonsentraation on perustuttava ympäristöpäästöjen perusteella tehtyihin ennusteisiin. Testiaineen oikea konsentraatio on valittava huolellisesti, jotta voidaan karakterisoida hajoamistuotteiden muodostuminen ja hajoaminen sekä niiden hajoamisreitit. Suurempienkin (esimerkiksi 10-kertaisten) testiaineannosten käyttö voi olla tarpeen tilanteissa, joissa testiaineen konsentraatiot ovat testin alussa lähellä havaitsemisrajaa ja/tai joissa pääasiallisia hajoamistuotteita ei voida helposti havaita, kun niiden osuus on 10 % testiaineen annostelumäärästä. Jos käytetään suurempia testiaineen konsentraatioita, ne eivät saa merkittävästi haitata vesi-sedimenttijärjestelmän mikrobien toimintaa. Jotta testiaineen konsentraatio erikokoisissa säiliöissä olisi sama, testiaineen määrää voidaan mukauttaa säiliön vesipatsaan syvyyden mukaan suhteessa veden syvyyteen tutkittavassa ympäristössä (oletusarvo on 100 cm, mutta muitakin syvyyksiä voidaan käyttää). Esimerkkilaskelma on liitteessä 4.

Ihannetapauksessa testiaine annostellaan vesiliuoksena testijärjestelmän vesifaasiin. Pakottavista syistä testiaineen annostelussa ja levittämisessä voidaan käyttää pieniä määriä veteen sekoittuvia liuottimia (esimerkiksi asetonia ja etanolia), mutta niiden määrä ei saa olla enempää kuin 1 % v/v, eivätkä ne saa haitata testijärjestelmän mikrobien toimintaa. Testiaineen vesiliuos on valmistettava huolella; täydellisen homogeenisyyden varmistamiseksi voi olla tarpeen käyttää kehitinkolonneja ja esisekoitusta. Kun vesiliuos on lisätty testijärjestelmään, on suositeltavaa sekoittaa vettä varovasti siten, että sedimenttiä häiritään mahdollisimman vähän.

Kaupallisten valmisteiden käyttö testissä ei ole yleensä suositeltavaa, koska valmisteen ainesosat voivat vaikuttaa testiaineen ja/tai hajoamistuotteiden jakautumiseen vesi- ja sedimenttifaasin välillä. Se voi kuitenkin tulla kysymykseen esimerkiksi veteen heikosti liukenevien testiaineiden kohdalla.

Inkubointisäiliöiden määrä riippuu näytteenottokertojen määrästä (katso kohta 1.9.3). Testissä on oltava riittävästi mitattavia näytteitä, sillä kullakin näytteenottokerralla kuluu kaksi mittausnäytettä. Jos kustakin vesiympäristön sedimenttijärjestelmästä tehdään kontrollinäyte, niitä ei käsitellä testiaineella. Kontrollinäytteitä voidaan käyttää sedimentin mikrobibiomassan sekä veden ja sedimentin orgaanisen hiilen kokonaismäärän määrittämiseen testin lopuksi. Kahta kontrollinäytettä (yksi kontrollinäyte kustakin vesiympäristön sedimentistä) voidaan käyttää akklimatisaatiojakson aikana tarvittavien vesi- ja sedimenttiparametrien tarkkailemiseen (katso taulukko kohdassa 1.8.2.2). Jos testiaine annostellaan liuottimen avulla, tarvitaan lisäksi kaksi kontrollinäytettä, jotta voidaan mitata testijärjestelmän haittavaikutukset mikrobien toimintaan.

([1]) Kahden konsentraation käyttäminen voi olla hyödyllistä testattaessa kemikaaleja, jotka päätyvät pintavesiin eri reittejä ja esiintyvät niissä merkittävästi erilaisina konsentraatioina, kunhan pienempi konsentraatio on analysoitavissa riittävän tarkasti.

▼B

1.9.3 **Testin kesto ja näytteenotto**

Testi saa tavallisesti kestää enintään 100 päivää (6), ja sitä on jatkettava niin kauan, kunnes hajoamisreitit sekä jakautuminen veteen ja sedimenttiin on selvitetty tai 90 % testiaineesta on hävinnyt muuntumisen tai haihtumisen kautta. Näytteenottokertoja on oltava ainakin kuusi (mukaan luettuna näytteenottokerta 0), ja ennen testiä voidaan tehdä vapaaehtoinen esitesti (katso kohta 1.9.4), jonka aikana päätetään asianmukaiset näytteenottojärjestelyt sekä testin kesto, mikäli riittäviä tietoja testiaineesta ei ole saatavissa aikaisemmista tutkimuksista. Kun testataan hydrofobisia aineita, testin alkuvaiheessa saatetaan tarvita ylimääräisiä näytteenottoajankohtia, jotta voidaan määrittää testiaineen jakautumisnopeus vesifaasin ja sedimenttifaasin välillä.

Asianmukaisina näytteenottoaikoina inkubointisäiliöt (rinnakkaisnäytteineen) irrotetaan kokonaisuudessaan analyysia varten. Sedimentti ja sen päällä oleva vesi analysoidaan erikseen ([1]). Pintavesi on poistettava varovasti niin, että sedimenttiä häiritään mahdollisimman vähän. Testiaineen ja hajoamistuotteiden eristämisessä ja karakterisoinnissa on noudatettava asianmukaisia analyysikäytäntöjä. Myös inkubointisäiliöön tai haihtuvien aineiden erottimen putkiin mahdollisesti adsorboitunut materiaali on huolellisesti poistettava.

1.9.4 **Vapaaehtoinen esitesti**

Jos testin kestoa ja näytteenottokäytäntöä ei voida päättää muiden testiainetta koskevien relevanttien tutkimusten perusteella, vapaaehtoinen esitesti voi olla tarpeen. Esitesti on tehtävä samoissa olosuhteissa, joissa varsinainen testi suunnitellaan tehtävän. Jos esitesti tehdään, olennaiset testiolosuhteet ja määritystulokset on lyhyesti raportoitava.

1.9.5 **Mittaukset ja analyysi**

Jokaisella näytteenottokerralla mitataan ja raportoidaan testiaineen ja hajoamistuotteiden konsentraatio vedessä ja sedimentissä (konsentraationa ja prosenttina testiaineen annostellusta määrästä). Yleisesti voidaan todeta, että hajoamistuotteet, jotka havaitaan $\geq$ 10 %:n pitoisuuksina annostellusta radioaktiivisesta aineesta vesi-sedimenttikokonaisjärjestelmässä millä tahansa näytteenottokerralla, on tunnistettava, paitsi mikäli muulle menettelylle on pätevät perusteet. On myös syytä harkita sellaisten hajoamistuotteiden tunnistusta, joiden konsentraatiot kasvavat jatkuvasti testin aikana, vaikka niiden konsentraatiot eivät ylittäisikään edellä esitettyjä rajoja, koska tämä voi merkitä tuotteiden pysyvyyttä. Nämä seikat on harkittava tapauskohtaisesti ja perustelut on esitettävä testiselosteessa.

Määritystulokset kaasujen tai helposti haihtuvien aineiden (CO_2:n ja vastaavien helposti haihtuvien orgaanisten yhdisteiden) erotinjärjestelmistä on raportoitava kullakin näytteenottokerralla. Mineralisaationopeus on myös raportoitava. Uuttumattomat (sitoutuneet) jäämät sedimentissä on raportoitava kullakin näytteenottokerralla.

([1]) Tapauksissa, joissa anaerobiset hajoamistuotteet voivat hapettua uudelleen nopeasti, on huolehdittava anaerobisten olosuhteiden säilymisestä näytteenoton ja analyysin aikana.

▼B

2. **MITTAUSTULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Lisätyn radioaktiivisen aineen kokonaismassatase tai saanto (katso kohta 1.7.1) on laskettava jokaisella näytteenottokerralla. Määritystulokset on raportoitava prosenttina lisätystä radioaktiivisesta aineesta. Radioaktiivisen aineen jakautuminen veden ja sedimentin välille on raportoitava konsentraationa ja prosenttiosuutena jokaisella näytteenottokerralla.

Testiaineen puoliintumisaika, DT_{50}- ja tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvot on laskettava luottamusväleineen (katso kohta 1.7.3). Tiedot testiaineen häviämisnopeudesta vedessä ja sedimentissä saadaan asianmukaisin arviointimenetelmin. Tällaisia voivat olla näennäisen ensimmäisen asteen kinetiikan käyttö, graafisia tai numeerisia ratkaisuja käyttävät empiiriset käyrän sovitukset sekä monimutkaisemmat arviointimenetelmät, joissa käytetään esimerkiksi yhden tai usean lohkon malleja. Lisätietoja on esitetty lähteissä (35)(36)(37).

Kaikissa lähestymistavoissa on omat vahvuutensa ja heikkoutensa, ja niiden monimutkaisuus vaihtelee suuresti. Ensimmäisen asteen kinetiikka voi yksinkertaistaa hajoamis- ja jakautumisprosesseja liikaa, mutta tapauksissa, joissa sitä voidaan käyttää, sen avulla saadaan suure (nopeusvakio tai puoliintumisaika), joka on helppotajuinen ja käyttökelpoinen simulaatiomallinnuksessa ja ennustettujen ympäristökonsentraatioiden laskennassa. Empiirisillä lähestymistavoilla tai lineaarisilla muunnoksilla voidaan tuottaa paremmin aineistoon sopivia käyriä ja siten tarkempia arvioita puoliintumisajoista, DT_{50}- ja tarvittaessa DT_{75}- ja DT_{90}-arvoista. Derivoitujen vakioiden käyttökelpoisuus on kuitenkin rajoitettua. Lohkomalleilla voidaan luoda riskien arviointia varten useita käyttökelpoisia vakioita, jotka kuvaavat hajoamisnopeutta eri lohkoissa sekä kemikaalin jakautumista. Lohkomalleja on käytettävä myös pääasiallisten hajoamistuotteiden muodostumis- ja hajoamisnopeusvakioiden arviointiin. Valitun menetelmän on kaikissa tapauksissa oltava perusteltu, ja testaajan on esitettävä sovituksen hyvyys graafisesti ja/tai tilastollisesti.

3. **TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

3.1 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman tai leimojen sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysiko-kemialliset ominaisuudet,

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineena käytetyn kemikaalin radiokemiallinen puhtaus ja molaarinen aktiivisuus tapauksen mukaan.

▼B

Vertailuaineet:

— hajoamistuotteen karakterisointiin ja/tai tunnistukseen käytettävän vertailuaineen kemiallinen nimi ja rakenne.

Testissä käytettävät sedimentti- ja vesinäytteet:

— vesiympäristöstä otetun sedimentin keräyspaikan tai -paikkojen sijainti ja kuvaus, mukaan luettuna taustatiedot saastumisesta, jos ne ovat saatavissa,

— täydelliset tiedot vesi-sedimenttijärjestelmän keräämisestä, varastoinnista (jos näytettä on varastoitu) sekä akklimatisaatiosta,

— vesi-sedimenttinäytteiden ominaisuudet kohdan 1.8.2.2 taulukon mukaan.

Testiolosuhteet:

— testissä käytetty järjestelmä (esimerkiksi läpivirtaus- tai Erlenmeyer-järjestelmä, ilmastus- ja sekoitustapa, veden tilavuus, sedimentin massa, sekä vesi- että sedimenttikerroksen paksuus ja testisäiliöiden mitat),

— testiaineen annostelu testijärjestelmään: testissä käytetyt konsentraatiot, rinnakkais- ja kontrollinäytteiden määrä, testiaineen annostelutapa (esimerkiksi liuottimen käyttö),

— inkubointilämpötila,

— näytteenottoajat,

— eristysmenetelmät ja -tehokkuudet sekä analyysimenetelmät ja osoitusrajat,

— hajoamistuotteiden karakterisointi- ja tunnistusmenetelmät,

— testin aikana tapahtuneet poikkeamat testiohjeista tai suositelluista olosuhteista.

Tulokset:

— edustavien analyysien mittaustulokset (kaikki mittaustulokset on tallennettava laboratorion arkistoon),

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys,

— saanto (validin testin prosenttiarvot on esitetty kohdassa 1.7.1),

— tulokset taulukkomuodossa, ilmoitetaan testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden sekä uuttumattomien radioaktiivisten aineiden prosenttiosuutena alkuperäisestä annoksesta ja tarvittaessa $mg \cdot kg^{-1}$ vedessä, sedimentissä ja kokonaisjärjestelmässä (vain prosentteina),

— massatase testien aikana ja niiden lopuksi,

— graafinen esitys testiaineen muuntumisesta vesi- ja sedimenttiosajärjestelmissä sekä kokonaisjärjestelmässä (mineralisaatio mukaan luettuna),

— mineralisaationopeudet,

▼B

— testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden puoliintumisaika sekä tarvittaessa DT_{50}-, DT_{75}- ja DT_{90}-arvot vedessä, sedimentissä ja kokonaisjärjestelmässä,

— arvio testiaineen ja tarvittaessa pääasiallisten hajoamistuotteiden hajoamiskinetiikasta,

— arvio oletetuista hajoamisreiteistä tapauksen mukaan,

— tulosten pohdinta.

4. **LÄHDELUETTELO**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{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. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(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.

▼B

LIITE 1

AEROBISIIN JA ANAEROBISIIN TESTIJÄRJESTELMIIN LIITTYVIÄ OHJEITA

Aerobinen testijärjestelmä

Tässä menetelmässä kuvattu aerobinen testijärjestelmä koostuu aerobisesta vesikerroksesta (tyypillinen happikonsentraatio on 7-10 mg · l^{-1}) ja sedimenttikerroksesta, joka on aerobinen pinnalta ja anaerobinen sen alta (tyypillinen hapetus-pelkistyspotentiaalien (E_h) keskiarvo sedimentin anaerobisella alueella on - 80 ... - 190 mV). Kussakin inkubointiyksikössä viedään kosteutettua ilmaa veden pinnalle riittävän happimäärän varmistamiseksi ilmatilassa.

Anaerobinen testijärjestelmä

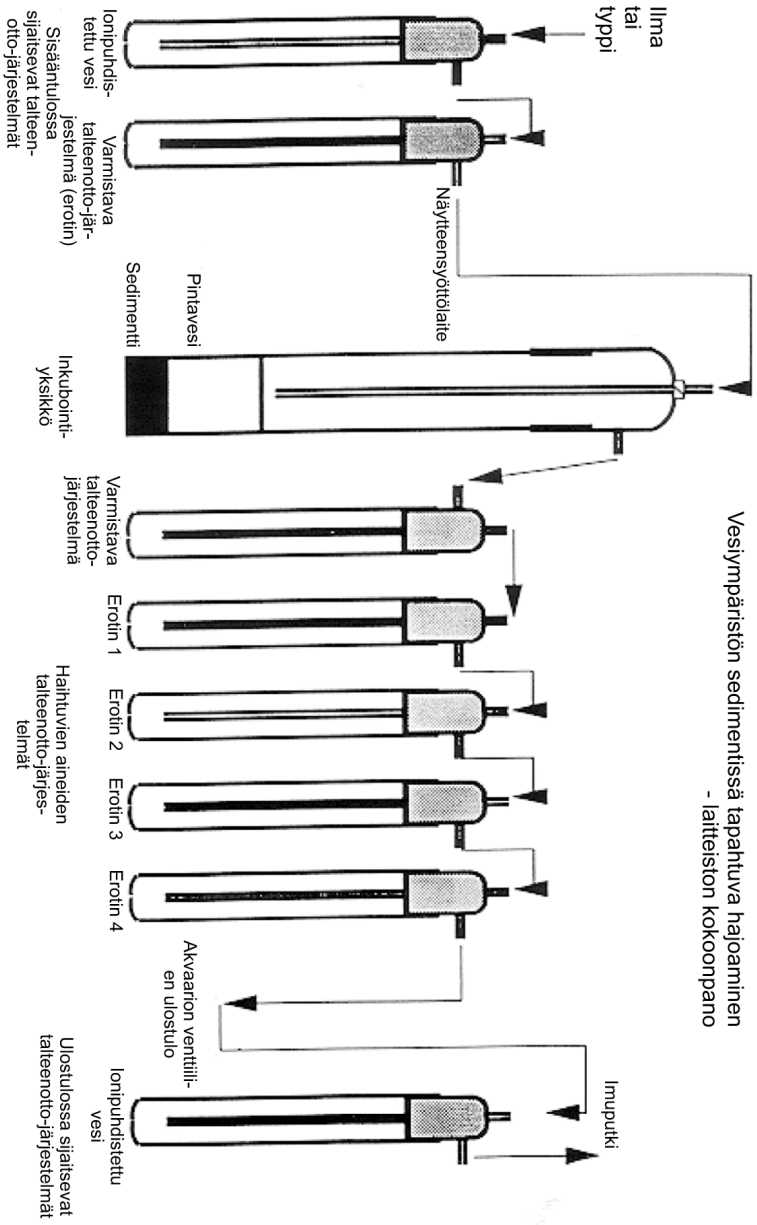
Anaerobisessa testijärjestelmässä testimenettely on olennaisilta osin sama kuin aerobisessa järjestelmässä sillä poikkeuksella, että kussakin inkubointiyksikössä veden pinnalle viedään kosteutettua typpeä riittävän typpimäärän varmistamiseksi ilmatilassa. Sedimenttiä ja vettä voidaan pitää anaerobisina heti, kun hapetus-pelkistyspotentiaali (E_h) on alle - 100 mV.

Anaerobisessa testissä mineralisaation arviointiin kuuluu myös näytteessä kehittyneen hiilidioksidin ja metaanin mittaus.

▼B

LIITE 2

ESIMERKKI LÄPIVIRTAUSJÄRJESTELMÄSTÄ

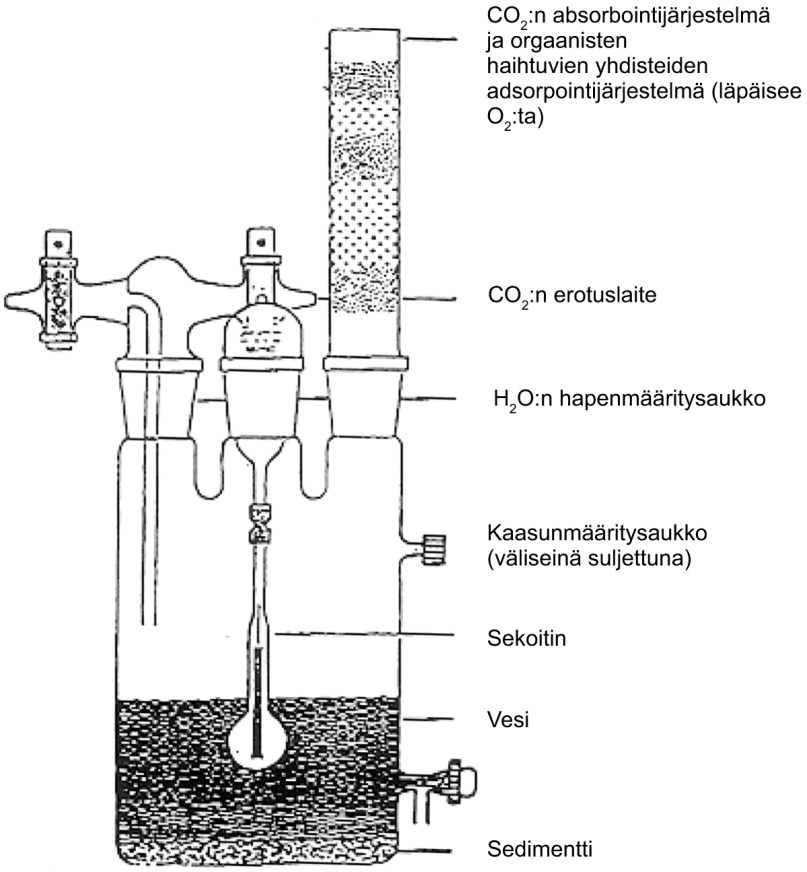


Varmistava talteenottojärjestelmä, tyhjä
Erotin 1:
etyleeniglykoliin otetaan orgaaniset haihtuvat aineet
Erotin 2:
rikkihappoon (0,1 M) otetaan emäksiset haihtuvat aineet
Erottimet 3 & 4:
natriumhydroksidiin (2M) otetaan CO_2 ja muut happamat haihtuvat aineet

▼B

LIITE 3

ESIMERKKI
ERLENMEYER-LAITTEESTA (BIOMETER)



▼B

LIITE 4

ESIMERKKILASKELMA TESTIAINEEN ANNOSTELUSTA TESTISÄILIÖIHIN

Lieriön sisähalkaisija:	= 8 cm
Vesipatsaan syvyys sedimentti poisluettuna:	= 12 cm
Pinta-ala: 3,142 $x4^2$	= 50,3 cm^2
Annostus: 500 g testiainetta/ha vastaa 5 µg/cm^2	
Yhteensä µg: 5 x 50,3	= 251,5 µg
Mukautettu määrä suhteessa 100 cm:n syvyyteen: 12 x 251,5 ÷ 100	= 30,18 µg
Vesipatsaan tilavuus: 50,3 x 12	= 603 ml
Konsentraatio vedessä: 30,18 ÷ 603	= 0,050 µg/ml tai 50 µg/l

▼M1

C.25. **AEROBINEN MINERALISAATIO PINTAVEDESSÄ – BIOHAJOAVUUDEN SIMULAATIOTESTI**

1 **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 309 (2004) (1).

1.1 JOHDANTO

Tämän testin tarkoituksena on mitata aerobisessa luonnonvedessä pienenä pitoisuutena olevan testiaineen biohajoavuus ajan funktiona ja kvantifioida havainnot kineettisten nopeuslausekkeiden muodossa. Tämä simulaatiotesti on laboratoriossa panoskokeena (*batch*) suoritettava ravistelutesti, jossa määritetään luonnon pintavesinäytteissä (makea vesi, murtovesi tai merivesi) olevien orgaanisten aineiden aerobisen biohajoavuuden nopeudet. Se perustuu ISO/DIS 14592–1 -testiin (2) ja sisältää myös osia testimenetelmistä C.23 ja C.24 (3)(4). Jos testi on pitkäkestoinen, panosprosessi voidaan korvata puolijatkuvalla prosessilla, jotta estettäisiin testiorganismin huononeminen. Simulaatiotestin ensijaisena tavoitteena on määrittää testiaineen mineralisaatio pintavedessä, ja mineralisaatio muodostaa perustan hajoamiskinetiikan esittämiselle. Toissijaisesti testissä voidaan tutkia primaarista hajoamista ja merkittävien muuntumistuotteiden muodostumista. Muuntumistuotteiden yksilöinti ja mahdollisuuksien mukaan niiden pitoisuuksien määrittäminen on erityisen tärkeää, kun on kyse hitaasti mineralisoituvista aineista (esim. ^{14}C:n kokonaisjäännöksen puoliintumisaikojen ollessa yli 60 päivää). Analyysitekniikoiden rajoitusten vuoksi merkittävien muuntumistuotteiden yksilöinti ja niiden pitoisuuksien määritys edellyttävät tavallisesti testiaineen käyttöä suurempina pitoisuuksina (esim. > 100 µg/l).

Pieni pitoisuus merkitsee tässä testissä pitoisuutta (esim. alle 1 µg/l – 100 µg/l), joka on tarpeeksi alhainen, jotta testin biohajoavuuskinetiikka vastaa ympäristössä ennakoitavaa biohajoavuuskinetiikkaa. Testissä käytetyssä luonnonvedessä olevien biohajoavien hiilisubstraattien kokonaismassaan verrattuna testiaine, joka on pienenä pitoisuutena, on toissijainen substraatti. Tämä merkitsee, että ennakoitu biohajoavuuskinetiikka on ensimmäistä kertalukua (ei kasvua) ja että testiaine voi hajota metabolisten reaktioiden sivuvaikutuksena (cometabolism). Ensimmäisen kertaluvun kinetiikassa hajoamisnopeus (mg/L/päivä) on suhteessa substraatin pitoisuuteen, joka pienenee ajan myötä. Aidossa ensimmäisen kertaluvun kinetiikassa spesifinen hajoamisen nopeusvakio k ei riipu ajasta eikä pitoisuudesta. Toisin sanoen k:n arvo ei vaihtele merkittävästi kokeen aikana eikä muutu lisättäessä pitoisuutta kokeiden välillä. Spesifinen hajoamisen nopeusvakio vastaa pitoisuuden suhteellista muutosta aikayksikköä kohti: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Vaikka kuvatuissa olosuhteissa ennakoidaan ensimmäisen kertaluokan kinetiikkaa, eräät mahdolliset olosuhteet voivat suosia muuntyyppistä kinetiikkaa. Reaktio voi poiketa ensimmäisen kertaluvun kinetiikasta esimerkiksi siinä tapauksessa, jos aineensiirtoon liittyvät ilmiöt, kuten diffuusionopeus (ei biologisen reaktion nopeus) rajoittaa biotransformaation nopeutta. Data voidaan kuitenkin lähes aina kuvata pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan mukaisesti, jolloin nopeusvakio voi olla pitoisuudesta riippuvainen.

▼M1

Kokeen suunnittelun ja tulosten tulkinnan tueksi pitäisi etukäteen olla käytettävissä (esim. vakioseulontatesteistä saatavia) tietoja testiaineen biohajoavuudesta suuremmilla pitoisuuksilla sekä tietoja abioottisesta hajoavuudesta, muuntumistuotteista ja relevanteista fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. ^{14}C-leimalla merkittyjen testiaineiden käyttö ja ^{14}C:n faasijakauman määritys testin lopussa mahdollistavat lopullisen biohajoavuuden määrityksen. Käytettäessä leimaamattomia testiaineita lopullinen biohajoavuus voidaan arvioida vain siinä tapauksessa, että testataan suurempi pitoisuus ja että kaikki pääasialliset muuntumistuotteet tunnetaan.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Primaarinen biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen rakenteellinen muutos (transformaatio), jonka seurauksena aine menettää kemiallisen rakenteensa.

Funktionaalinen biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen rakenteellinen muutos (transformaatio), jonka seurauksena aine menettää jonkin erityisen ominaisuuden.

Lopullinen (aerobinen) biohajoaminen: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen hajoaminen hapen vaikutuksesta hiilidioksidiksi, vedeksi ja muiden aineiden kivennäissuoloiksi (mineralisaatio) sekä uuden biomassan ja orgaanisten mikrobiologisten biosynteesituotteiden tuottaminen.

Mineralisaatio: Mikro-organismien aiheuttama kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen hajoaminen hapen vaikutuksen vuoksi hiilidioksidiksi, vedeksi ja muiden aineiden kivennäissuoloiksi.

Lag-vaihe: Aika testin alusta siihen, kun hajottavien mikro-organismien adaptaatio on tapahtunut ja kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen biohajoamisaste on havaittavalla tasolla (esim. 10 % biohajoamisen teoreettisesta enimmäistasosta tai tätä alempi, riippuen mittaustekniikan tarkkuudesta).

Biohajoamisen enimmäistaso: Kemiallisen aineen tai orgaanisen aineen se prosentteina ilmaistu biohajoamistaso testissä, jonka jälkeen biohajoamista ei enää tapahdu testissä.

Ensisijainen substraatti: Kaikki luonnolliset hiilen ja energian lähteet, joiden ansiosta mikrobibiomassa voi kasvaa ja säilyä.

Toissijainen substraatti: Substraatin osa, joka on niin pienenä pitoisuutena, että sen biohajoamisesta vapautuu vain merkityksettömiä määriä hiiltä ja energiaa kompetenteille mikro-organismeille verrattuna hiileen ja energiaan, jotka vapautuvat pääasiallisten substraatin osien (ensisijaisten substraattien) hajoamisesta.

Hajoamisen nopeusvakio: Ensimmäisen kertaluvun tai pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan nopeusvakio k (d^{-1}), joka ilmaisee hajoamisprosessien nopeuden. Panoskokeessa k estimoidaan lag-vaihetta seuraavasta hajoamiskäyrän ensimmäisestä osasta.

▼M1

Puoliintumisaika, $t_{1/2}$ (d): Ensimmäisen kertaluokan reaktion nopeuden kuvaamiseen käytettävä parametri. Se on aikaväli, joka vastaa pitoisuuden vähenemistä puoleen. Puoliintumisajan ja hajoamisen nopeusvakion välinen yhtälö on $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Hajoamisen puoliintumisaika, DT_{50} (d): Biohajoamistestien tuloksen kvantifiointiin käytettävä parametri. Se on aikaväli (mukaan luettuna lag-vaihe), joka tarvitaan 50 prosentin biohajoamisen saavuttamiseen.

Havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ): Havaitsemisraja (*limit of detection*, LOD) on se aineen pitoisuus, jonka alapuolella ainetta ei voida erottaa määritysartefaktoista. Määritysraja (*limit of quantification*, LOQ) on se aineen pitoisuus, jonka alapuolella pitoisuutta ei voida määritää hyväksyttävällä tarkkuudella.

Liennut orgaaninen hiili (*dissolved organic carbon*, DOC): Se orgaanisen hiilen osa vesinäytteessä, jota ei voida erottaa testiohjeen mukaisella faasierotuksella, esimerkiksi sentrifugioimalla nopeudella 40 000 ms^{-2} 15 minuutin ajan tai kalvosuodatuksella käyttäen kalvoja, joiden huokoskoko on 0,2 μm–0,45 μm.

Orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuus (*total organic ^{14}C activity*, TOA): Orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

Liukoisen orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus (*dissolved organic ^{14}C activity*, DOA): Liukoiseen orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

Partikkelimuodossa olevan orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus (*particulate organic ^{14}C activity*, POA): Partikkelimuodossa olevaan orgaaniseen hiileen liittyvä ^{14}C-kokonaisaktiivisuus.

1.3 TESTIN SOVELLUSALA

Tätä simulaatiotestiä voidaan soveltaa pieninä pitoisuuksina testattaviin haihtumattomiin tai lievästi haihtuviin orgaanisiin aineisiin. Käytettäessä pulloja, joita ei ole suljettu ilmalta (esim. vanutupoilla suljettuja pulloja), käytännössä haihtumattomina voidaan pitää aineita, joiden Henryn lain vakio on alle noin 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (arviolta 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$). Käytettäessä suljettuja pulloja, joissa on vapaa ilmatila, voidaan testata lievästi haihtuvia aineita (joiden Henryn lain vakio on < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ tai $< 10^{-3}$ $atm \cdot m^3/mol$) ilman vuotoja testijärjestelmästä. ^{14}C-leimattuja aineita voidaan menettää CO_2:n poiston yhteydessä, jos tarvittaviin varokeinoihin ei ryhdytä. Tällaisissa tilanteissa voi olla tarpeen imeyttää CO_2 absorboivaan emäksiseen aineeseen testijärjestelmän sisällä tai käyttää ulkoista CO_2-absorbointijärjestelmää (suora $^{14}CO_2$:n määritys; ks. liite 3). Biohajoavuuskinetiikan määrittämiseksi testiaineen pitoisuuden on oltava sen vesiliukoisuusrajan alapuolella. On huomattava, että lähdekirjallisuudesta saadut vesiliukoisuuden arvot voivat olla merkittävästi suurempia kuin testiaineen liukoisuus luonnonvedessä. Erityisen huonosti veteen liukenevien testiaineiden liukoisuus voidaan määrittää myös käyttämällä testattavaa luonnonvettä.

Menetelmää voidaan käyttää biohajoavuuden simulointiin pintavedesssä, jossa ei ole karkeita hiukkasia (”pelaginen testi”), tai sameassa pintavedessä esimerkiksi lähellä veden ja sedimentin rajapintaa (”suspendoituneen sedimentin testi”).

▼M1

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testi suoritetaan panoskokeena (*batch*) inkuboimalla testiainetta joko pelkästään pintavedellä (pelaginen testi) tai pintavedellä, jossa on suspendoitunutta kiintoainesta tai sedimenttiä kuiva-aineena 0,01–1 g/L (suspendoituneen sedimentin testi). Tällä tavoin testillä simuloidaan vesistöä, jossa on suspendoitunutta kiintoainesta tai uudelleen suspendoitunutta sedimenttiä. Useimmissa pintavesissä suspendoitunut kiintoaines tai sedimetti on tyypillisesti pitoisuuksina, jotka sijoittuvat mainitun asteikon alapäähän. Testipulloja inkuboidaan pimeässä ympäristön lämpötilassa aerobisissa olosuhteissa ja jatkuvasti sekoittaen. Ainakin kahta testiaineen pitoisuutta tulisi käyttää, jotta hajoavuuskinetiikka voidaan määrittää. Pitoisuuksien välillä tulisi olla 5–10-kertainen ero, ja niiden tulisi edustaa pitoisuuksia, joiden odotetaan vallitsevan ympäristössä. Testiaineen enimmäispitoisuus ei saisi olla yli 100 µg/L. Suosituksena on kuitenkin, että se on alle 10 µg/L. Näin varmistetaan, että biohajoavuus noudattaa ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa. Vähimmäispitoisuus ei saisi olla yli 10 µg/L, mutta suosituksena on, että se on 1–2 µg/L tai alle 1 µg/L. Näin pieni pitoisuus mahdollistaa normaalisti riittävän analyysin käytettäessä kaupallisesti saatavilla olevia ^{14}C-leimattuja aineita. Analyysimenetelmien rajoitusten vuoksi testiaineen pitoisuutta on usein mahdoton mitata vaadittavalla tarkkuudella, jos annosteltu testiaineen pitoisuus ≤ 100 µg/L (ks. kohta 1.7.2, toinen kappale). Suurempia testiaineen pitoisuuksia (> 100 µg/L ja joskus > 1 mg/L) voidaan käyttää merkittävien muuntumistuotteiden yksilöintiin ja niiden pitoisuuksien määritykseen tai jos käytettävissä ei ole analyysimenetelmää, jonka havaitsemisraja on tarpeeksi alhainen. Jos testiainetta testataan suurina pitoisuuksina, tuloksia ei ehkä ole mahdollista käyttää ensimmäisen kertaluvun vakion ja puoliintumisajan estimointiin, koska hajoaminen ei todennäköisesti seuraa ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa.

Hajoamista seurataan sopivin aikavälein mittaamalla joko jäännös-^{14}C tai testiaineen jäännöspitoisuus (jos käytetään erityistä kemiallista analyysia). ^{14}C-leima molekyylin stabiileimmassa osassa varmistaa sen, että koko mineralisaatio voidaan määrittää. Jos ^{14}C-leima on vähemmän stabiilissa molekyylin osassa tai jos käytetään erityistä kemiallista analyysia, voidaan arvioida vain primaarinen biohajoaminen. Stabiilein osa ei kuitenkaan välttämättä sisällä molekyylin toiminnan kannalta relevanttia osaa (joka voidaan kytkeä erityiseen ominaisuuteen, kuten toksisuuteen, bioakkumulaatioon jne.). Tällöin voi olla tarkoituksenmukaista käyttää ^{14}C-leimattua testiainetta kyseisessä toiminnan kannalta relevantissa osassa, jos on määrä seurata erityisen ominaisuuden eliminaatiota.

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Sekä radioaktiivisella merkkiaineella leimattuja että leimaamattomia testiaineita voidaan käyttää tässä testissä. ^{14}C on suositeltava leima, ja sen pitäisi tavallisesti sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa (ks. myös kohta 1.4). Jos on kyse aineista, joissa on useampi kuin yksi aromaattinen rengas, on suositeltavaa, että yksi tai useampi hiili kussakin renkaassa varustetaan ^{14}C-leimalla. Lisäksi suositellaan, että helposti hajoavien liitosten kummallakin puolella yksi tai useampi hiili varustetaan ^{14}C-leimalla. Testiaineen kemiallisen ja/tai radiokemiallisen puhtauden tulisi olla > 95 %. Kun on kyse radioaktiivisella merkkiaineella merkityistä aineista, suositeltava spesifinen aktiivisuus on noin 50 µCi/mg (1,85 MBq) tai tämän yli, jotta helpotettaisiin ^{14}C-mittauksia pienillä lähtöpitoisuuksilla tehtävissä testeissä. Testiaineesta tulisi olla käytettävissä seuraavat tiedot:

▼M1

— vesiliukoisuus [testimenetelmä A.6],

— liukoisuus orgaanisiin liuottimiin (liuottimella käsitellyt aineet tai huonosti veteen liukenevat aineet),

— dissosiaatiovakio (pKa), jos aine protonoituu tai deprotonoituu [OECD TG 112] (5),

— höyrynpaine [testimenetelmä A.4] ja Henryn lain vakio,

— kemiallinen stabiilius vedessä ja pimeässä (hydrolyysi) [testimenetelmä C.7].

Testattaessa huonosti veteen liukenevia aineita merivedessä voi olla hyödyllistä tietää myös ulossuolautumisvakio (Setschenowin vakio) K^s, joka voidaan määrittää seuraavasta lausekkeesta: log (S/S") = K^s C_m, missä S on aineen liukenevuus makeassa vedessä ja S" aineen liukenevuus merivedessä ja C_m molaarinen suolapitoisuus.

Jos testi suoritetaan "suspendoituneen sedimentin testinä", myös seuraavien tietojen tulisi olla käytettävissä:

— n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin [testimenetelmä A.8],

— adsorptiokerroin [testimenetelmä C.18].

Myös seuraavat tiedot voivat olla hyödyllisiä:

— ympäristöpitoisuus, jos se tiedetään tai on estimoitu,

— testiaineen toksisuus mikro-organismeille [testimenetelmä C.11],

— nopea biohajoavuus (*ready biodegradability*) ja/tai aineen luontainen biohajoavuus (*inherent biodegradability*) [testimenetelmät C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],

— aerobinen tai anaerobinen biohajoavuus maassa sekä muuntumistutkimusten tulokset (sedimentti/vesi) [menetelmät C.23, C.24].

1.6 VERTAILUAINE

Vertailuaineena tulisi käyttää ainetta, joka on helposti hajoava aerobisissa olosuhteissa (esim. aniliini tai natriumbentsoaatti). Aniliinin ja natriumbentsoaatin odotettu hajoamisaika on yleensä alle 2 viikkoa. Vertailuaineiden tarkoituksena on varmistaa, että testiveden mikrobiologinen aktiviteetti on tietyissä rajoissa, ts. että vedessä on aktiivinen mikrobipopulaatio.

▼M1

1.7 LAATUKRITEERIT

1.7.1 **Saanto**

Kukin alkuperäinen testipitoisuus tulisi välittömästi testiaineen lisäämisen jälkeen tarkistaa mittaamalla ^{14}C-aktiviteetti tai (jos on kyse testiaineesta, jota ei ole leimattu merkkiaineella) kemiallisella analyysillä vähintään kahdessa näytteessä. Tämä tarjoaa tietoa analyysimenetelmän sovellettavuudesta ja toistettavuudesta ja testiaineen jakauman tasaisuudesta. Tavallisesti myöhemmissä tulosten analyyseissä käytetään alussa mitattua ^{14}C-aktiivisuutta tai testiaineen pitoisuutta eikä nimellispitoisuutta, koska tällä tavoin voidaan ottaa huomioon sorptiosta ja annosteluvirheistä johtuvat häviöt. ^{14}C-leimatun testiaineen osalta saanto testin lopussa ilmoitetaan massataseena (ks. kohta 1.8.9.4, viimeinen kappale). Ihannetapauksessa massataseen tulisi radioaktiivisella merkkiaineella leimattuja aineita käytettäessä olla 90–110 %, ja analyyttisen tarkkuuden tulisi olla sellainen, että merkitsemättömien testiaineiden alkuperäiseksi saannoksi testin alussa saadaan 70–110 %. Näitä vaihteluvälejä tulisi pitää tavoitteina eikä perusteina testin hyväksynnälle. Vaihtoehtoisesti analyyttinen tarkkuus voidaan määrittää testiaineelle alkuperäistä pitoisuutta pienemmällä pitoisuudella sekä merkittäville muuntumistuotteille.

1.7.2 **Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys**

Analyysimenetelmän toistettavuus (mukaan luettuna alussa tehtävän uuton tehokkuus) testiaineen ja tapauksen mukaan muuntumistuotteiden kvantifioimiseksi tulisi tarkistaa viidellä rinnakkaisella analyysillä pintaveden yksittäisistä uutteista.

Analyysimenetelmän havaitsemisrajan (LOD) tulisi testiaineen ja muuntumistuotteiden osalta olla mahdollisuuksien mukaan ainakin 1 % testijärjestelmään annostellusta alkuperäisestä määrästä. Määritysrajan (LOQ) tulisi olla 10 % annostellusta pitoisuudesta tai tätä alempi. Monien orgaanisten aineiden ja niiden muuntumistuotteiden kemialliset analyysit edellyttävät usein, että testiaine annostellaan suhteellisen suurina pitoisuuksina (> 100 µg/L).

1.8 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.8.1 **Laitteet**

Testi voidaan tehdä sopivan suuruisissa (esim. 0,5 tai 1,0 litran) erlenmeyerpulloissa tai sylinteripulloissa, jotka on suljettu silikoni- tai kumitulpilla, tai seerumipulloissa, joissa on hiidioksidia läpäisemättömät kannet (esim. butyylikumikalvo). Toisena vaihtoehtona on suorittaa testi useilla pulloilla ja ottaa niiden joukosta kunakin näytteenottoajankohtana näytteeksi vähintään kahden pullon sisältö (ks. kohta 1.8.9.1, viimeinen kappale). Jos testiaineet ovat haihtumattomia eikä niitä ole leimattu radioaktiivisella merkkiaineella, kaasutiiviitä tulppia tai kansia ei vaadita; väljät puuvillatupot, jotka estävät kontaminaation ympäröivästä ilmasta, riittävät (ks. kohta 1.8.9.1, toinen kappale). Lievästi haihtuvat aineet tulisi testata biometer-tyyppisessä järjestelmässä, jossa veden pintaa sekoitetaan kevyesti. Bakteerikontaminaation estämiseksi astiat voidaan vaihtoehtoisesti sterilisoida kuumentamalla tai autoklaavikäsittelyllä ennen käyttöä. Lisäksi käytetään seuraavia tavanomaisia laboratoriolaitteita:

— ravistin tai magneettisekoittimet testipullojen jatkuvaa sekoittamista varten,

▼M1

— sentrifugi,

— pH-mittari,

— sameusmittari sameuden nefelometristä määritystä varten,

— uuni tai mikroaaltouuni kuiva-ainemäärityksiä varten,

— kalvosuodatin,

— autoklaavi tai uuni lasiastioiden sterilointia varten,

— laitteet ^{14}C-leimattujen aineiden käsittelyyn,

— laitteet, joilla kvantifioidaan ^{14}C-aktiivisuus CO_2:n imeytysliuoksista otetuissa näytteissä ja tarvittaessa sedimenttinäytteissä,

— analyysilaitteet testiaineen (ja vertailuaineen) määritystä varten, jos käytetään erityistä kemiallista analyysia (esim. kaasukromatografi tai korkean paineen nestekromatografi).

1.8.2 **Testiaineen varastoliuokset**

Testi- ja vertailuaineen varastoliuosten valmistamiseen käytetään deionisoitua vettä (ks. kohta 1.8.7, ensimmäinen kappale). Deionisoidussa vedessä ei saa olla aineita, jotka voivat olla toksisia mikro-organismeille, eikä liukoista orgaanista hiiltä (DOC) yli 1 mg/L (6).

1.8.3 **Pintaveden otto ja kuljetus**

Pintaveden näytteenottopaikka tulisi valita siten, että se vastaa testin tarkoitusta. Näytteenottopaikkojen valinnassa on otettava huomioon mahdollinen maanviljelyn, teollisuuden ja kotitalouksien vaikutus. Jos tiedetään, että vesiympäristö on kontaminoitunut testiaineen tai sitä rakenteeltaan vastaavien aineiden vaikutuksesta edellisten neljän vuoden aikana, sitä ei pitäisi käyttää testiveden ottoon, jollei nimenomaisena tarkoituksena ole tutkia hajoamisnopeuksia jo altistuneissa kohteissa. Veden pH-arvo ja lämpötila tulisi mitata näytteenottopaikassa. Lisäksi tulisi kirjata näytteenottosyvyys ja vesinäytteen ulkonäkö (esim. väri ja sameus). Happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) vedessä ja sedimentin pintakerroksessa mitataan aerobisten ominaisuuksien osoittamiseksi, elleivät ne käy selville vesinäytteen ulkonäöstä ja kohteessa aiemmin saaduista kokemuksista. Pintavesi tulisi kuljettaa täysin puhdistetussa astiassa. Kuljetuksen aikana näytteen lämpötila ei saa merkittävästi ylittää testissä käytettävää lämpötilaa. Viilentäminen 4 °C:seen on suositeltavaa, jos kuljetuksen kesto on yli 2–3 tuntia. Vesinäyte ei saa jäätyä.

▼M1

1.8.4 **Pintaveden säilytys ja valmistelu**

Testi on suositeltavaa aloittaa yhden päivän kuluessa näytteenotosta. Jos vettä joudutaan säilyttämään, säilytysaika on minimoitava, eikä se saa missään tapauksessa ylittää neljää viikkoa. Vesinäytettä olisi pidettävä 4 °C:ssa ilmastettuna sen käyttöön saakka. Karkeat hiukkaset poistetaan ennen käyttöä esimerkiksi suodattamalla nailonsuodattimen (aukkokoko noin 100 μm) tai karkean paperisuodattimen läpi tai sedimentoimalla.

1.8.5 **Sellaisen vesinäytteen valmistelu, johon on lisätty sedimenttiä (vaihtoehtoinen)**

Suspendoituneen sedimentin testissä pintasedimenttiä lisätään luonnonveden (joka on suodatettu karkeiden hiukkasten poistamiseksi kohdassa 1.8.4 kuvatulla tavalla) sisältäviin pulloihin suspension aikaansaamiseksi. Suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuuden pitäisi olla 0,01–1 g/L. Pintasedimentin tulisi olla samasta kohteesta, josta vesinäyte otettiin. Kulloisestakin vesiympäristöstä riippuen pintasedimentille voi olla ominaista joko suuri orgaanisen hiilen määrä (2,5–7,5 %) ja hienojakoisuus tai matala orgaanisen hiilen määrä (0,5–2,5 %) ja karkeajakoisuus (3). Pintasedimentti voidaan valmistaa seuraavasti: sedimentistä otetaan useita kairausnäytteitä käyttäen läpinäkyvää muoviputkea, ja ylemmät aerobiset kerrokset (pinnasta enintään 5 mm:n syvyyteen) leikataan pois välittömästi näytteenoton jälkeen ja yhdistetään. Näin saatava sedimenttinäyte kuljetetaan säiliössä, jossa on laaja vapaa ilmatila, jotta sedimentti pysyisi aerobisissa olosuhteissa (näyte on viilennettävä 4 °C:seen, jos kuljetus kestää yli 2–3 tuntia). Sedimenttinäyte suspendoidaan testiveteen suhteessa 1:10 ja pidetään 4 °C:ssa ilmastettuna aina käyttöön saakka. Jos sedimenttiä joudutaan säilyttämään, säilytysaika on minimoitava, eikä se saa missään tapauksessa ylittää neljää viikkoa.

1.8.6 **Puolijatkuva menettely (vaihtoehtoinen)**

Pitkä inkuboimisaika (useita kuukausia) voi olla tarpeen, jos lag-vaihe kestää pitkään ennen kuin merkittävää testiaineen hajoamista voidaan mitata. Jos tämä tiedetään jo aikaisempien testien perusteella, testissä voidaan alusta lähtien käyttää puolijatkuvaa menettelyä, jossa osa testivedestä tai suspensiosta korvataan määräajoin uudella vedellä. Vaihtoehtoisesti normaali panoskoe (*batch*) voidaan muuttaa testin aikana puolijatkuvaksi testiksi, jos testiaineen hajoamista ei ole tapahtunut noin 60 päivän kuluessa panostestimenettelyä käyttäen (ks. kohta 1.8.8.3, toinen kappale).

1.8.7 **Testiaineen (tai vertailuaineen) lisääminen**

Jos aineen vesiliukoisuus on suuri (> 1 mg/L) ja haihtuvuus pieni (Henryn lain vakio < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ tai < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), varastoliuos voidaan valmistaa deionisoituun veteen (ks. kohta 1.8.2), minkä jälkeen sopiva määrä varastoliuosta lisätään testiastioihin, kunnes haluttu pitoisuus on saavutettu. Lisätyn varastoliuoksen määrä tulisi pitää mahdollisimman pienenä (mahdollisuuksien mukaan < 10 % lopullisesta nestevolyymista). Toisena mahdollisuutena on liuottaa testiaine suurempana volyyminä testiveteen; tätä voidaan pitää vaihtoehtona orgaanisten liuottimien käytölle.

▼M1

Jos muuta mahdollisuutta ei ole, haihtumattomien ja heikosti veteen liukenevien aineiden varastoliuokset tulisi valmistaa käyttämällä haihtuvaa orgaanista liuotinta, mutta testijärjestelmään lisätyn liuottimen määrä ei saisi ylittää 1 % (v/v) eikä vaikuttaa haitallisesti mikrobiologiseen aktiivisuuteen. Liuotin ei saa vaikuttaa testiaineen stabiiliuteen vedessä. Liuotin tulisi poistaa, kunnes sitä on jäljellä äärimmäisen pieni määrä, jottei se lisäisi merkittävästi testiveden tai suspension DOC-pitoisuutta. Tämä tulisi tarkistaa ainekohtaisella analyysillä tai DOC-analyysilla, jos se on mahdollista (6). Huolehdittaessa siitä, että lisätyn liuottimen määrä rajoitetaan välttämättömään, on samalla varmistettava, että testiainemäärä voi liueta lopullisessa testiveden määrässä. Myös muita tapoja annostella testiaine testiastioihin voidaan käyttää (ks. (7) ja (8)). Jos testiaineen annostelussa käytetään orgaanista liuotinta, liuotinkontrolleja, jotka sisältävät pelkästään testivettä (ilman lisättyjä aineita) sekä testivettä, johon on lisätty vertailuaine, on käsiteltävä samalla tavoin kuin aktiivisia testiastioita, joissa on testiaine kantoaineenaan liuotin. Liuotinkontrollien tarkoituksena on tutkia liuottimen mikrobipopulaatiolle mahdollisesti aiheuttamia haitallisia vaikutuksia vertailuaineen hajoamisen perusteella.

1.8.8 **Testiolosuhteet**

1.8.8.1 *Testilämpötila*

Inkubaation tulisi tapahtua pimeässä (suositeltava vaihtoehto) tai heikossa valossa säädellyssä (± 2 °C) lämpötilassa, joka voi olla ympäristön lämpötila tai 20–25 °C:n vakiolämpötila. Ympäristön lämpötila voi olla joko näytteen oma lämpötila näytteenottoajankohtana tai ympäristön keskilämpötila näytteenottopaikassa.

1.8.8.2 *Sekoittaminen*

Testipulloja sekoitetaan ravistelemalla tai hämmentämällä niitä jatkuvasti, jotta hiukkaset ja mikro-organismit pysyisivät suspendoituneina. Sekoittaminen myös auttaa hapen siirtymistä avoimesta ilmatilasta nesteeseen, niin että voidaan ylläpitää riittäviä aerobisia olosuhteita. Testipullot asetetaan ravistimeen (noin 100 rpm), tai niitä sekoitetaan magneettisekoittimella. Sekoittamisen on oltava jatkuvaa. Ravistelun tai hämmentämisen on kuitenkin oltava mahdollisimman varovaista siten, että suspensio juuri ja juuri pysyy homogeenisena.

1.8.8.3 *Testin kesto*

Testi ei saisi tavallisesti kestää yli 60 päivää, jollei käytetä puolijatkuvaa prosessia, jossa testisuspensiota korvataan määrävälein uudella (ks. kohta 1.8.6 ja liite 2). Testin kesto panoskokeessa voidaan kuitenkin pidentää enimmillään 90 päivään, jos testiaineen hajoaminen on alkanut ensimmäisten 60 päivän aikana. Hajoamista seurataan sopivin aikavälein määrittämällä ^{14}C-jäännösaktiivisuus tai muodostunut $^{14}CO_2$ (ks. kohta 1.8.9.4) ja/tai kemiallisella analyysilla (kohta 1.8.9.5). Inkubaatioajan on oltava riittävän pitkä, jotta hajoamisprosessi voidaan arvioida. On suositeltavaa, että hajoamisen laajuus on yli 50 %. Hitaasti hajoavien aineiden osalta hajoamisen laajuuden on oltava riittävä (tavallisesti yli 20 %), jotta hajoamiskinetiikan nopeusvakio voidaan estimoida.

▼M1

Happipitoisuus ja pH on mitattava testijärjestelmässä määrävälein, jolleivät nämä mittaukset ole tarpeettomia samasta kohteesta otetuilla vesi- ja sedimenttinäytteillä tehdyistä vastaavista testeistä saadun kokemuksen perusteella. Vedessä tai sedimentissä paljon suurempina pitoisuuksina olevien ensisijaisten substraattien metabolismi saattaa joissain olosuhteissa johtaa CO_2:n muodostumiseen ja hapen häviämiseen siinä määrin, että se muuttaa merkittävästi koeolosuhteita testin aikana.

1.8.9 **Menettely**

1.8.9.1 *Testipullojen valmistelu pelagiseen testiin*

Sopiva määrä testivettä siirretään testipulloihin, enintään noin kolmasosa pullon volyymistä ja vähintään noin 100 ml. Jos käytetään useita pulloja (joiden joukosta otetaan näytteeksi kokonaisten pullojen sisältö kunakin näytteenottoajankohtana), sopiva testiveden määrä on niin ikään noin 100 ml, koska pienet näytemäärät voivat vaikuttaa lag-vaiheen pituuteen. Testiaine lisätään varastoliuoksesta kohdissa 1.8.2 ja 1.8.7 kuvatulla tavalla. Ainakin kahta eri testiaineen pitoisuutta, jotka poikkeavat toisistaan 5–10-kertaisesti, tulisi käyttää hajoamiskinetiikan määrittämiseksi ja sen nopeusvakion laskemiseksi. Kummakin valitun pitoisuuden pitäisi olla alle 100 µg/L ja mieluiten välillä < 1–10 µg/L.

Testipullot suljetaan ilma- ja CO_2-tiiviillä tulpilla tai kansilla. Haihtumattomille testikemikaaleille, joita ei ole merkitty ^{14}C-leimalla, soveltuvat väljät vanutupot, jotka estävät kontaminaation ilmasta (ks. kohta 1.8.1). Edellytyksenä on kuitenkin, että mahdollisten merkittävien hajoamistuotteiden tiedetään olevan hajoamattomia ja että käytetään epäsuoraa CO_2-pitoisuuden määritystä (ks. liite 3).

Testipulloja inkuboidaan valitussa lämpötilassa (ks. kohta 1.8.8.1). Testin alussa (ennen biohajoamisen alkamista, ks. kohta 1.7.1) otetaan näytteitä kemiallista analyysia tai ^{14}C-mittauksia varten ja sen jälkeen sopivin välein testin aikana. Näytteenotto voidaan suorittaa ottamalla osanäyte (esim. 5 ml) kustakin rinnakkaisesta näytteestä tai ottamalla näytteeksi kokonaisia testipulloja kunakin näytteenottoajankohtana. Testiaineen mineralisaatio voidaan määrittää joko epäsuorana tai suorana määrityksenä (ks. liite 3). Hajoamisvaiheen aikana (eli lag-vaiheen päätyttyä) tarvitaan tavallisesti vähintään viisi näytteenottoa, jotta nopeusvakio voidaan estimoida luotettavasti, jollei voida perustella, että kolme näytteenottoa riittää nopeasti hajoaville aineille. Jos aine ei ole nopeasti hajoava, hajoamisvaiheen aikana voidaan helposti tehdä lisää mittauksia, jolloin k:n estimointiin käytetään enemmän datapisteitä. Näytteenottoa varten ei voida vahvistaa aikaväliä, koska biohajoamisen nopeus vaihtelee. Suosituksena on kuitenkin, että näyte otetaan kerran viikossa, jos hajoaminen on hidasta. Jos testiaine on nopeasti hajoava, näytteenoton tulisi tapahtua kerran päivässä ensimmäisten kolmen päivän aikana ja sen jälkeen joka toinen tai kolmas päivä. Joissain olosuhteissa, esimerkiksi hyvin nopeasti hydrolisoituvien aineiden tapauksessa, voi olla tarpeen ottaa näytteet tunnin välein. Ennen testiä on suositeltavaa tehdä esitutkimus sopivan näytteenottovälin määrittämiseksi. Jos käytettävissä on oltava näytteitä myöhempiä erityisiä analyyseja varten, näytteitä otetaan enemmän ja analysoitavat näytteet valitaan kokeen lopussa vastakkaisessa järjestyksessä siten, että viimeiset näytteet analysoidaan ensin (näytteiden stabiiliudesta varastoinnin aikana ks. kohta 1.8.9.5, toinen kappale).

▼**M1**

1.8.9.2 *Testipullojen ja näytteiden lukumäärä*

Testipulloja tarvitaan seuraavasti:

— testipullot: ainakin kaksi testipulloa kutakin testiaineen pitoisuutta varten (suositeltava määrä on vähintään kolme) tai useampia testipulloja kutakin pitoisuutta kohti, jos kunakin näytteenottoajankohtana otetaan otetaan näytteeksi kokonaisia pulloja (lyhenne F_T),

— testipullot massataseen laskemista varten: ainakin kaksi testipulloa kutakin pitoisuutta kohti (lyhenne F_M),

— nollanäyte ilman testiainetta: ainakin yksi taustanäytepullo, joka sisältää pelkästään testivettä (lyhenne F_B),

— vertailukontrolli: kaksi testipulloa, joissa on vertailuaine (esim. aniliini tai natriumbentsoaattia 10 µg/l) (lyhenne F_C). Vertailukontrollin tarkoituksena on vahvistaa tietyn mikrobiologisen aktiviteetin olemassaolo. Radioaktiivista vertailuainetta voidaan käyttää, jos se on käytännöllistä, myös siinä tapauksessa, että testiaineen hajoamista seurataan kemiallisella analyysilla,

— steriili kontrolli: yksi tai kaksi testipulloa, jotka sisältävät steriloitua testivettä, jotta voidaan tutkia mahdollista abioottista hajoamista tai muuta testiaineen ei-biologista häviämistä (lyhenne F_S). Biologinen aktiivisuus voidaan lopettaa testiveden autoklaavikäsittelyllä (20 min 121 °C:ssa) tai lisäämällä myrkyllistä ainetta (esim. natriumatsidia (NaN_3) 10–20 g/l, elohopeakloridia ($HgCl_2$) 100 mg/l tai formaliinia 100 mg/l) tai gammasäteilytyksellä. Käytettäessä $HgCl_2$:a siitä tulisi huolehtia myrkyllisenä jätteenä. Steriilien olosuhteiden luominen veteen ei ole helppoa, jos se sisältää sedimenttiä suurina määrinä. Tässä tapauksessa suositellaan autoklaavikäsittelyn toistamista (esim. suorittamalla se kolmesti). Tällöin tulisi ottaa huomioon, että sedimentin sorptio-ominaisuudet voivat muuttua autoklaavikäsittelyn vuoksi,

— liuotinkontrollit, jotka sisältävät pelkästään testivettä sekä testivettä, johon on lisätty vertailuaine; kutakin kontrollia kohti kaksi testipulloa, jotka sisältävät saman määrän liuotinta ja joita käsitellään samalla tavoin kuin testiaineen annostelemisessa. Tarkoituksena on tutkia mahdollisia liuoksen haitallisia vaikutuksia määrittämällä vertailuaineen hajoaminen.

Testiä suunniteltaessa tulisi ottaa huomioon, miten testien määrän lisääminen vaikuttaa näytteenottoajankohtien määrään. Tarvittavien testipullojen tarkka määrä riippuu hajoamisen laskentaan käytetystä menetelmästä (ks. kohta 1.8.9.1, kolmas kappale; kohta 1.8.9.4 ja liite 3).

▼**M1**

Kustakin testipullosta tulisi ottaa kaksi osanäytettä (esim. 5 ml) kunakin näytteenottoajankohtana. Jos käytetään useampia pulloja, joiden joukosta otetaan näytteet kokonaisten pullojen sisältöinä, vähintään kahden testipullon sisältö tulisi ottaa näytteeksi kunakin näytteenottoajankohtana (ks. kohta 1.8.9.1, ensimmäinen kappale).

1.8.9.3 *Testipullojen valmistelu suspendoituneen sedimentin testiä varten [vaihtoehtoinen]*

Tarvittavat määrät testivettä ja (tarvittaessa) sedimenttiä lisätään testipulloihin (ks. kohta 1.8.5). Testipullot valmistellaan suspendoituneen sedimentin testiä varten samalla tavoin kuin pelagista testiä varten (ks. kohdat 1.8.9.1 ja 1.8.9.2). Suosituksena on käyttää seerumipulloja tai niiden muotoisia testipulloja. Suljetut testipullot asetetaan ravistimeen vaaka-asentoon. ^{14}C-leimalla varustamattomia haihtumattomia aineita sisältävät avoimet testipullot asetetaan pystyasentoon. Tässä tapauksessa suositellaan sekoitusta magneettisekoittimella, jossa käytetään lasipinnoitteisia magneettisauvoja. Tarvittaessa testipulloja on ilmastettava aerobisten olosuhteiden ylläpitämiseksi.

1.8.9.4 *Radiokemialliset määritykset*

Muodostunut $^{14}CO_2$ mitataan epäsuorana ja suorana määrityksenä (ks. liite 3). $^{14}CO_2$:n epäsuora määritys tapahtuu määrittämällä testissä käytetyn veden tai suspension alkuperäisen ^{14}C-aktiivisuuden ja näytteenottoajankohtana mitatun jäännösaktiivisuuden kokonaismäärän välinen erotus sen jälkeen, kun näyte on happamoitettu pH-arvoon 2–3 ja CO_2 poistettu. Koska epäorgaaninen hiili poistetaan, mitattu jäännösaktiivisuus on peräisin orgaanisesta materiaalista. Epäsuoraa $^{14}CO_2$:n määritystä ei tulisi käyttää, jos testiaineen muuntumisen aikana muodostuu merkittäviä haihtuvia muuntumistuotteita (ks. liite 3). $^{14}CO_2$:n muodostuminen tulisi mahdollisuuksien mukaan mitata suorana määrityksenä (ks. liite 3) kunakin näytteenottoajankohtana vähintään yhdessä testipullossa. Tällä menettelyllä voidaan tarkistaa sekä massatase että biohajoamisprosessi, mutta sitä voidaan käyttää vain suljetuilla testipulloilla tehtävissä testeissä.

Jo muodostunut $^{14}CO_2$ mitataan suorana määrityksenä testin aikana, tätä varten tulisi varata enemmän testipulloja testin alussa. Suoraa $^{14}CO_2$:n määritystä suositellaan, jos testiaineen muuntumisen aikana muodostuu merkittäviä haihtuvia muuntumistuotteita. Lisätestipullot happamoitetaan kunakin näytteenottoajankohtana pH-arvoon 2–3 ja $^{14}CO_2$ erotetaan sisäiseen tai ulkoiseen imeyttimeen (ks. liite 3).

^{14}C-leimatun testiaineen ja merkittävien muuntumistuotteiden pitoisuudet voidaan vaitoehtoisesti määrittää käyttämällä radiokromatografiaa (esim. RAD-TLC-ohutkerroskromatografiaa) tai HPLC:tä radiokemiallisella detektiolla.

Vaihtoehtoisesti voidaan määrittää jäljellä olevan radioaktiivisuuden faasijakauma (ks. liite 1) ja jäljellä oleva testiaine ja muuntumistuotteet.

▼M1

Testin lopussa massatase tulisi määrittää suoralla $^{14}CO_2$:n mittauksella käyttäen erillisiä testipulloja, joista ei ole otettu näytteitä testin aikana (ks. liite 3).

1.8.9.5 *Erityinen kemiallinen analyysi*

Jos käytettävissä on herkkä erityinen analyysimenetelmä, primaarinen biohajoaminen voidaan arvioida mittaamalla testiaineen kokonaisjäännöspitoisuus sen sijaan, että käytettäisiin radioaktiivisia merkkiaineita. Käytettäessä radioaktiivisella merkkiaineella leimattua testiainetta (kokonaismineralisaation mittaamiseksi) erityisiä kemiallisia analyyseja voidaan tehdä samanaikaisesti, sillä niiden avulla voidaan saada hyödyllisiä lisätietoja ja arvioida menettelyä. Erityistä kemiallista analyysia voidaan myös käyttää testiaineen hajoamisen aikana syntyneiden muuntumistuotteiden mittaamiseksi, ja tätä suositellaan aineille, joiden mineraalisaatio tapahtuu yli 60 päivän puoliintumisajoin. Testiaineen pitoisuus ja muuntumistuotteet kunakin näytteenottoajankohtana tulisi mitata ja kirjata testiselosteeseen (pitoisuutena ja prosenttiosuutena). Yleisesti muuntumistuotteet, joiden prosenttiosuuden todetaan olevan ≥ 10 % annostellusta pitoisuudesta minä tahansa näytteenottoajankohtana, olisi yksilöitävä, ellei ole perusteltua jättää tätä tekemättä. Lisäksi on harkittava sellaisten muuntumistuotteiden yksilöimistä, joiden pitoisuudet kasvavat jatkuvasti testin aikana, vaikka niiden pitoisuudet eivät ylittäisi edellä mainittua rajaa, sillä pitoisuuden jatkuva kasvu voi olla merkkinä pysyvyydestä. Muuntumistuotteiden analyysia steriileissä kontrolleissa olisi harkittava, jos testiaineen nopean abioottisen muuntumisen (esim. hydrolyysin) katsotaan olevan mahdollista. Muuntumistuotteiden kvantifioinnin ja yksilöinnin tarvetta tulisi harkita tapauskohtaisesti, ja se tulisi perustella testiselosteessa. Uuttomenetelmiä, joissa käytetään orgaanista liuotinta, tulisi soveltaa kyseistä analyysimenetelmää varten annettuja ohjeita noudattaen.

Kaikki näytteet varastoidaan ilmatiiviisti 2–4 °C:n lämpötilassa, jos analyysi tehdään 24 tunnin sisällä (suositeltava vaihtoehto). Tätä pitempää säilytystä varten näytteet olisi jäädytettävä alle –18 °C:seen tai säilöttävä kemiallisesti. Happamoittaminen ei ole suositeltava keino näytteiden säilömiseksi, koska happamoitetut näytteet voivat olla epästabiileja. Jos näytteitä ei analysoida 24 tunnin kuluessa ja niitä säilytetään pitempään, olisi tehtävä tutkimus niiden stabiiliudesta varastoinnin aikana, jotta voidaan osoittaa kyseisten kemikaalien stabiilius alle –18 °C:n lämpötilassa tai säilöntäoloissa. Jos analyysimenetelmä edellyttää joko liuotinuuttoa tai kiinteäfaasiuuttoa (SPE), uutto tulisi tehdä välittömästi näytteenoton jälkeen tai enintään 24 tunnin kylmävarastoinnin jälkeen.

Analyysimenetelmän herkkyydestä riippuen voidaan tarvita suurempia näytemääriä kuin 1.8.1 kohdassa mainitaan. Testi voidaan helposti suorittaa yhden litran testivolyymeilla 2–3 litran testipulloissa, jolloin voidaan ottaa noin 100 ml:n suuruisia näytteitä.

▼M1

2. **TULOKSET JA TESTISELOSTE**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

2.1.1 **Tulosten graafinen esitys**

Näytteenottoajat pyöristetään tuntien kokonaisluvuksi (jollei aine hajoa merkittävästi minuuteissa tai muutamassa tunnissa), mutta ei päivien kokonaisluvuksi. Testiaineen jäännösaktiivisuuden (^{14}C-leimattujen aineiden osalta) tai jäännöspitoisuuden (leimaamattomien aineiden osalta) estimaatit esitetään graafisesti ajan funktiona sekä lineaarisena että puolilogaritmisena käyränä (ks. kuvat 1a ja 1b). Jos hajoamista on tapahtunut, testipulloista F_T saatuja tuloksia verrataan testipulloista F_S saatuihin tuloksiin. Jos testiaineen sisältävistä testipulloista (F_T) ja steriileistä testipulloista (F_S) saatujen tulosten keskiarvot poikkeavat alle 10 %, voidaan olettaa, että todettu hajoaminen on pääasiassa abioottista. Jos hajoaminen testipulloissa F_S on vähäisempää, tuloksia voidaan käyttää testipulloilla F_T saatujen tulosten korjaamiseen (vähennys) biohajoamisen laajuuden estimoimiseksi. Jos merkittävistä muuntumistuotteista tehdään (vaihtoehtoisia) lisäanalyyseja, niiden muodostumista ja hajoamista koskevat käyrät tulisi esittää testiaineen hajoamiskäyrän lisäksi.

Lag-vaiheen kesto t_L estimoidaan hajoamiskäyrästä (puolilogaritmisesta käyrästä) ekstrapoloimalla sen lineaarinen osa tasolle, jolla hajoaminen on nolla, tai vaihtoehtoisesti määrittämällä aika noin 10 prosentin hajoamiselle (ks. kuvat 1a ja 1b). Puolilogaritmisesta käyrästä estimoidaan ensimmäisen kertaluvun nopeusvakio k ja sen keskivirhe lineaarisella regressiolla kuvaajasta ln (^{14}C-jäännösaktiivisuus tai testiaineen pitoisuus) vs. aika. Erityisesti ^{14}C-mittausten osalta käytetään ainoastaan käyrän ensimmäiseen lineaariseen osaan liittyviä tuloksia, ja tällöin mieluummin pientä määrää tarkkoja tuloksia kuin suurempaa määrää epätarkempia tuloksia. Epätarkkuudella tarkoitetaan tässä muun muassa suositeltuun ^{14}C-jäännösaktiivisuuden suoraan määritykseen liittyviä ominaisvirheitä (ks. jäljempänä). Joskus voi olla tarkoituksenmukaista laskea kaksi eri nopeusvakiota, jos hajoaminen tapahtuu kahdessa vaiheessa. Tätä varten määritellään kaksi eri vaihetta hajoamiskäyrässä. Nopeusvakio (k) ja puoliintumisaika ($t_{½}$ = ln2/k) tulisi laskea kullekin rinnakkaiselle näytteelle siinä tapauksessa, että niistä otetaan osanäytteitä; keskiarvoja voidaan käyttää siinä tapauksessa, että näytteeksi otetaan kokonaisia testipulloja kunakin näytteenottoajankohtana (ks. kohta 1.8.9.2, viimeinen kappale). Käytettäessä ensin mainittua menettelyä nopeusvakio ja puoliintumisaika olisi ilmoitettava kullekin yksittäiselle rinnakkaiselle näytteelle sekä lisäksi keskiarvona keskivirheineen. Jos testiainetta on käytetty suurina pitoisuuksina, hajoamiskäyrä voi poiketa merkittävästi suorasta viivasta (puolilogaritminen kuvio) ja reaktio ei ehkä edusta ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa. Puoliintumisajan määrittäminen ei tällöin ole mielekästä. Rajoitettuun tulosjoukkoon voidaan kuitenkin soveltaa pseudo-ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa ja estimoida hajoamisen puoliintumisaika DT_{50} (aika, jossa saavutetaan 50 % hajoamisesta). On kuitenkin muistettava, että valitun tulosjoukon ulkopuolella hajoamisaikaa ei voida ennustaa käyttäen DT_{50}:a, joka on vain tietyn tulosjoukon kuvaaja. Tilastolaskelmia ja käyrän sovitusta helpottavia analyysivälineitä on helposti saatavilla, ja tällaisten ohjelmistojen käyttö on suositeltavaa.

▼M1

Jos käytetään erityistä kemiallista analyysia, primaarisen hajoamisen nopeusvakiot ja puoliintumisajat estimoidaan edellä kuvatulla tavalla kokonaismineralisaatiolle. Jos primaarinen hajoaminen rajoittaa reaktion nopeutta, voidaan käyttää datapisteitä koko hajoamisajalta. (^{14}C-aktiivisuuden mittauksista poiketen kyseiset mittaukset tehdään suorina määrityksinä.)

Jos käytetään ^{14}C-leimattuja aineita, massatase tulisi ilmaista prosenttiosuutena annostellusta alkuperäisestä pitoisuudesta ainakin testin lopussa.

2.1.2 **Jäännösaktiivisuus**

Kun orgaanisen aineen ^{14}C-leimattu osa biohajoaa, suurin osa ^{14}C:stä muuttuu $^{14}CO_2$:ksi ja osa käytetään biomassan kasvuun ja/tai solunulkoisten metaboliittien synteesiin. Aineen täydestä eli ”lopullisesta” biohajoamisesta ei sen vuoksi ole tuloksena, että sen sisältämä hiili muuttuu 100-prosenttisesti $^{14}CO_2$:ksi. Biosynteesin kautta muodostuneisissa tuotteissa oleva ^{14}C vapautuu myöhemmin hitaasti $^{14}CO_2$:na ”sekundaarisen mineralisaation” vuoksi. Näistä syistä orgaanisen ^{14}C-jäännösaktiivisuuden (joka on mitattu CO_2:n poiston jälkeen) tai muodostuneen $^{14}CO_2$:n käyrät ajan funktiona ulottuvat hajoamisen päättymisajankohdan yli (”*tailing*”). Tämä monimutkaistaa tulosten kineettistä tulkintaa, minkä vuoksi vain käyrän ensimmäistä osaa (joka alkaa lag-vaiheen päättymisestä ja päättyy ennen 50 prosentin hajoamisen saavuttamista) tulisi normaalisti käyttää hajoamisen nopeusvakion estimoinnissa. Jos testiainetta on hajonnut, orgaanisen ^{14}C:n jäännösaktiivisuus on aina suurempi kuin jäljellä olevan vielä hajoamattoman testiaineen ^{14}C-aktiivisuus. Jos testiaineen hajoamisreaktio on ensimmäistä kertalukua ja konstantti fraktio α mineralisoituu CO_2:ksi, ^{14}C:n häviämiskäyrän (orgaanisen ^{14}C:n kokonaismäärä vs. aika) alkukaltevuus on α kertaa testiaineen (tai tarkemmin sanoen testiaineen ^{14}C-leimalla merkityn osan) pitoisuutta kuvaavan vastaavan käyrän kaltevuus. Orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuuden korjaamattomien mittausten perusteella lasketuun hajoamisen nopeusvakioon liittyy virhemarginaali. Kirjallisuudessa kuvataan menetelmiä estimoida testiaineen pitoisuudet mitatuista radiokemiallisista aktiivisuuksista erilaisten yksinkertaistusoletusten perusteella (2)(9)(10)(11). Näitä menetelmiä voidaan parhaiten soveltaa nopeasti hajoaviin aineisiin.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Jos todetaan, että k ei riipu pitoisuuden lisäämisestä (toisin sanoen jos laskettu k:n arvo on suunnilleen sama testiaineen eri pitoisuuksilla), ensimmäisen kertaluvun nopeusvakion voidaan olettaa edustavan käytettyjä testiolosuhteita (testiaine, vesinäyte ja testilämpötila). Se, missä määrin tulokset voidaan yleistää tai ekstrapoloida muita järjestelmiä koskeviksi, on määritettävä asiantuntija-arviona. Jos testiainetta käytetään suurena pitoisuutena ja hajoaminen ei siksi noudata ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa, tuloksia ei voida käyttää ensimmäisen kertaluvun nopeusvakion tai vastaavan puoliintumisajan suoraan estimointiin. Tällaisesta testistä, jossa testiainetta käytetään suurena pitoisuutena, saatuja tuloksia voidaan ehkä silti kuitenkin käyttää mineralisaation kokonaisasteen estimointiin ja/tai muuntumistuotteiden havaitsemiseen ja kvantifiointiin.

▼M1

Jos muiden häviämisprosessien kuin biohajoamisen (esim. hydrolyysin tai haihtumisen) nopeudet tunnetaan, ne voidaan vähentää testin aikana todetusta nettohäviämisnopeudesta, jolloin saadaan summittainen estimaatti biohajoamisnopeudelle. Hydrolyysiä koskeva data voidaan saada esimerkiksi steriilistä kontrollista tai rinnakkaisesta testistä, jossa käytetään suurempaa testiaineen pitoisuutta.

$^{14}CO_2$:n epäsuoraa ja suoraa määritystä (ks. kohta 1.8.9.4 ja liite 3) voidaan käyttää vain mitattaessa sitä, missä määrin testiaine mineralisoituu CO_2:ksi. Radiokromatografiaa (RAD-TLC) tai HPLC:tä voidaan käyttää analysoitaessa ^{14}C-leimatun testiaineen pitoisuuksia ja merkittävien muuntumistuotteiden muodostumista (ks. kohta 1.8.9.4, kolmas kappale). Puoliintumisajan suoran estimoinnin ehtona on, ettei merkittäviä muuntumistuotteita ole (muuntumistuote on merkittävä, jos se on ≥ 10 % testiaineen annostellusta määrästä). Jos merkittäviä muuntumistuotteita on, on tehtävä yksityiskohtainen arviointi tuloksista. Tähän voi sisältyä muuntumistuotteiden uusi testaaminen ja/tai yksilöinti (ks. kohta 1.8.9.5, ensimmäinen kappale), jollei muuntumistuotteiden muodostumista voida kohtuudella arvioida kokemuksen perusteella (esim. tiedot hajoamisreitistä). Koska se, missä määrin testiaineessa oleva hiili muuttuu CO_2:ksi, vaihtelee (riippuen paljolti testiaineen ja mahdollisten muiden substraattien pitoisuudesta, testiolosuhteista ja mikrobiyhteisöstä), tämän testin perusteella ei voida tehdä suoraa estimointia lopullisesta biohajoamisesta kuten DOC Die-Away -testissä, vaan testissä saatava tulos vastaa respirometrisessä testissä saatavaa tulosta. Mineralisaatioaste on näin ollen pienempi tai yhtä suuri kuin lopullisen biohajoamisen vähimmäistaso. Jotta lopullisesta biohajoamisesta saataisiin täydellisempi käsitys (mineralisaatio ja sitoutuminen biomassaan), ^{14}C:n faasijakauman analyysi tulisi tehdä testin lopussa (ks. liite 1). Hiukkasissa oleva ^{14}C koostuu bakteeribiomassaan sitoutuneesta ^{14}C:sta ja orgaanisiin partikkeleihin kiinnittyneestä ^{14}C:sta.

2.3 TESTIN VALIDITEETTI

Jos vertailuaine ei hajoa ennakoidussa ajassa (aniliinin ja natriumbentsoaatin odotettu hajoamisaika on yleensä alle 2 viikkoa), testin validiteettia on epäiltävä ja se on tarkistettava. Vaihtoehtoisesti testi toistetaan uudella vesinäytteellä. Menetelmän ISO-yhteistutkimuksessa (*ring test*), johon osallistui seitsemän laboratoriota eri puolilla Eurooppaa, ”adaptoituneet” hajoamisen nopeusvakiot aniliinille vaihtelivat välillä 0,3–1,7 päivä$^{-1}$. Keskiarvo oli 0,8 päivä$^{-1}$ 20 °C:ssa keskivirheellä ± 0,4 päivä$^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 päivää). Lag-vaiheet keskivät tyypillisesti 1–7 päivää. Tutkituissa testivesissä kirjattiin olevan bakteeribiomassa, joka vastaa 10^3–10^4 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä (CFU) ml:ssa. Hajoamisnopeudet runsasravinteisissa keskieurooppalaisissa vesissä olivat suurempia kuin pohjoisissa oligotrofisissa vesissä, mikä voi johtua eroista ravinteisuudessa tai aiemmasta altistuksessa kemiallisille aineille.

Kokonaissaannon (massataseen) tulisi testin lopussa olla 90–110 % radioaktiivisella leimalla merkittyjen aineiden osalta, ja alkuperäisen saannon testin alussa tulisi olla 70–110 % leimaamattomien aineiden osalta. Näitä vaihteluvälejä tulisi kuitenkin pitää pelkästään tavoitteina eikä perusteina testin hyväksymiselle.

▼M1

3. **TESTISELOSTE**

Testin tyyppi (onko kyseessä pelaginen vai suspendoituneen sedimentin testi) on ilmoitettava selvästi testiselosteessa, jossa on lisäksi oltava ainakin seuraavat tiedot:

Testiaine ja vertailuaine(et):

— testi- ja vertailuaineen yleisnimet, kemialliset nimet (mieluiten IUPAC ja/tai CAS-nimet), CAS-numerot, rakennekaavat (radioaktiivista merkkiainetta käytettäessä maininta siitä, missä molekyylin osassa ^{14}C on) ja relevantit fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (ks. kohdat 1.5 ja 1.6),

— muuntumistuotteiden yksilöinnissä ja niiden pitoisuuksien määrittämisessä standardeina käytettävien aineiden kemialliset nimet, CAS-numerot, rakennekaavat (radioaktiivista merkkiainetta käytettäessä maininta siitä, missä molekyylin osassa ^{14}C on) ja relevantit fysikaalis-kemialliset ominaisuudet,

— testi-vertailuaineen puhtaus (epäpuhtaudet),

— merkkiaineella leimatun kemikaalin radiokemiallinen puhtaus ja spesifinen aktiivisuus (tapauksen mukaan).

Pintavesi:

Vesinäytteestä on ilmoitettava seuraavat vähimmäistiedot:

— näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan luettuina taustatiedot saastumisesta, jos ne ovat saatavissa,

— näytteenottopäivä ja -ajankohta,

— ravinteet (kokonais-N, ammonium, nitriitti, nitraatti, kokonais-P, liuennut ortofosfaatti),

— näytteenottosyvyys,

— näytteen ulkonäkö (esim. väri ja sameus),

— DOC ja TOC,

— biokemiallinen hapentarve (BOD),

— lämpötila ja pH näytteenottopaikassa näytteenottoajankohtana,

— happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) (vain siinä tapauksessa, että aerobiset olosuhteet eivät ole ilmeiset),

— suolapitoisuus tai johtavuus (meri- ja murtoveden tapauksessa),

— suspendoitunut kiintoaines (jos näyte on samea),

— mahdolliset muut relevantit tiedot näytteenottopaikasta näytteenottoajankohtana (esim. tiedot jokien tai merivirtojen nykyisistä tai aiemmista virtausnopeuksista, merkittävistä päästöistä paikan läheisyydessä ja päästöjen tyypistä, näytteenottoajankohtaa edeltäneet sääolot),

ja vaihtoehtoisesti:

— mikrobibiomassa (esim. AODC (suoralaskenta akridiinioransivärjäyksen jälkeen) tai pesäkkeitä muodostavat yksiköt),

▼**M1**

— epäorgaaninen hiili,

— klorofylli a:n pitoisuus spesifisenä leväbiomassan arviona.

Jos tehdään suspendoituneen sedimentin testi, tulisi lisäksi antaa seuraavat tiedot sedimentistä:

— sedimentin keräyssyvyys,

— sedimentin ulkonäkö (värillinen, sakkainen, lietteinen tai hiekkainen),

— koostumus (esim. prosentteina karkeaa hiekkaa, hienoa hiekkaa, lietettä ja savea),

— suspendoituneen kiintoaineksen kuivapaino g/l, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus tai WLOI (painonmenetys kuumennuksen jälkeen) orgaanisen ainesisällön mittana,

— pH,

— happipitoisuus ja hapetus-pelkistyspotentiaali (redoxpotentiaali) (vain siinä tapauksessa, että aerobiset olosuhteet eivät ole ilmeiset).

Testiolosuhteet:

— keräyksen ja laboratoriotestissä käytön välinen aika, näytteen varastointi ja esikäsittely, kokeiden tekopäivät,

— annosteltu testiaineen määrä, testipitoisuus ja vertailuaine,

— testiaineen annostelumenetelmä, mukaan luettuna mahdollinen liuottimien käyttö,

— käytetty pintaveden ja sedimentin (jos sitä käytetään) volyymi ja kullakin aikavälillä näytteeksi otettu volyymi,

— kuvaus käytetystä testijärjestelmästä.

Jos testiä ei ole tarkoitus tehdä pimeässä, tiedot ”heikon valon” olosuhteista;

— tiedot steriilien kontrollien valmistukseen käytettävästä menetelmästä tai menetelmistä (esim. lämpötila, autoklaavikäsittelyjen ajankohta ja lukumäärä),

— inkubointilämpötila,

— tiedot analyysitekniikoista ja menetelmästä tai menetelmistä, joita käytetään radiokemiallisiin mittauksiin sekä massataseen tarkistamiseen ja faasijakauman mittauksiin (jos ne tehdään),

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— saantoprosentit (ks. kohta 1.7.1),

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys, mukaan luettuina havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ) (ks. kohta 1.7.2),

▼M1

— kaikki mitatut tiedot (mukaan luettuina näytteenottoajankohdat) ja lasketut arvot taulukkomuodossa sekä hajoamiskäyrät; kunkin testipitoisuuden ja kunkin rinnakkaisen testipullon osalta ilmoitetaan lineaarinen korrelaatiokerroin logaritmisen käyrän kaltevuudelle, arvioitu lag-vaihe ja ensimmäisen kertaluvun tai pseudo-ensimmäisen kertaluvun nopeuskerroin (jos mahdollista) sekä vastaava hajoamisen puoliintumisaika (t_{50}),

— relevantit arvot ilmoitetaan yksittäisissä rinnakkaisnäytteissä saatujen tulosten keskiarvoina (esim. lag-vaiheen pituus, hajoamisen nopeusvakio ja hajoamisen puoliintumisaika (t_{50})),

— järjestelmä luokitellaan joko ei-adaptoituneeksi tai adaptoituneeksi päätellen hajoamiskäyrän ulkonäöstä ja mahdollisesta testipitoisuuden vaikutuksesta,

— lopullisen massatasetarkistuksen tulokset ja faasijakaumamittausten tulokset (jos ne on tehty),

— mineralisoitunut ^{14}C-fraktio ja (käytettäessä erityisiä analyyseja) primaarisen hajoamisen lopullinen taso,

— merkittävien muuntumistuotteiden yksilöinti, molaarinen pitoisuus ja prosenttiosuus (ks. kohta 1.8.9.5, ensimmäinen kappale) (tapauksen mukaan),

— oletettu muuntumisreitti (tapauksen mukaan),

— tulosten pohdinta.

4. **KIRJALLISUUS**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

4. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394–401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274–283.

11. ISO/CD 14592–1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

Liite 1

^{14}C:n faasijakauma

Testimenettelyn tarkistamiseksi orgaanisen ^{14}C:n kokonaisaktiivisuuden (TOA) normaalimittausten lisäksi tulisi tehdä massataseen mittauksia tekemällä muodostuneen $^{14}CO_2$:n suora määritys sen jälkeen, kun se on erotettu imeyttimeen (ks. liite 3). Positiivinen $^{14}CO_2$:n muodostuminen on itsessään suora osoitus siitä, että kyseessä on biohajoaminen eikä abioottinen hajoaminen tai muu häviämisprosessi, kuten haihtuminen tai sorptio. Hyödyllisiä lisätietoja, jotka tarkentavat biohajoamisen luonnetta, voidaan saada mittauksista, jotka koskevat TOA:n jakautumista liukoiseen hiileen (liukoisen orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus, DOA) ja partikkelimuodossa olevaan hiileen (partikkelimuodossa olevan orgaanisen ^{14}C:n aktiivisuus, POA) sen jälkeen, kun partikkelimuodossa oleva hiili on erotettu kalvosuodatuksella tai sentrifugoimalla. POA muodostuu mikrobibiomassaan ja muihin partikkeleihin kiinnittyneestä testiaineesta sekä siitä testiaineessa olevasta hiilestä, joka on käytetty uuden solumateriaalin synteesiin ja joka näin ollen sisältyy biomassan hiukkasfraktioon. Liukoisen orgaanisen ^{14}C:n muodostuminen voidaan arvioida määrittämällä DOA biohajoamisen lopussa (biohajoamista ajan funktiona kuvaavan käyrän tasanne).

Jäännös-^{14}C:n faasijakauma estimoidaan valituissa näytteissä suodattamalla näytteitä kalvosuodattimella, jonka huokoskoko on 0,22–0,45 μm ja jonka materiaali ei adsorboi merkittäviä määriä testiainetta (polykarbonaattisuodattimet voivat olla sopivia). Jos testiaineen sorptio suodattimeen on liian suurta, jotta sen voisi jättää huomiotta (tarkistettava ennen koetta), nopeaa sentrifugointia (2 000 g; 10 min) voidaan käyttää suodatuksen sijaan.

Suodosta tai sentrifugaattia käsitellään siten, kuin kuvataan liitteessä 3 suodattamattomien näytteiden osalta. Kalvosuodattimet liuotetaan sopivaan tuikenesteeseen, minkä jälkeen laskenta tapahtuu tavalliseen tapaan, yleensä käyttäen pelkästään ulkoisen standardin menetelmää vaimennuksen korjaamiseen tai käyttämällä hapetinta. Jos on käytetty sentrifugointia, hiukkasfraktiosta muodostettu pelletti suspendoidaan uudelleen 1–2 ml:aan tislattua vettä ja pannaan tuikelaskentapulloon. Tämän jälkeen tehdään kaksi huuhtelua käyttäen 1 ml tislattua vettä, ja huuhteluvesi lisätään pulloon. Tarvittaessa suspensio voidaan yhdistää geeliin nestetuikelaskennan suorittamiseksi.

▼M1

Liite 2

Puolijatkuva prosessi

Inkubointia voidaan joutua jatkamaan pitkään, jopa useita kuukausia, jotta heikosti hajoavat aineet hajoaisivat riittävästi. Testin kesto ei tavallisesti saisi ylittää 60:tä päivää, jollei alkuperäisen vesinäytteen ominaisuuksia pidetä yllä uudistamalla testisuspensiota. Testin kesto voidaan kuitenkin pidentään enimmillään 90 päivään ilman, että testisuspensiota tarvitsee uudistaa, jos testiaineen hajoaminen on alkanut ensimmäisten 60 päivän aikana.

Inkuboinnin kestäessä pitkään mikrobiyhteisön diversiteetti voi vähentyä eri häviämisprosessien vuoksi ja siksi, että olennaisia ravinteita ja primaarisia hiilisubstraatteja saattaa hävitä vesinäytteestä. Siksi suositellaan käytettäväksi puolijatkuvaa testiä, jolla hitaasti hajoavien aineiden hajoamisnopeus voidaan määrittää riittävästi. Puolijatkuvaa prosessia tulisi käyttää testin alusta alkaen, jos aiemman kokemuksen perusteella odotetaan tarvittavan kolmen kuukauden inkubointiaika, jotta testiaine hajoaisi 20 prosenttia. Vaihtoehtoisesti normaali panostesti (*batch*) voidaan muuttaa testin aikana puolijatkuvaksi testiksi, jos testiaineen hajoamista ei ole tapahtunut noin 60 päivän kuluessa panostestimenettelyä käyttäen. Puolijatkuva menettely voidaan lopettaa ja testiä jatkaa panostestinä, kun hajoamista on tapahtunut merkittävästi (esim. > 20 %).

Puolijatkuvassa testissä noin kolmasosa testisuspension määrästä korvataan kahden viikon välein vasta otetulla uudella vedellä, johon on lisätty testiaine alkuperäisessä pitoisuudessa. Samoin sedimentti lisätään uuteen veteen alkuperäisessä pitoisuudessa (0,01–1 g/l), jos tehdään (vaihtoehtoinen) suspendoituneen sedimentin testi. Tehtäessä testiä suspendoituneella kiinteällä sedimentillä on tärkeää, että järjestelmä pidetään täysin suspendoituneena myös korvattaessa vettä uudella ja että kiintoaineksen ja veden oloaika järjestelmässä on sama, koska muuten järjestelmä ei ehkä halutulla tavalla vastaa homogeenista vesijärjestelmää, jossa ei ole faaseja. Näistä syistä suspendoituneen sedimentin alkuperäisen pitoisuuden tulisi puolijatkuvaa menettelyä käytettäessä mieluiten olla annetun vaihteluvälin alapäässä.

Testiohjeen mukainen testiaineen lisääminen edellyttää, että testiaineen alkuperäistä pitoisuutta ei ylitetä testisuspension osittaisen uudistamisen yhteydessä ja että näin vältetään adaptaatio, joka usein tapahtuu, kun testiaine on suurina pitoisuuksina. Koska prosessiin kuuluu sekä uudelleensiirrostus että poistuneiden ravinteiden ja primaaristen substraattien korvaaminen, alkuperäinen mikrobidiversiteetti palautuu ennalleen ja testin kestoa voidaan jatkaa periaatteessa loputtomiin. Puolijatkuvaa menettelyä käytettäessä on tärkeää huomata, että testiaineen jäännöspitoisuus on korjattava kunkin uudistamisen yhteydessä lisättyihin ja poistettuihin testiainemääriin nähden. Testiaineen kokonaispitoisuuden ja liukoisen pitoisuuden voidaan katsoa olevan samoja sellaisten yhdisteiden tapauksessa, joiden osalta sorptio on vähäinen. Sorptio on testiohjeen mukaisissa olosuhteissa (0,1–1 g kiintoainesta/l) merkityksetön (< 5 %) aineille, joiden log K_{ow} < 3 (koskee neutraaleja, lipofiilisiä yhdisteitä). Tämä käy ilmi seuraavasta esimerkistä: 0,1 g/l kiintoainesta vastaa karkeasti 10 mg:aa hiiltä litraa kohti (hiilifraktio f_C = 0,01). Olkoon

(testiaineen) log K_{ow} = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

ja jakaantumiskerroin, $K_d = f_C \times K_{oc}$

Tällöin liuennut fraktio kokonaispitoisuudesta (C-vesi (C_w)/C-kokonais (C_t) on:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/-(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Liite 3

$^{14}CO_2$:n määritys

Epäsuora $^{14}CO_2$:n määritys

Normaalimittauksissa epäsuora menetelmä on tavallisesti vähiten aikaa vievä ja tarkin menetelmä, jos testiaine ei ole haihtuva eikä muodosta haihtuvia muuntumistuotteita. Suodattamattomia näytteitä (esim. 5 ml kukin) lisätään tuikelaskentapulloihin. Sopiva alkuperäinen aktiivisuus näytteissä on 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq), ja sen on oltava vähintään noin 1 000 dpm. CO_2 poistetaan sen jälkeen, kun näyte on happamoitettu pH-arvoon 2–3 yhdellä tai kahdella tipalla väkevää H_3PO_4:a tai HCl:a. CO_2 voidaan poistaa poreiluttamalla ilmalla noin 1/2–1 tunnin ajan. Vaihtoehtoisesti pulloja voidaan ravistaa voimakkaasti 1–2 tunnin ajan (esim. mikrotiitterilevyjen ravistimessa) tai jättää kevyempään ravistukseen yön yli. CO_2:n poiston tehokkuus on tarkistettava (ja tarvittaessa jatkettava ilmastus- tai ravistusaikaa). Vesinäytteiden laskentaan sopiva tuikeneste lisätään, näyte homogenisoidaan sekoittimessa ja radioaktiivisuus määritetään nestetuikelaskennalla vähentäen nollanäytteissä havaittu tausta-aktiivisuus (F_B). Jollei testivesi ole selvästi värjääntynyt tai sisällä suurta hiukkaspitoisuutta, näytteissä havaittava vaimennus on tavallisesti yhtä suurta kaikissa ja sen korjaamiseksi riittää ulkoisen standardin käyttö. Jos testivesi on selvästi värjääntynyttä, vaimennus voidaan joutua korjaamaan sisäisen standardin lisäyksellä. Jos hiukkaspitoisuus on suuri, homogeenistä liuosta tai geeliä ei ehkä saada aikaan tai vaimennus saattaa vaihdella merkittävästi näytteiden välillä. Tällöin voidaan käyttää jäljempänä testilietteille kuvattua menetelmää. Jos testi suoritetaan suspendoituneen sedimentin testinä, $^{14}CO_2$:n epäsuora mittaus voidaan tehdä ottamalla homogeeninen 10 ml:n näyte testivettä/suspensiota ja erottamalla faasit sentrifugoimalla sopivalla nopeudella (esim. 40 000 m/s^2 15 min). Vesifaasia käsitellään sitten edellä kuvatulla tavalla. Partikkelimuodossa olevan ^{14}C:n aktiivisuus (POA) määritetään suspendoimalla sedimentti uudelleen pieneen määrään tislattua vettä, panemalla se tuikelaskentapulloihin ja lisäämällä tuikeneste geelin muodostamiseksi (tätä varten on olemassa erityisiä tuikenesteitä). Hiukkasten luonteesta (esim. niiden orgaanisen aineen sisällöstä) riippuen näytettä voidaan käsitellä yön yli kudoksen liukenemista edistävällä aineella ja sen jälkeen homogenisoida sekoittimessa ennen tuikenesteen lisäämistä. Vaihtoehtoisesti POA voidaan määrittää hapen määrän ylittävällä poltolla käyttäen hapetinta. Sisäiset standardit tulisi aina ottaa lukuun laskennassa, ja vaimennus voi olla tarpeen korjata sisäisen standardin lisäyksellä kunkin yksittäisen näytteen osalta.

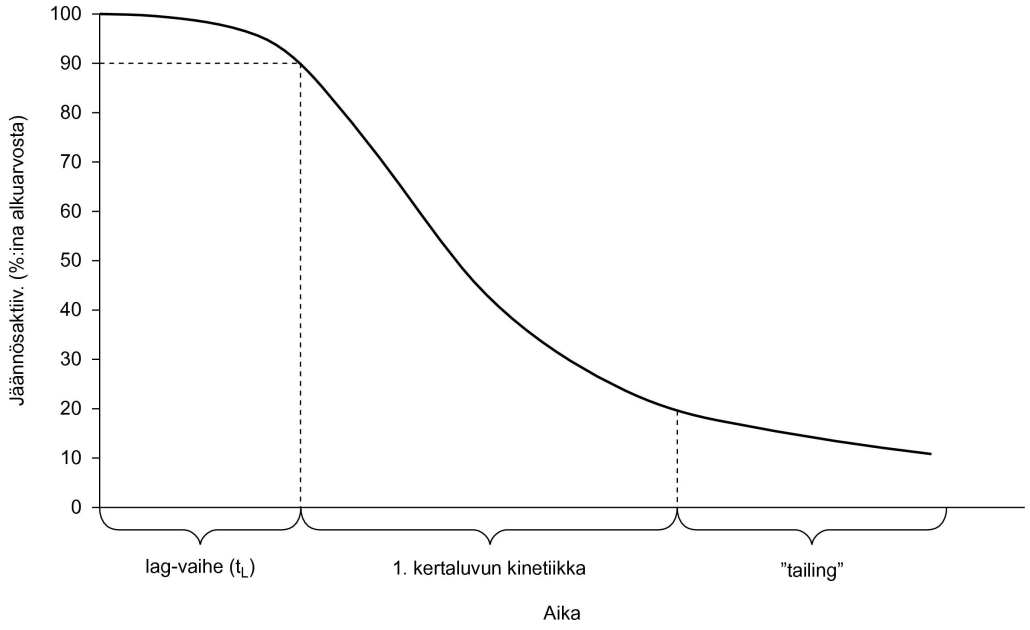
Suora $^{14}CO_2$:n määritys

Jos muodostuneesta $^{14}CO_2$:sta tehdään suora määritys, testiin tulisi ottaa useampia testipulloja testin alussa. Kussakin mittauskohdassa otetaan näytteeksi kokonaisia testipulloja, niiden sisältö happamoitetaan pH-arvoon 2–3 ja kerätään $^{14}CO_2$ sisäiseen (testin alussa kunkin testipullon sisään asetettuun) tai ulkoiseen absorbointijärjestelmään. Absorboivana aineena voidaan käyttää emästä (esim. 1 N NaOH -liuos tai NaOH-pelletti), etanoliamiinia tai etanoliamiinipohjaista absorbenttia tai kaupallisesti saatavilla olevia absorbentteja. $^{14}CO_2$:n suoraa määritystä varten testipullot tulisi sulkea esimerkiksi butyylikumikalvolla.

▼**M1**

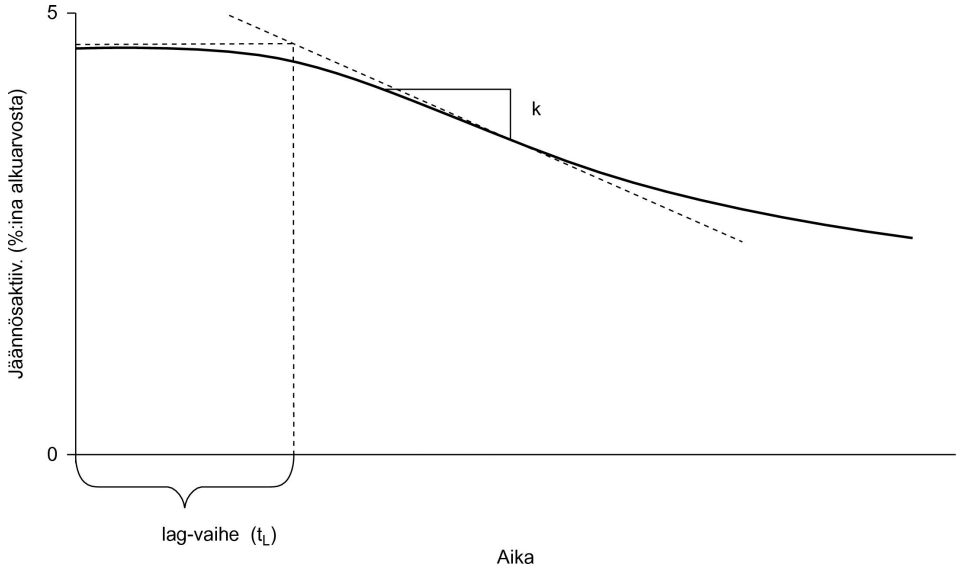
Kuva 1a

Esimerkki aritmeettisesta käyrästä (jäännösaktiivisuus vs. aika)



Kuva 1b

Esimerkki puolilogaritmisesta käyrästä (ln jäännösaktiivisuus vs. aika)



▼M6

C.26. LIMASKOJEN (*LEMNA*-LAJIEN) KASVUNESTYMISTESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 221 (2006). Tällä testimenetelmällä arvioidaan kemikaalien myrkyllisyyttä *Lemna*-sukua (limaskat) oleville makean veden kasveille. Menetelmä perustuu olemassa oleviin menetelmiin (1), (2), (3), (4), (5), (6), mutta niitä on muutettu viimeaikaisten tutkimustulosten ja keskeisiä kysymyksiä koskevien konsultointien pohjalta. Testimenetelmä on validoitu kansainvälisellä yhteistutkimuksella (ring test) (7).

2. Testimenetelmässä kuvataan myrkyllisyyden testausta, jossa käytetään *Lemna gibba*- ja *Lemna minor* -lajeja. Kumpaakin lajia on tutkittu laajalti ja käytetty edellä mainituissa standardeissa. *Lemna*-suvun lajien taksonomia on hankala, koska fenotyyppejä on monta. Vaikka *Lemna*-suvussa voi esiintyä geneettistä vaihtelevuutta vasteessa myrkyllisiin aineisiin, vaihtelevuuden syistä ei toistaiseksi ole saatavilla riittävästi tietoja, joiden pohjalta voitaisiin suositella tietyn kloonin käyttöä tässä testimenetelmässä. On syytä huomata, että testiä ei suoriteta aksenikaalisesti, vaan testin eri vaiheissa toteutetaan toimia, joilla muista eliöistä johtuva kontaminaatio pyritään pitämään mahdollisimman pienenä.

3. Testimenetelmässä kuvataan yksityiskohtaisesti testausta, jossa testiliuos vaihtuu (semistaattinen ja läpivirtausmenetelmä) tai ei vaihdu (staattinen menetelmä). Testin tavoitteista ja sääntelyvaatimuksista riippuen on suositeltavaa harkita semistaattisten tai läpivirtausmenetelmien käyttöä muun muassa sellaisten kemikaalien testauksessa, jotka häviävät nopeasti liuoksesta haihtumisen, valohajoamisen, saostumisen tai biohajoavuuden vuoksi. Tästä annetaan tarkempia ohjeita kirjallisuusviitteessä (8).

4. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

5. *Lemna*-sukuun kuuluvien eksponentiaalisesti kasvavien kasviviljelmien annetaan kasvaa seitsemän päivän ajan monokulttuureina testikemikaalin eri pitoisuuksissa. Testin tavoitteena on kvantifioida testikemikaaliin liittyvät vaikutukset kasvien kasvuun tämän ajan kuluessa tiettyjen mittausmuuttujien arvioinnin perusteella. Ensisijaisena mittausmuuttujana on versojen lukumäärä. Lisäksi mitataan ainakin yhtä muuta mittausmuuttujaa (versojen kokonaispinta-alaa, kuivapainoa tai tuorepainoa), koska eräät kemikaalit voivat vaikuttaa huomattavasti enemmän muihin mittausmuuttujiin kuin versojen lukumäärään. Testikemikaaliin liittyvien vaikutusten kvantifioimiseksi testiliuoksissa tapahtunutta kasvua verrataan kontrolliryhmässä tapahtuneeseen kasvuun, minkä jälkeen määritetään pitoisuus, jossa kasvu estyy ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan EC_x-arvona (esimerkiksi EC_{50}).

6. Testin loppupisteenä on kasvun estyminen, joka ilmenee mittausmuuttujan logaritmisesta kasvusta (keskimääräisestä spesifisestä kasvunopeudesta) altistusaikana. Testiliuossarjassa mitattujen keskimääräisten spesifisten kasvunopeuksien avulla määritetään pitoisuus, jossa kasvunopeus vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_rC_x-arvona (esimerkiksi E_rC_{50}).

7. Toinen testimenetelmässä käytetty vastemuuttuja on tuotos, jota voidaan tarvita joissakin maissa erityisten sääntelyvaatimusten täyttämiseksi. Sillä tarkoitetaan altistusajan lopussa mitattua mittausmuuttujien arvoa, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu mittausmuuttujien arvo. Testiliuossarjassa mitatun tuotoksen avulla määritetään pitoisuus, jossa tuotos vähenee ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran (esimerkiksi 50 prosenttia). Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan E_yC_x-arvona (esimerkiksi E_yC_{50}).

▼M6

8. Tilastollisesti voidaan määrittää myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

9. Käytettävissä on oltava analyysimenetelmä, jolla testiviljelyaineessa oleva testikemikaali voidaan kvantifioida riittävän herkästi.

10. Testikemikaalia koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, puhtaus, vesiliukoisuus, stabiilius vedessä ja valossa, pK_a, K_{ow}, höyrynpaine ja biohajoavuus. Vesiliukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää merkittävästi testin aikana. Tämän perusteella voidaan päättää, vaativatko tällaiset häviöt erityistoimia. Jos testikemikaalin liukoisuutta ja stabiiliutta koskevat tiedot ovat epäluotettavia, nämä ominaisuudet olisi arvioitava testiolosuhteissa, toisin sanoen siinä viljelyaineessa, lämpötilassa ja valaistuksessa, joita testissä käytetään.

11. Jos on erityisen tärkeää säädellä testiviljelyaineen pH:ta, esimerkiksi testattaessa metalleja tai hydrolyyttisesti epästabiileja kemikaaleja, on suositeltavaa lisätä testiviljelyaineeseen puskuria (ks. 21 kohta). Kirjallisuusviitteessä (8) annetaan lisäohjeita sellaisten kemikaalien testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

TESTIN VALIDITEETTI

12. Jotta testi olisi validi, versojen lukumäärän on kaksinkertaistuttava kontrolliviljelmässä alle 2,5 päivässä (60 tunnissa), mikä vastaa noin seitsenkertaista kasvua seitsemän päivän kuluessa, kun keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on 0,275 päivää kohden. Käytettäessä tässä testimenetelmässä kuvattuja testiliuoksia ja -olosuhteita tämä vaatimus voidaan täyttää käyttämällä staattista testausta (5). Vaatimus voidaan oletettavasti täyttää myös sellaisissa testiolosuhteissa, joissa käytetään semistaattista tai läpivirtausmenetelmää. Kaksinkertaistumisajan laskemista käsitellään tarkemmin 49 kohdassa.

VERTAILUKEMIKAALI

13. Testimenetelmä voidaan tarkistaa testaamalla vertailukemikaali (-kemikaalit), kuten 3,5-dikloorifenoli, jota on käytetty kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (7). Vertailukemikaali on suotavaa testata vähintään kahdesti vuodessa tai, jos testausta tehdään harvemmin, rinnakkain määritettäessä testikemikaalin myrkyllisyyttä.

MENETELMÄN KUVAUS

Välineet

14. Kaikkien välineiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Viljelyyn ja testaukseen käytettävien lasiastioiden on oltava steriilejä, ja ne on puhdistettava kemiallisista epäpuhtauksista, jotka voivat päästä testiviljelyaineeseen. Koeastioiden on oltava niin tilavia, että eri kolonioiden versot voivat kasvaa kontrolliastioissa peittämättä toisiaan testin lopussa. Ei ole haitaksi, vaikka juuret ulottuvat testiastioiden pohjaan, mutta on suositeltavaa, että kaikki koeastiat ovat syvyydeltään vähintään 20 mm ja tilavuudeltaan vähintään 100 ml. Koeastioiden valinnalla ei ole muuten ratkaisevaa merkitystä, jos nämä vaatimukset täyttyvät. Sopivan kokoiset dekantterilasit, kiteytysmaljat ja lasiset petrimaljat ovat kaikki osoittautuneet käyttökelpoisiksi. Haihtumisen ja tahattoman kontaminaation minimoimiseksi koeastiat on peitettävä,

▼M6

mutta samalla on huolehdittava riittävästä ilmanvaihdosta. Koeastiat ja varsinkaan niiden sulkimet eivät saa varjostaa tai muuttaa valon spektriominaisuuksia.

15. Viljelmiä ja koeastioita ei saa säilyttää toistensa kanssa. Sen vuoksi on paras käyttää erillisiä ilmastoituja kasvatuskaappeja, inkubaattoreita tai huoneita. Valaistuksen ja lämpötilan on oltava säädettävissä, ja ne on pidettävä tasaisina (ks. 35–36 kohdat).

Koe-eliö

16. Testissä käytetään *Lemna gibba*- tai *Lemna minor* -lajia. Myrkyllisyyden testauksessa käytettyjä limaskalajeja kuvataan lyhyesti lisäyksessä 2. Kasvimateriaali voidaan hankkia kantakokoelmasta, toisesta laboratoriosta tai luonnosta. Jos kasvit kerätään luonnosta, niitä on viljeltävä testissä käytettävässä viljelyaineessa vähintään kahdeksan viikkoa ennen käyttöä. Paikoissa, joista alkuviljelmien kasvit kerätään, ei saa olla ilmeisiä kontaminaatiolähteitä. Jos kasvit hankitaan toisesta laboratoriosta tai kantakokoelmasta, niitä on viljeltävä vastaavalla tavalla kolmen viikon ajan. Kasvimateriaalin lähde sekä testauksessa käytettävät lajit ja klooni (jos tiedossa) on aina ilmoitettava.

17. Testissä on käytettävä monokulttuureita, joissa ei ole muita organismeja, kuten leviä tai alkueläimiä, näkyvinä epäpuhtauksina. *L. minor* -lajin terveet kasvit ovat kolonioina, joissa on 2–5 versoa, kun taas *L. gibba* -lajin terveissä kolonioissa voi olla jopa seitsemän versoa.

18. Testissä käytettävät kasvit on valittava huolellisesti, koska niiden laatu ja yhtenäisyys vaikuttavat merkittävästi testin tulokseen. Testissä on käytettävä nuoria, nopeasti kasvavia kasveja, joissa ei ole näkyviä vaurioita tai värimuutoksia (kloroosia). Hyvälaatuisen viljelmän tunnistaa siitä, että siinä esiintyy runsaasti vähintään kahdesta versosta koostuvia kolonioita. Jos viljelmässä on monia yksittäisiä versoja, se on merkki ympäristörasituksesta, kuten ravinteiden puutteesta, eikä testissä saa käyttää tällaisista viljelmistä peräisin olevaa kasvimateriaalia.

Viljely

19. Viljelmien ylläpidon helpottamiseksi (esimerkiksi silloin, kun *Lemna*-testejä ei aiota tehdä tiettynä aikana) niitä voidaan säilyttää normaalia heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa (4–10 °C). Viljelyä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 3. Jos viljelmässä näkyy selviä merkkejä levien ja muiden eliöiden aiheuttamasta kontaminaatiosta, *Lemna*-versoista on mahdollisesti otettava osanäyte, jolle tehdään pintasterilointi, jonka jälkeen se siirretään tuoreeseen viljelyaineeseen (ks. lisäys 3). Jäljelle jäävä kontaminoitunut viljelmä on heitettävä pois.

20. Riittävä määrä kolonioita siirretään aseptisesti vähintään seitsemän päivää ennen testausta tuoreeseen steriiliin viljelyaineeseen, ja kolonioita viljellään 7–10 päivän ajan testiolosuhteissa.

Testiviljelyaine

21. *Lemna minor*- ja *Lemna gibba* -lajeja varten suositetaan erilaisia viljelyaineita, joita kuvataan jäljempänä. On syytä harkita huolellisesti pH-puskurin lisäämistä testiviljelyaineeseen (MOPS (4-morfoliinipropaanisulfonihappo, CAS-numero: 1132-61-2) *L. minor* -lajin viljelyaineeseen ja $NaHCO_3$ *L. gibba* -lajin viljelyaineeseen), jos testiviljelyaineen epäillään voivan reagoida testikemikaalin kanssa ja vaikuttaa sen myrkyllisyyden ilmentymiseen. Steinbergin viljelyainetta (9) voidaan käyttää, jos validiteettivaatimukset täyttyvät.

▼M6

22. Ruotsalaisen standardin (SIS) mukaisen *Lemna*-viljelyaineen muunnosta suositetaan käytettäväksi testauksessa, jossa viljellään ja käytetään *L. minor* -lajia. Tämän viljelyaineen koostumus esitetään lisäyksessä 4.

23. Lisäyksessä 4 kuvattua 20X-AAP-viljelyainetta suositetaan käytettäväksi testauksessa, jossa viljellään ja käytetään *L. gibba* -lajia.

24. *L. minor* -lajille soveltuu myös lisäyksessä 4 kuvattu Steinbergin viljelyaine, mutta sitä voidaan käyttää myös *L. gibba* -lajin viljelyssä, jos validiteettivaatimukset täyttyvät.

Testiliuokset

25. Testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla kantaliuosta. Testikemikaalin kantaliuokset valmistetaan tavallisesti liuottamalla kemikaali viljelyaineeseen.

26. Testikemikaalin suurin testattu pitoisuus ei yleensä saa ylittää kyseisen kemikaalin vesiliukoisuutta testiolosuhteissa. On kuitenkin huomattava, että *Lemna*-suvun lajit kelluvat pinnalla ja voivat altistua kemikaaleille, jotka kerääntyvät veden ja ilman rajapintaan (esimerkiksi huonosti veteen liukenevat tai hydrofobiset kemikaalit taikka pinta-aktiiviset kemikaalit). Tällaisissa olosuhteissa kasvit altistuvat muille kuin liuoksessa olevalle aineille, ja testipitoisuudet voivat testikemikaalin ominaisuuksista riippuen ylittää vesiliukoisuuden. Jos testikemikaali liukenee huonosti veteen, voi olla tarpeen valmistaa kyseisestä kemikaalista väkevä kantaliuos tai dispersio käyttämällä orgaanista liuotinta tai dispergointiainetta, joilla voidaan helpottaa tarkkojen testikemikaalimäärien lisäämistä testiviljelyaineeseen sekä testikemikaalin dispersiota ja liukenemista. Tällaisten aineiden käyttöä on vältettävä mahdollisimman pitkälle. Jos liuottimia tai dispergointiaineita käytetään apuna testiliuosten valmistuksessa, niistä ei saa aiheutua fytotoksisuutta. Asetoni ja dimetyyliformamidi ovat esimerkkejä yleisesti käytetyistä liuottimista, jotka eivät aiheuta fytotoksisuutta pitoisuuden ollessa enintään 100 µl·l. Jos liuotinta tai dispergointiainetta käytetään, sen lopullinen pitoisuus on ilmoitettava ja pidettävä mahdollisimman pienenä (≤ 100 µl/l), ja liuoksen tai dispergointiaineen pitoisuuden on oltava sama kaikissa käsitellyissä ja kontrolliliuoksissa. Dispergointiaineiden käytöstä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (8).

Testi- ja kontrolliryhmät

27. Sopivat testipitoisuudet on helpompi valita, jos testikemikaalin myrkyllisyydestä *Lemna*-lajeille on saatavilla aiempia tietoja esimerkiksi alustavista pitoisuusalueen määrityskokeista. Lopullisessa myrkyllisyystestissä on yleensä oltava vähintään viisi testipitoisuutta, jotka muodostavat geometrisen sarjan. Testipitoisuuksien suhdeluvun ei tulisi olla suurempi kuin 3,2, mutta suurempikin suhdeluku sallitaan, jos pitoisuus-vastekäyrä on laakea. Vähemmän kuin viiden pitoisuuden käyttö on perusteltava. Jokaisesta testipitoisuudesta on tehtävä vähintään kolme toistoa.

28. Valittaessa testin pitoisuusaluetta (pitoisuusalueen määritystä ja/tai lopullista myrkyllisyystestiä varten) on otettava huomioon seuraavat näkökohdat:

— EC_x-pitoisuuden määrittämiseksi testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta saavutettaisiin riittävä luottamustaso. Esimerkiksi EC_{50}-pitoisuutta arvioitaessa suurimman testipitoisuuden on ylitettävä EC_{50}-arvo. Jos EC_{50}-arvo on testin pitoisuusalueen ulkopuolella, vastaavat luottamusvälit ovat suuria, jolloin voi olla mahdotonta arvioida mallin tilastollista sopivuutta.

— Jos tavoitteena on arvioida LOEC- tai NOEC-pitoisuus, pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, että kasvu ei ole merkittävästi vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Suurimman testipitoisuuden on myös

▼M6

oltava niin suuri, että kasvu on huomattavasti vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Muussa tapauksessa testi on toistettava käyttämällä toista pitoisuusaluetta (jollei suurin pitoisuus ole liukoisuusrajalla tai jollei se ole suurin vaadittu rajapitoisuus, esimerkiksi 100 mg/l).

29. Jokaiseen testiin on kuuluttava kontrolliryhmä, jossa ravinneliuos, versojen ja kolonioiden lukumäärä, ympäristöolosuhteet ja menettelyt ovat samat kuin testiryhmässä mutta ilman testikemikaalia. Jos apuna käytetään liuotinta tai dispergointiainetta, testiin on kuuluttava ylimääräinen kontrollikäsittely, jossa liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuus on sama kuin testikemikaalia sisältävissä astioissa. Toistoissa kontrolliastioiden (ja liuotinta käytettäessä liuotinta sisältävien astioiden) lukumäärän on oltava vähintään yhtä suuri kuin kunkin testipitoisuuden testaamiseen käytettyjen astioiden lukumäärä ja mielellään kaksinkertainen.

30. Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, testimenetelmää voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden. Kontrollitoistoja on kuitenkin oltava vähintään kolme.

Altistus

31. Koloniat, jotka koostuvat 2–4 näkyvästä versosta, siirretään siirrosviljelmästä ja jaetaan satunnaisesti koeastioihin aseptisissa olosuhteissa. Jokaisessa koeastiassa on oltava yhteensä 9–12 versoa. Versoja ja kolonioita on oltava yhtä monta kaikissa koeastioissa. Tästä testimenetelmästä saadut kokemukset ja yhteistutkimusten (ring tests) tulokset ovat osoittaneet, että jos jokaista käsittelyä kohden tehdään kolme toistoa, joissa kaikissa on aluksi 9–12 versoa, käsittelyjen välillä voidaan jo havaita kasvueroja, jotka vastaavat 4–7 prosentin inhibitiota, jos se lasketaan kasvunopeuden perusteella (ja 10–15 prosentin inhibitiota, jos se lasketaan tuotoksen perusteella) (7).

32. Koeastiat on sijoitettava inkubaattoriin satunnaistetusti, jotta valon voimakkuuden ja lämpötilan spatiaalisista eroista johtuvat vaikutukset olisivat mahdollisimman pienet. Vaatimuksena on myös, että jokaisella havainnointikerralla käytetään lohkoittaista järjestystä tai astioiden satunnaistettua uudelleensijoittelua (joka voidaan tehdä useamminkin)

33. Jos alustava stabiiliustesti osoittaa, että testikemikaalin pitoisuutta ei voida pitää yllä testin ajan eli 7 päivää (toisin sanoen mitattu pitoisuus vähenee alle 80 prosenttiin mitatusta alkupitoisuudesta), on suositeltavaa käyttää semistaattista testijärjestelmää. Siinä tapauksessa koloniat on altistettava vasta valmistetuille testi- ja kontrolliliuoksille ainakin kahdesti testin aikana (esimerkiksi päivinä 3 ja 5). Testikemikaalin stabiiliudesta riippuu, kuinka usein koloniat on altistettava vastavalmistetulle viljelyaineelle. Testattaessa hyvin epästabiileja tai haihtuvia kemikaaleja pitoisuuksien pitäminen lähes vakioina voi vaatia useampia altistuskertoja. Joissakin tapauksissa voi olla tarpeen käyttää läpivirtausmenetelmää (8), (10).

34. Tähän testimenetelmään ei kuulu versojen altistaminen ruiskuttamalla, mutta sitä käsitellään kirjallisuusviitteessä (11).

Inkubaatio-olosuhteet

35. Testissä käytetään tasaista lämpimän- tai kylmänvalkoista loistevaloa, jotta valon voimakkuudeksi saadaan 85–135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$, kun se mitataan fotosyynteesille suotuisalla aallonpituusalueella (400–700 nm) pisteissä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin *Lemna*-versot (tämä vastaa voimakkuusaluetta 6 500–10 000 luksia). Valon voimakkuus ei saa vaihdella enempää kuin ± 15 prosenttia testialueen yläpuolella. Valoilmaisin- ja valonmittausmenetelmä ja erityisesti anturityyppi vaikuttavat mittausarvoon. Pallomaiset anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) ja kosinikorjaimella varustetut anturit (jotka

▼M6

reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta) ovat suositeltavampia kuin yksisuuntaiset anturit. Ensin mainitut antavat suurempia lukemia mitattaessa tässä kuvatun kaltaista monipisteistä valonlähdettä.

36. Lämpötilan on oltava koeastioissa 24 ± 2 °C. Yleensä kontrolliviljelyaineen pH-arvo saa kokeen aikana vaihdella enintään 1,5 yksikön verran. Tätä suurempi poikkeama ei kuitenkaan mitätöi testiä, jos validiteettivaatimusten voidaan osoittaa täyttyvän. Erityistapauksissa, esimerkiksi testattaessa epästabiileja kemikaaleja tai metalleja, on kiinnitettävä erityistä huomiota pH:n vaihteluun. Tästä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (8).

Kesto

37. Testi päättyy seitsemän päivän kuluttua kasvien siirtämisestä koeastioihin.

Mittaukset ja analyyttiset määritykset

38. Testin alussa lasketaan ja kirjataan koeastioissa olevien versojen lukumäärä. Tällöin on laskettava kaikki esiin työntyvät ja selvästi näkyvät versot. Normaaleilta ja epänormaaleilta vaikuttavien versojen määrä lasketaan testin alussa, vähintään joka kolmas päivä altistuksen aikana (eli ainakin kaksi kertaa seitsemän päivän jakson aikana) sekä kokeen päättyessä. Kasvien kehityksessä tapahtuvat muutokset rekisteröidään. Niitä ovat esimerkiksi versojen koossa ja ulkonäössä tapahtuvat muutokset, merkit nekroosista, kloroosista tai kupruisuudesta, kolonian hajoaminen tai kelluvuuden heikkeneminen sekä muutokset juurien pituudessa ja ulkonäössä. Lisäksi on rekisteröitävä testiviljelyaineen erityiset ominaisuudet (esimerkiksi liukenemattoman materiaalin esiintyminen ja levien kasvu koeastiassa).

39. Versojen lukumäärän laskemisen lisäksi testin aikana arvioidaan myös testikemikaalin vaikutuksia yhteen (tai useampaan) seuraavista mittausmuuttujista:

i) versojen kokonaispinta-ala;

ii) kuivapaino;

iii) tuorepaino.

40. Versojen kokonaispinta-alaan liittyy se etu, että se voidaan määrittää jokaisesta testi- ja kontrolliastiasta testin alussa, sen aikana ja sen lopussa. Kuiva- tai tuorepaino on määritettävä testin alussa siirrosviljelmästä otetusta näytteestä, jonka on oltava edustava näyte testin käynnistämiseen käytetystä materiaalista, sekä testin lopussa jokaisesta testi- ja kontrolliastiasta otetusta kasvimateriaalista. Jos versojen pinta-alaa ei mitata, on parempi mitata kuivapaino tuorepainon sijasta.

41. Versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino ja tuorepaino voidaan määrittää seuraavasti:

i) *Versojen kokonaispinta-ala:* Kaikkien kolonioiden versojen kokonaispinta-ala voidaan määrittää kuva-analyysillä. Koeastiasta ja kasveista voidaan ottaa siluettikuva videokameralla (esimerkiksi sijoittamalla koeastia valolaatikon päälle), ja näin saatu kuva digitalisoidaan. Koeastiassa olevien versojen kokonaispinta-ala voidaan määrittää tekemällä kalibrointi tunnetun pinta-alan tasokuvioiden avulla. Tällöin on huolehdittava siitä, että koeastian reunan aiheuttamat vaikutukset eivät vääristä määritystä. Vaihtoehtoisena mutta työläämpänä menetelmänä on valokuvata koeastiat ja kasvit, leikata näin saatu kolonioiden siluetti ja määrittää niiden pinta-ala käyttämällä lehtialan analysaattoria. Muutkin tekniikat voivat olla käyttökelpoisia (esimerkiksi kolonioiden siluetin pinta-alan ja tietyn pinta-alayksikön välinen painosuhde paperin painon mukaan laskettuna).

▼**M6**

ii) *Kuivapaino:* Jokaisesta koeastiasta kerätään kaikki koloniat, jotka huuhdotaan tislatulla tai deionisoidulla vedellä. Kolonioissa oleva ylimääräinen vesi imeytetään paperiin, minkä jälkeen niitä kuivataan 60 °C:ssa, kunnes niiden paino on vakio. Juurenpalaset on otettava mukaan. Kuivapaino on ilmoitettava vähintään 0,1 mg:n tarkkuudella.

iii) *Tuorepaino:* Kaikki koloniat siirretään ennalta punnittuihin polystyreeniputkiin (tai muihin inerttiä materiaalia oleviin putkiin), joiden pyöreissä pohjissa on pieniä (1 mm) aukkoja. Putkia sentrifugoidaan kierrosluvulla 3 000 rpm huoneenlämmössä 10 minuutin ajan. Putket, jotka sisältävät näin kuivatut koloniat, punnitaan uudelleen, ja tuorepaino lasketaan vähentämällä punnitustuloksesta tyhjän putken paino.

Mittausten ja analyyttisten määritysten tiheys

42. Käytettäessä staattista testimenetelmää kunkin käsittelyn liuoksen pH on mitattava testin alussa ja lopussa. Jos testimenetelmä on semistaattinen, pH on mitattava jokaisesta erästä ”tuoretta” testiliuosta ennen kutakin vaihtoa ja myös vastaavista ”käytetyistä” liuoksista.

43. Valon voimakkuus kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa on mitattava pisteistä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin *Lemna*-versot. Mittaukset on tehtävä ainakin kerran testin aikana. Viljelyaineen lämpötila surrogaattiastiassa, jota säilytetään kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa samoissa olosuhteissa, on mitattava vähintään kerran päivässä.

44. Testikemikaalin pitoisuudet määritetään testin aikana sopivin väliajoin. Staattisissa testeissä vähimmäisvaatimuksena on määrittää pitoisuudet testin alussa ja lopussa.

45. Semistaattisissa testeissä, joissa testikemikaalin pitoisuuden ei oleteta pysyvän ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, on analysoitava kaikki vastavalmistetut testiliuokset ja samat liuokset käytettyinä kunkin vaihdon yhteydessä (ks. 33 kohta). Kuitenkin niissä testeissä, joissa testikemikaalin mitattu alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta joissa voidaan antaa riittävä näyttö siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista. Kaikissa tapauksissa on testikemikaalin pitoisuudet ennen vaihtoa määritettävä vain yhdestä toistossa käytetystä astiasta (tai kaikkien toistoissa käytettyjen astioiden yhdistetystä sisällöstä) kutakin testipitoisuutta kohden.

46. Läpivirtaustestissä voidaan käyttää samanlaista näytteenottomenettelyä kuin semistaattisessa testissä ja tehdä analyysi testin alussa, puolivälissä ja lopussa, mutta ”käytettyjen” liuosten mittaaminen ei ole aiheellista. Tämäntyyppisessä testissä laimenteen ja testikemikaalin tai testikemikaalin kantaliuoksen virtausnopeus on tarkistettava päivittäin.

47. Jos on näyttöä siitä, että testattavan kemikaalin pitoisuus on pysynyt tyydyttävästi ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin. Jos pitoisuus poikkeaa enemmän kuin ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta, tulosten analysoinnin on perustuttava pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon altistuksen aikana tai malleihin, jotka kuvaavat testikemikaalin pitoisuuden vähenemistä (8).

▼M6

Raja-annostesti

48. Joissakin tapauksissa, esimerkiksi silloin, kun alustava testi osoittaa, että testikemikaalilla ei ole myrkkyvaikutuksia pitoisuusarvoon 100 mg/l saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testiaineella on testiviljelyaineessa (sen mukaan, kumpi näistä on pienempi), voidaan tehdä raja-annostesti, jossa verrataan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteita (pitoisuudessa 100 mg/l tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa). On erittäin suotavaa analysoida altistuspitoisuus rajatestin tueksi. Kaikki edellä kuvatut testiolosuhteet ja validiteettivaatimukset koskevat myös raja-annostestiä, lukuun ottamatta käsiteltyjen toistojen määrää, joka on kaksinkertaistettava. Kontrolli- ja käsitellyssä ryhmässä tapahtunutta kasvua voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Kaksinkertaistumisaika

49. Seuraavan kaavan avulla, jota sovelletaan kontrolliastioita koskeviin tietoihin, voidaan määrittää versojen lukumäärän kaksinkertaistumisaika (*Td*) ja varmistaa samalla, että testi täyttää tämän validiteettivaatimuksen (12 kohta):

$$T_d = \ln 2/\mu$$

Kaavassa μ on keskimääräinen spesifinen kasvunopeus, joka lasketaan 54–55 kohdissa kuvatulla tavalla.

Vastemuuttujat

50. Testin tarkoituksena on määrittää testikemikaalin vaikutukset *Lemnan* kasvuun. Tässä testimenetelmässä kuvataan kahta eri vastemuuttujaa, koska eri oikeudenkäyttöalueilla suositaan erilaisia käytänteitä ja noudatetaan erilaisia sääntelyvaatimuksia. Jotta testitulokset voitaisiin hyväksyä kaikilla oikeudenkäyttöalueilla, vaikutuksia olisi arvioitava käyttämällä molempia vastemuuttujia a ja b, joita kuvataan jäljempänä.

a) *Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus:* Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä seuraavien kahden muuttujan avulla: versojen lukumäärän logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos. Tätä kasvunopeutta kutsutaan joskus suhteelliseksi kasvunopeudeksi (12).

b) *Tuotos:* Tämä vastemuuttuja lasketaan seuraavien kahden muuttujan avulla: versojen lukumäärän muutokset ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) muutokset kontrolleissa ja kussakin käsitellyssä ryhmässä testin loppuun saakka.

51. On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut myrkyllisyysarvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat yleensä suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus perustuu yleiseen kasvumalliin, joka kuvaa limaskan eksponentiaalista kasvua rajoittamattomissa viljelmissä, joista toksisuus arvioidaan kasvunopeuteen kohdistuvien vaikutusten perusteella ottamatta huomioon kontrollin spesifisen kasvunopeuden absoluuttista tasoa, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuutta tai testin kestoa. Tuotosta kuvaavaan vastemuuttujaan perustuvat tulokset riippuvat sen sijaan kaikista näistä muista muuttujista. E_yC_x riippuu kussakin testissä käytetyn limaskalajin spesifisestä kasvunopeudesta ja suurimmasta spesifisestä kasvunopeudesta, joka voi vaihdella eri lajien ja jopa eri kloonien välillä. Tätä vastemuuttujaa ei saa käyttää vertailtaessa eri limaskalajien tai eri kloonienkaan herkkyyttä myrkyllisille aineille. Vaikka tieteen kannalta on parempi arvioida myrkyllisyyttä keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden

▼M6

perusteella, tähän testimenetelmään on otettu mukaan myös tuotokseen perustuvat myrkyllisyyden arvioinnit, jotta voidaan täyttää eräiden lainkäyttöalueiden nykyiset sääntelyvaatimukset.

52. Myrkyllisyyden arviointien on perustuttava sekä versojen lukumäärään että johonkin toiseen mittausmuuttujaan (versojen kokonaispinta-alaan, kuivapainoon tai tuorepainoon), koska eräät kemikaalit voivat vaikuttaa enemmän muihin mittausmuuttujiin kuin versojen lukumäärään. Tätä vaikutusta ei havaittaisi laskemalla pelkästään versojen lukumäärä.

53. Versojen lukumäärä ja muut kirjatut mittausmuuttujat (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino) esitetään taulukkona, josta ilmenevät myös testikemikaalin pitoisuudet kussakin mittauksessa. Kun tietoja analysoidaan myöhemmin esimerkiksi LOEC-, NOEC- tai EC_x-pitoisuuden arvioimiseksi, analyysin perustana on käytettävä yksittäisistä toistoista saatuja arvoja eikä kunkin käsitellyn ryhmän laskettuja keskiarvoja.

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus

54. Tietyn ajanjakson keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan kasvumuuttujien – versojen lukumäärän ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispinta-alan, kuivapainon tai tuorepainon) – logaritmisena kasvuna soveltamalla seuraavaa kaavaa kaikkiin kontrolliliuosten ja käsiteltyjen liuosten toistoihin:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

jossa

— μ_{i-j} keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä i–j

— N_i testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä i

— N_j testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä j

— t aikaväli i–j.

Kullekin testiryhmälle ja kontrolliryhmälle lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

55. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on laskettava koko testijaksolta (edellä olevassa kaavassa hetki ”i” tarkoittaa testin alkua ja hetki ”j” testin päättymistä). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen. Sen lisäksi on määritettävä jaksoittaiset kasvunopeudet, jotta voidaan arvioida testikemikaalin vaikutuksia koko altistusaikana (esimerkiksi analysoimalla logaritmisia kasvukäyriä). Merkittävät erot jaksoittaisen kasvunopeuden ja keskimääräisen kasvunopeuden välillä osoittavat, että kasvu poikkeaa jatkuvasta eksponentiaalisesta kasvusta, jolloin kasvukäyriä on syytä tarkastella lähemmin. Siinä tapauksessa varovaisena lähestymistapana on verrata käsiteltyjen viljelmien spesifisiä kasvunopeuksia suurimman kasvunestymisen aikana kontrollien vastaaviin kasvunopeuksiin samana aikana.

56. Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen (I_r) voidaan sen jälkeen laskea kutakin testipitoisuutta varten (käsittelyryhmässä) seuraavan kaavan avulla:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

jossa

— % I_r = keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

— μ_C = μ:n keskiarvo kontrolliryhmässä

— μ_T = μ:n keskiarvo käsittelyryhmässä.

Tuotos

57. Tuotokseen kohdistuvat vaikutukset määritetään seuraavien kahden mittausmuuttujan avulla: versojen lukumäärä ja jokin toinen mittausmuuttuja (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino), joka mitataan jokaisesta koeastiasta testin alussa ja lopussa. Jos toisena mittausmuuttujana käytetään kuivapainoa tai tuorepainoa, testin alussa oleva biomassa määritetään samasta erästä otetun versonäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen (ks. 20 kohta). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan tuotoksen keskiarvo varianssiestimaatteineen. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen (% I_y) voidaan laskea kutakin käsittelyryhmää varten seuraavasti:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

jossa

— % I_y = tuotoksen prosentuaalinen estyminen

— b_C = kontrolliryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa

— b_T = käsittelyryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa.

Pitoisuus-vastekäyrien piirtäminen

58. Pitoisuus-vastekäyrät piirretään merkitsemällä y-akselille vastemuuttujan keskimääräinen prosentuaalinen estyminen (vastemuuttujana on I_r tai I_y, joka lasketaan 56 tai 57 kohdan mukaan) ja x-akselille testiaineen pitoisuuden logaritmi.

EC_x-pitoisuuden arviointi

59. EC_x-pitoisuuden estimaattien (esimerkiksi EC_{50}-arvon) on perustuttava sekä keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen (E_rC_x) että tuotokseen (E_yC_x). Näistä kummankin on puolestaan perustuttava versojen lukumäärään ja johonkin toiseen mittausmuuttujaan (versojen kokonaispinta-alaan, kuivapainoon tai tuorepainoon), koska eräät testiaineet vaikuttavat eri tavalla versojen lukumäärään kuin muihin mittausmuuttujiin. Tavoitteena on siis saada myrkyllisyysparametreiksi seuraavat neljä EC_x-arvoa kutakin laskettua kasvunestymistasoa x kohden: E_rC_x (versojen lukumäärä); E_rC_x (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino); E_yC_x (versojen lukumäärä) ja E_yC_x (versojen kokonaispinta-ala, kuivapaino tai tuorepaino).

Tilastomenetelmät

60. Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus-vastesuhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-yksiköiksi (13) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (13). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen),

▼M6

minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (14), (15) ja (16) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista.

61. Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus-vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaatit. Jokaiselle estimaatille on määritettävä 95 prosentin luottamusväli, jos se on mahdollista. Vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja.

62. EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit voidaan saada myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (17), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

63. LOEC-pitoisuuden ja siten myös NOEC-pitoisuuden arvioimiseksi on verrattava käsiteltyjen liuosten keskiarvoja käyttämällä varianssianalyysitekniikoita (ANOVA). Sen jälkeen on verrattava kunkin pitoisuuden keskiarvoa kontrolliryhmän keskiarvoon käyttämällä sopivaa moniulotteista vertailumenetelmää tai trenditestimenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testi voi olla käyttökelpoinen (18), (19), (20), (21). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Arviointi voidaan tehdä graafisesti tai virallisen testin avulla (22). Sopivia testejä ovat Levenen ja Bartlettin testit. Jos oletus varianssin homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Jonckheeren alaspäin askeltava trenditesti. Kirjallisuusviitteessä (16) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

64. Tieteen viimeaikaisen kehityksen perusteella on suositeltu, että NOEC-käsitteestä luovuttaisiin ja se korvattaisiin regressioanalyysiin perustuvilla EC_x:n piste-estimaateilla. Sopivaa x:n arvoa ei ole vielä vahvistettu tätä *Lemna*-testiä varten. Sopivalta kuitenkin vaikuttaisi väli 10–20 prosenttia (valitun vastemuuttujan mukaan), ja suositeltavaa on ilmoittaa sekä EC_{10}- että EC_{20}-arvo.

Raportointi

65. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, muun muassa vesiliukoisuuden raja-arvo,

— kemialliset tunnistetiedot (esimerkiksi CAS-numero), mukaan luettuna puhtaus (epäpuhtaudet).

Koelajit:

— tieteellinen nimi, klooni (jos tiedossa) ja alkuperä.

Testiolosuhteet:

— testauksessa käytetty menetelmä (staattinen, semistaattinen tai läpivirtausmenetelmä),

— testin alkamispäivä ja kesto,

— testiviljelyaine,

— koejärjestely: koeastiat ja niiden sulkimet, liuostilavuudet, kolonioiden ja versojen lukumäärä koeastiaa kohden testin alussa,

— testipitoisuudet (nimellis- ja mitatut pitoisuudet tapauksen mukaan) sekä toistojen määrä pitoisuutta kohden,

▼**M6**

— kanta- ja testiliuosten valmistusmenetelmät, mukaan luettuina tiedot mahdollisesta liuottimen tai dispergointiaineen käytöstä,

— lämpötila testin aikana,

— valolähde, valon voimakkuus ja homogeenisuus,

— testi- ja kontrolliviljelyaineen pH-arvot,

— testikemikaalin pitoisuudet ja analyysimenetelmä sekä laadunarviointiin tarvittavat tiedot (validointitutkimukset, analyysien keskihajonnat ja luottamusvälit),

— versojen lukumäärän ja muiden mittausmuuttujien, kuten kuivapainon, tuorepainon tai versojen kokonaispinta-alan, määritysmenetelmät,

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä.

Tulokset:

— raakatiedot: versojen lukumäärä ja muut mittausmuuttujat jokaisessa testaukseen ja toistoihin käytetyssä koeastiassa kullakin havainnointi- ja analysointikerralla,

— kunkin mittausmuuttujan keskiarvot ja keskihajonnat,

— kutakin pitoisuutta vastaavat kasvukäyrät (suosituksena on käyttää mittausmuuttujan logaritmimuunnosta, ks. 55 kohta),

— kaksinkertaistumisaika/kasvunopeus kontrollissa versojen lukumäärän avulla laskettuna,

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin,

— pitoisuuden ja vaikutuksen välisen suhteen graafinen esitys,

— myrkyllisyysarvioinnin päätepisteiden estimaatit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja/tai NOEC-pitoisuus, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät,

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi vähiten merkitsevä erotus),

— mahdollinen kasvun edistyminen käsitellyissä liuoksissa,

— näkyvät merkit fytotoksisuudesta ja testiliuoksia koskevat havainnot,

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (hyväksytty uudelleen vuonna 1998). s. 733–742. Teoksessa Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., ”Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8 s.

(3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

(4) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

▼M6

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – 120 s.

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) International Organisation for Standardisation (ISO). ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353–359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481–483.

(13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713–718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157–167.

(15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485–1494.

(16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096–1121.

(19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519–531.

(22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä ja lyhenteitä:

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin kuivapaino. Tässä testissä biomassaa mitataan usein epäsuorasti esimerkiksi versojen lukumäärän tai pinta-alan avulla, minkä vuoksi ”biomassa”-termi viittaa myös näihin korvaaviin menetelmiin.

Kemikaali: aine tai seos.

Kloroosi: versosolukon kellastuminen.

Klooni: Eliö tai solu, joka on saanut alkunsa yhdestä yksilöstä suvuttoman lisääntymisen tuloksena. Samaan klooniin kuuluvat yksilöt ovat siis geneettisesti identtisiä.

Kolonia: Versojen muodostama yhdyskunta, jossa emo- ja tytäryksilöt (yleensä 2–4 yksilöä) ovat kiinnittyneet toisiinsa. Kutsutaan joskus kasviksi.

ECx: Testiviljelyaineeseen liuenneen testikemikaalin pitoisuus, jossa *Lemnan* kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia ”E_rC” ja jälkimmäisestä symbolia ”E_yC”, joiden jälkeen mainitaan mittausmuuttuja, esimerkiksi E_rC (versojen lukumäärä).

Läpivirtaustesti: testi, jossa testiliuokset vaihtuvat jatkuvasti.

Verso: Limaskakasvin yksittäinen lehden kaltainen rakenne. Se on pienin lisääntymiskykyinen yksikkö eli yksilö.

Kupruisuus: kupuroiden tai turpoamien esiintyminen versoissa.

Kasvu: mittausmuuttujan, kuten versojen lukumäärän, kuivapainon, märkäpainon tai versojen pinta-alan, kasvaminen testijakson aikana.

Kasvunopeus (keskimääräinen spesifinen kasvunopeus): biomassan logaritminen kasvu altistuksen aikana.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa kemikaalilla havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Mittausmuuttujat: Kaikentyyppiset muuttujat, jotka mitataan testin päätepisteen ilmaisemiseksi yhden tai useamman erilaisen vastemuuttujan avulla. Tässä menetelmässä mittausmuuttujia ovat versojen lukumäärä, versojen pinta-ala sekä tuorepaino ja kuivapaino.

Monokulttuuri: yhtä kasvilajia sisältävä viljelmä.

Nekroosi: kuollut (valkoinen tai veden turvottama) versosolukko.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Fenotyyppi: eliön havaittavissa olevat ominaisuudet, jotka määräytyvät eliön geenien ja ympäristön välisestä vuorovaikutuksesta.

Vastemuuttuja: Muuttujat, joiden avulla arvioidaan myrkyllisyyttä. Vastemuuttujat johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä testimenetelmässä kasvunopeudet ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittausmuuttujista, kuten versojen lukumäärästä, versojen pinta-alasta, tuorepainosta tai kuivapainosta.

▼M6

Semistaattinen (ajoittaisvaihtoinen) testi: testi, jossa testiliuos vaihdetaan tietyin väliajoin testin aikana.

Staattinen testi: testi, jossa testiliuosta ei vaihdeta testin aikana.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Testin päätepiste: Kuvaa yleistä tekijää, joka testin tavoitteen mukaisesti muuttuu testikemikaalin vaikutuksesta verrattuna kontrolliin. Tässä testimenetelmässä testin päätepisteenä on kasvun estyminen, joka voidaan ilmaista erilaisilla vastemuuttujilla, jotka perustuvat yhteen tai useampaan mittausmuuttujaan.

Testiviljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testikasvit kasvavat, kun ne altistetaan testikemikaalille. Yleensä testikemikaali liuotetaan testiviljelyaineeseen.

Tuotos: altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo.

▼M6

Lisäys 2

***Lemna* spp:n kuvaus**

Limaskaksi yleisesti kutsuttu vesikasvi *Lemna* spp. kuuluu Lemnaceae-heimoon. Siihen kuuluu neljä sukua, joiden lajeja esiintyy kaikkialla maailmassa. Niiden erilaisia ulkomuotoja ja taksonomiaa on käsitelty perusteellisesti kirjallisuusviitteissä (1), (2). *Lemna gibba* ja *L. minor* ovat lauhkean vyöhykkeen alueille luonteenomaisia lajeja. Niitä käytetään yleisesti myrkyllisyystesteissä. Molemmilla lajeilla on kelluva tai vedenalainen levymäinen verso, ja kunkin verson alapinnan keskiosasta lähtee hyvin ohut juuri. *Lemna* spp. kukkii hyvin harvoin ja lisääntyy kasvullisesti tuottamalla uusia versoja (3). Nuoremmat kasvit ovat vanhempiin kasveihin verrattuna yleensä vaaleampia, niillä on lyhyemmät juuret ja niissä on kaksi tai kolme erikokoista versoa. Lemna-suvun kasvit sopivat erittäin hyvin laboratoriokokeisiin pienen kokonsa, yksinkertaisen rakenteensa, suvuttoman lisääntymisensä ja lyhyen generaatioaikansa ansiosta (4), (5).

Koska kasvien herkkyys luultavasti vaihtelee lajista toiseen, herkkyyttä vertailtaessa hyväksytään ainoastaan lajin sisäiset vertailut.

Esimerkkejä testauksessa käytetyistä *Lemna*-lajeista:

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935–941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., ”Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8 s.

AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

Svenska standardiseringsinstitutet (SIS). (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13. 15 s.

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (hyväksytty uudelleen vuonna 1998). s. 733–742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., ”Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8 s.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959–1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla)*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481–483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102–2111.

Lemna-lajien hankintalähteitä

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Puhelin: +1-416-978-3641
Faksi: +1-416-978-5878
Sähköposti: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
Yhdysvallat
Puhelin: +1 (919) 515-7572
Sähköposti: astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
Stockholm
Ruotsi
Puhelin: +46 8 674 7240
Faksi: + 46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Saksa
Sähköposti: lemna@uba.de

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221–287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds *(Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1–14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7–22.

▼**M6**

Lisäys 3

Kantaviljelmän ylläpito

Kantaviljelmiä voidaan säilyttää alhaisissa lämpötiloissa (4–10 °C) suhteellisen pitkiä aikoja käynnistämättä niitä uudelleen. *Lemna*-kasvien viljelyaine voi olla sama kuin testauksessa käytetty viljelyaine, mutta kantaviljelmissä voidaan käyttää myös muita ravinteikkaita viljelyaineita

Joukko nuoria, vaaleanvihreitä kasveja siirretään säännöllisesti aseptisella menetelmällä uusiin, tuoretta viljelyainetta sisältäviin viljelyastioihin. Jatkoviljelmiä voidaan käynnistää jopa kolmen kuukauden väliajoin tässä liitteessä ehdotetuissa viileissä olosuhteissa.

Kasveja viljeltäessä on käytettävä kemiallisesti puhtaita (happopestyjä) ja steriilejä lasisia kasvatusastioita sekä aseptisia käsittelytekniikoita. Jos esimerkiksi levät tai sienet kontaminoivat kantaviljelmän, on ryhdyttävä toimiin näiden eliöiden poistamiseksi. Levät ja useimmat muut kontaminoivat eliöt voidaan poistaa pintasteriloinnilla. Kontaminoituneesta kasvimateriaalista otetaan näyte, ja juuret leikataan pois. Materiaalia ravistellaan puhtaassa vedessä voimakkaasti, minkä jälkeen se upotetaan 0,5 tilavuusprosentin natriumhypokloriittiliuokseen, jossa sitä pidetään 30 sekunnista 5 minuuttiin. Sen jälkeen kasvimateriaali huuhdellaan steriilillä vedellä ja siirretään erinä tuoretta viljelyainetta sisältäviin kasvatusastioihin. Monet versot kuolevat tämän käsittelyn jälkeen varsinkin, jos altistusajat ovat pitkiä, mutta osa eloon jäävistä versoista on yleensä vapautunut kontaminaatiosta. Näitä versoja voidaan käyttää uusien viljelmien siirrostamiseen.

▼M6

Lisäys 4

Viljelyaine

L. minor- ja *L. gibba* -lajin viljelyyn suositellaan eri viljelyaineita. *L. minor* -lajin viljelyyn suositellaan ruotsalaisen standardin (SIS) mukaisen viljelyaineen muunnosta, kun taas *L. gibba* -lajin viljelyyn suositellaan 20X-AAP-viljelyainetta. Kummankin viljelyaineen koostumus esitetään jäljempänä. Näitä viljelyaineita valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

Ruotsalaisen standardin (SIS) mukainen viljelyaine *Lemnan* viljelyä varten

— Kantaliuokset I–V steriloidaan autoklaavikäsittelyllä (120 °C, 15 minuuttia) tai kalvosuodatuksella (huokoskoko noin 0,2 μm).

— Kantaliuos VI (ja valinnaisesti kantaliuos VII) voidaan steriloida vain kalvosuodatuksella; näitä liuoksia ei saa käsitellä autoklaavissa.

— Steriilejä kantaliuoksia säilytetään viileässä ja pimeässä. Kantaliuokset I–V on heitettävä pois kuuden kuukauden kuluttua. Kantaliuosta VI (ja valinnaista kantaliuosta VII) voidaan säilyttää yhden kuukauden ajan.

Kantaliuoksen numero	Aine	Pitoisuus kantaliuoksessa (g/l)	Pitoisuus valmistetussa viljelyaineessa (mg/·l)	Valmistettu viljelyaine	
				Alkuaine	Pitoisuus (mg/·l)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (puskuri)	490	490	—	—

Yksi litra SIS-viljelyainetta valmistetaan lisäämällä seuraavat aineet 900 ml:aan deionisoitua vettä:

▼**M6**

— 10 ml kantaliuosta I

— 5 ml kantaliuosta II

— 5 ml kantaliuosta III

— 5 ml kantaliuosta IV

— 1 ml kantaliuosta V

— 5 ml kantaliuosta VI

— 1 ml kantaliuosta VII (valinnaisesti).*Huomautus:* Eräitä testiaineita varten voidaan tarvita ylimääräistä kantaliuosta VII (MOPS-puskuria) (ks. 11 kohta).

Viljelyaineen pH säädetään arvoon 6,5 ± 0,2 käyttämällä 0,1 tai 1 mol HCl:a tai NaOH:a, minkä jälkeen lisätään deionisoitua vettä, kunnes tilavuus on yksi litra.

20X-AAP-viljelyaine

Kantaliuokset valmistetaan steriiliin tislattuun tai deionisoituun veteen.

Steriilejä kantaliuoksia säilytetään viileässä ja pimeässä. Tällaisissa olosuhteissa kantaliuokset säilyvät ainakin 6–8 viikkoa.

20X-AAP-viljelyainetta varten valmistetaan viisi ravinnepitoista kantaliuosta (A1, A2, A3, B ja C) käyttämällä reagenssilaatua olevia kemikaaleja. Viljelyaineen valmistamiseksi lisätään 20 ml kutakin ravinnepitoista kantaliuosta noin 850 ml:aan deionisoitua vettä. Viljelyaineen pH säädetään arvoon 7,5 ± 0,1 käyttämällä 0,1 tai 1 mol HCl:a tai NaOH:a, minkä jälkeen lisätään deionisoitua vettä, kunnes tilavuus on yksi litra. Sen jälkeen viljelyaine suodatetaan steriiliin astiaan kalvosuodattimen läpi, jonka huokoskoko on noin 0,2 μm.

Testauksessa käytettävä viljelyaine on valmistettava 1–2 päivää ennen käyttöä, jotta pH stabiloituisi. Viljelyaineen pH on tarkistettava ennen käyttöä ja tarvittaessa säädettävä uudelleen lisäämällä 0,1 tai 1 mol NaOH:a tai HCl:a, kuten edellä on kuvattu.

Kantaliuoksen numero	Aine	Pitoisuus kantaliuoksessa (g/·l) (*)	Pitoisuus valmistetussa viljelyaineessa (mg/·l) (*)	Valmistettu viljelyaine	
				Alkuaine	Pitoisuus (mg/·l) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼**M6**

Kantaliuoksen numero	Aine	Pitoisuus kantaliuoksessa (g/·l) (*)	Pitoisuus valmistetussa viljelyaineessa (mg/·l) (*)	Valmistettu viljelyaine	
				Alkuaine	Pitoisuus (mg/·l) (*)
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Jollei toisin ilmoiteta.

Huom. Teoreettisesti sopiva lopullinen bikarbonaattipitoisuus (jossa pH:ta ei tarvitse mukauttaa kovian paljoa) on 15 mg/L (ei siis 300 mg/L). 20X-AAP-viljelyaineen aiemmassa käytössä, muun muassa tätä testimenetelmää koskevassa yhteistutkimuksessa, bikarbonaattipitoisuus on kuitenkin ollut 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.)

Steinbergin viljelyaine (ISO 20079 -standardin mukaan)

Pitoisuudet ja kantaliuokset

Muutettua Steinbergin viljelyainetta käytetään ISO 20079 -standardissa ainoastaan *Lemna minor* -lajin viljelyyn (koska standardissa ei sallita muita lajeja), mutta testit ovat osoittaneet, että sillä voidaan saada hyviä tuloksia myös *Lemna gibba* -lajin viljelyssä.

Viljelyainetta valmistettaessa on käytettävä reagenssi- tai analyysilaatua olevia kemikaaleja ja deionisoitua vettä.

Ravinneliuos valmistetaan kantaliuoksesta tai 10 kertaa väkevämmästä viljelyaineesta, jolloin liuoksen pitoisuus saadaan mahdollisimman suureksi ilman saostumista.

Taulukko 1

pH-stabiloitu Steinbergin viljelyaine (muutettu Altenburgerin mukaan)

Aine		Ravinneliuos	
Makroravinteet	moolipaino	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Aine		Ravinneliuos	
Mikroravinteet	moolipaino	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA-dinatriumdihydraatti	372,24	1 500,00	4,03

Taulukko 2

Kantaliuokset (makroravinteet)

1. Makroravinteet (50-kertainen väkevöinti)	**g/l**
Kantaliuos 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Kantaliuos 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Kantaliuos 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Taulukko 3

Kantaliuokset (mikroravinteet)

2. Mikroravinteet (1 000-kertainen väkevöinti)	**mg/l**
Kantaliuos 4:	
H_3BO_3	120,0
Kantaliuos 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Kantaliuos 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Kantaliuos 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Kantaliuos 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA-dinatriumdihydraatti	1 500,00

— Kantaliuokset 2 ja 3 voidaan yhdistää, samoin kuin kantaliuokset 4–7 (ottaen samalla huomioon vaaditut pitoisuudet).

▼**M6**

— Jotta kantaliuokset säilyisivät pitempään, ne voidaan käsitellä autoklaavissa 121 °C:ssa 20 minuutin ajan tai niille voidaan tehdä steriili suodatus (huokoskoko 0,2 μm). Kantaliuoksen 8 steriili suodatus (huokoskoko 0,2 μm) on erittäin suositeltavaa.

Steinbergin (muutetun) viljelyaineen lopullisen pitoisuuden valmistaminen

— Lisätään 20 ml kantaliuoksia 1, 2 ja 3 (ks. taulukko 2) noin 900 ml:aan deionisoitua vettä saostumisen ehkäisemiseksi.

— Lisätään 1,0 ml kantaliuoksia 4, 5, 6, 7 ja 8 (ks. taulukko 3).

— Liuoksen pH:n on oltava 5,5 ± 0,2 (säädetään lisäämällä mahdollisimman vähän NaOH-liuosta tai HCl:a).

— Lisätään vettä, kunnes tilavuus on 1 000 ml.

— Jos kantaliuokset on steriloitu ja niihin on käytetty sopivaa vettä, uutta sterilointia ei tarvita. Jos lopullinen viljelyaine steriloidaan, autoklaavikäsittelyn jälkeen (20 minuuttia 121 °C:ssa) on lisättävä kantaliuosta 8.

Steinbergin (muutetun) viljelyaineen kymmenkertainen väkevöinti väliaikaista varastointia varten

— Lisätään 20 ml kantaliuoksia 1, 2 ja 3 (ks. taulukko 2) noin 30 ml:aan vettä saostumisen ehkäisemiseksi.

— Lisätään 1,0 ml kantaliuoksia 4, 5, 6, 7 ja 8 (ks. taulukko 3). Lisätään vettä, kunnes tilavuus on 100 ml.

— Jos kantaliuokset on steriloitu ja niihin on käytetty sopivaa vettä, uutta sterilointia ei tarvita. Jos lopullinen viljelyaine steriloidaan, autoklaavikäsittelyn jälkeen (20 minuuttia 121 °C:ssa) on lisättävä kantaliuosta 8.

— Viljelyaineen pH:n on (lopullisessa pitoisuudessa) oltava 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN SEDIMENTTIÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 218 (2004). Tällä testimenetelmällä on tarkoitus arvioida pitkäaikaisen kemikaalialtistuksen vaikutuksia makean veden kaksisiipisen *Chironomus*-lajin (surviaissääsken) toukkiin, jotka elävät sedimentissä. Menetelmä perustuu *Chironomus riparius*- ja *Chironomus tentans* -toksisuustestimenettelyihin, jotka on kehitetty Euroopassa (1)(2)(3) ja Pohjois-Amerikassa (4)(5)(6)(7)(8) ja vahvistettu yhteistutkimuksissa (ring-test) (1)(6)(9). Myös muita hyvin dokumentoituja chironomid-lajeja, kuten *Chironomus yoshimatsui* (10)(11), voidaan käyttää.

2. Tässä testimenetelmässä altistus tapahtuu lisäämällä sedimenttiin testiainetta. Soveltuvan altistuksen valinta määräytyy testin sovellustarkoituksen mukaan. Testiaineen lisäämisellä sedimenttiin on tarkoitus simuloida kemikaalin pysyvää kertymää sedimenttiin. Tässä altistusjärjestelmässä tutkittavaa ainetta lisätään vesi-sedimenttisysteemin sedimenttiin.

3. Aineet, joita sedimentissä elävillä eliöillä testataan, säilyvät yleensä sedimentissä pitkään. Sedimentissä elävien eliöiden altistamiseen voidaan käyttää useita reittejä. Jokaisen altistusreitin suhteellinen tärkeys sekä toksiseen kokonaisvaikutukseen vaadittava aika määräytyvät käytettävän kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, kontaminoituneen ravinnon nauttiminen voi olla tärkeä altistusreitti. Jotta hyvin rasvahakuisten aineiden myrkyllisyyttä ei aliarvioida, voidaan harkita ravinnon lisäämistä sedimenttiin ennen testiaineen lisäämistä. Jotta kaikki mahdolliset altistusreitit voidaan huomioida, tämä testimenetelmä keskittyy pitkäaikaiseen altistukseen. Testin kesto on 20–28 päivää *C. riparius*- ja *C. yoshimatsui* -lajeille ja 28–65 päivää *C. tentans* -lajille. Jos lyhytaikaisia tietoja tarvitaan tiettyyn tarkoitukseen, kuten epävakaan kemikaalin vaikutusten tutkimiseen, ylimääräiset rinnakkaisnäytteet voidaan poistaa 10 päivän jälkeen.

4. Mitatut tutkittavat ominaisuudet ovat kuoriutuneiden täysikasvuisten kokonaismäärä ja kuoriutumiseen kulunut aika. Jos lyhytaikaiset lisätiedot ovat tarpeen, toukkien eloonjäämistä ja kasvua on suositeltavaa mitata vasta kymmenen päivän kuluttua käyttämällä ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä.

5. Synteettisen sedimentin käyttö on suositeltavaa. Synteettisellä sedimentillä on useita etuja luonnolliseen sedimenttiin verrattuna:

   — kokeellinen vaihtelu vähenee, koska sedimentti on toistettava ”vakiomatriisi”, eikä kontaminoitumattomia ja puhtaita sedimenttilähteitä tarvitse etsiä

   — testit voidaan aloittaa milloin tahansa ilman, että testisedimentin kausivaihtelua esiintyy, sedimentistä ei tarvitse poistaa alkuperäiselimistöä esikäsittelyllä ja lisäksi synteettisen sedimentin käyttö pienentää kuluja, joita rutiinitestaukseen tarvittavan sedimenttimäärän keräämisestä kentältä syntyy

   — synteettisen sedimentin käyttö sallii toksisuuden vertailun ja aineiden lajittelemisen myrkyllisyyden mukaan.

6. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

▼M4

TESTIN PERIAATE

7. Surviaissääsken munatoukat altistetaan testikemikaalin pitoisuusalueelle vesi-sedimenttisysteemeissä. Testiainetta lisätään sedimenttiin, ja munatoukat siirretään dekantterilaseihin, joissa sedimentin ja veden pitoisuudet on stabiloitu. Surviaissääskien kuoriutumisaste ja kehittymisnopeus mitataan testin lopussa. Toukkien eloonjäänti ja paino voidaan myös tarvittaessa mitata 10 päivän kuluttua (käytättämällä soveltuvia ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä). Nämä tiedot analysoidaan regressiomallilla, jolla arvioidaan pitoisuus, joka aiheuttaa X prosentin laskun kuoriutumisessa tai toukkien eloonjäännissä tai painossa (esim. EC_{15}, EC_{50}), tai tilastollisen hypoteesin testillä, jolla määritetään NOEC/LOEC. Jälkimmäinen vaihtoehto edellyttää vaikutusarvojen vertaamista vertailuarvoihin tilastotutkimuksilla.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

8. Testiaineen vesiliukoisuuden, höyrynpaineen, mitatun tai lasketun erottumisen erottuminen sedimenttiin sekä stabiiliuden vedessä ja sedimentissä on oltava tiedossa. Käytössä on oltava luotettava analyysimenetelmä, jolla testiaine voidaan kvantifioida sedimentin päällä olevassa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä, ja menetelmän tarkkuus ja havaitsemisraja tunnetaan ja ne on raportoitu. Hyödyllisiä tietoja ovat esimerkiksi rakennekaava ja testiaineen puhtaus. Myös testiaineen kemiallinen kohtalo (esim. häviäminen, abioottinen ja bioottinen hajoaminen) on hyödyllistä tietää. Kirjallisuusviitteessä (12) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

VERTAILUKEMIKAALIT

9. Testimenettelyn ja testiolosuhteiden luotettavuus voidaan tarkistaa testaamalla ajoittain vertailukemikaaleja. Esimerkkejä vertailumyrkyistä, joita on käytetty onnistuneesti yhteistutkimuksissa ja validointitutkimuksissa: lindaani, trifluraliini, pentakloorifenoli, kadmiumkloridi ja kaliumkloridi (1)(2)(5)(6)(13).

TESTIN LUOTETTAVUUS

10. Testi on luotettava, jos

— kuoriutuvuus kontrolleissa on vähintään 70 prosenttia testin lopussa (1)(6)

— *C. riparius* ja *C. yoshimatsui* aikuistuvat kontrolliastioissa 12–23 päivän kuluessa astiaan laittamisesta. *C. tentans* vaatii 20–65 päivää

— testin lopussa mitataan jokaisen astian pH ja liuenneen hapen pitoisuus. Happipitoisuuden täytyy olla vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta (ASV) käytetyssä lämpötilassa, ja sedimentin päällä olevan veden pH-arvon pitää olla 6–9 kaikissa testiastioissa

— veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,0 °C. Veden lämpötilaa voidaan kontrolloida tasalämpöisessä huoneessa, jolloin huoneen lämpötila on tarkistettava soveliain väliajoin.

▼M4

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

11. Tutkimus tehdään 600 ml:n dekantterilaseissa, joiden halkaisija on 8 cm. Muitakin astioita voidaan käyttää, kunhan sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys on sopiva. Sedimentin pinta-alan on oltava riittävä, jotta tilaa on 2–3 cm^2 toukkaa kohden. Sedimenttikerroksen ja sen päällä olevan veden syvyyden suhteen on oltava 1:4. Testiastioiden ja muiden testijärjestelmän kanssa kosketuksissa olevien välineiden on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia (esim. teflonia).

Lajin valinta

12. Paras laji tähän testiin on *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* soveltuu myös, mutta sen käsittely on hankalampaa ja se edellyttää pidempää testijaksoa. Myös *Chironomus yohimatsui* -lajia voidaan käyttää. Tietoa *Chironomus riparius* -lajin kasvatusmenetelmistä on lisäyksessä 2. Myös muiden lajien kasvatusolosuhteista on saatavissa tietoa: *Chironomus tentans* (4) and *Chironomus yoshimatsui* (11). Lajin tunnistus on varmistettava ennen testiä, mutta sitä ei ole tarpeen tehdä ennen joka testiä, jos eliöt ovat peräisin omasta kasvattamosta.

Sedimentti

13. Synteettisen sedimentin (keinosedimentin) käyttö on suositeltavaa. Jos kuitenkin käytetään luonnollista sedimenttiä, se on kuvailtava (vähintään pH, orgaaninen kokonaishiilipitoisuus, mutta myös muut parametrit, kuten C/N-suhde ja rakeisuus ovat suositeltavia), eikä siinä saa olla kontaminaatiota tai muita organismeja, jotka saattavat kilpailla chironomid-eliöiden kanssa tai syödä ne. Lisäksi on suositeltavaa, että luonnollista sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat. Tätä testiä varten suositellaan seuraavaa synteettistä sedimenttiä, joka perustuu testimenetelmässä C.8 (14) käytettyyn keinomaahan (1)(15)(16):

a) 4–5 % (kuivapaino) turvetta: pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0; on tärkeää käyttää ainoastaan ilmakuivattua jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm)

b) 20 % (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 %)

c) 75–76 % (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, yli 50 prosenttia 50–200 μm:n hiukkasia)

d) deionisoitua vettä lisätään, kunnes lopullisen seoksen kosteus on 30-50 %

e) kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5 orgaanisen hiilen pitoisuuden on oltava lopullisessa seoksessa 2 % (± 0,5 %). Sitä voidaan säätää lisäämällä sopiva määrä turvetta ja hiekkaa kohtien a) ja c) mukaisesti.

14. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperän on oltava tiedossa. Tarkista, ettei sedimentin ainesosissa ole kemikaalista kontaminaatiota (esim. raskasmetalleja, orgaanisia klooriyhdisteitä ja orgaanisia fosforiyhdisteitä). Esimerkki synteettisen sedimentin valmistuksesta on lisäyksessä 3. Myös kuivien ainesosien sekoittaminen on hyväksyttävää, jos voidaan osoittaa, että sedimentin ainesosat eivät erotu (esim. kelluvia turvehiukkasia) veden lisäämisen jälkeen ja että turve tai sedimentti on sopeutunut tarpeeksi.

▼M4

Vesi

15. Testivedeksi soveltuu vesi, joka täyttää lisäyksissä 2 ja 4 luetellut laimennusveden kemialliset ominaisuudet. Kasvatus- ja testivedeksi soveltuu mikä tahansa vesi, luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi (katso lisäys 2) tai talousvesi, josta on poistettu kloori, jos surviaissääsket voivat elää siinä viljelyn ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Testiveden pH-arvon on oltava testin alussa 6–9, eikä kokonaiskovuus $CaCO_3$:na saa olla yli 400 mg/l. Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä). Samantyyppistä vettä on käytettävä koko tutkimuksen ajan. Lisäyksessä 4 luetellut vedenlaadun ominaisuudet on mitattava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi.

Kantaliuokset – sedimentit, joihin on lisätty testiainetta

16. Sedimentit, joiden pitoisuus on haluttu, valmistetaan yleensä lisäämällä testiaineliuosta suoraan sedimenttiin. Testiaineen kantaliuos, joka on liuotettu deionisoituun veteen, sekoitetaan synteettiseen sedimenttiin valssauskoneella, sekoittimella tai käsin. Jos testiaine liukenee huonosti veteen, se voidaan liuottaa käyttämällä pienintä mahdollista määrää soveltuvaa orgaanista liuotinta (esim. heksaania, asetonia tai kloroformia). Seuraavaksi liuokseen sekoitetaan 10 g hienoa kvartsihiekkaa yhtä testiastiaa kohden. Sen jälkeen liuottimen annetaan haihtua. Sitä ei saa jäädä hiekkaan yhtään. Seuraavaksi hiekkaan sekoitetaan sopiva määrä sedimenttiä jokaista dekantterilasia varten. Testiaineen liuottamiseen, dispergoimiseen tai emulgointiin saa käyttää vain helposti haihtuvia aineita. On pidettävä mielessä, että testiaineen ja hiekkaseoksen mukana tuleva hiekka on otettava huomioon sedimentin valmistuksessa (eli sedimentin valmistukseen on käytettävä pienempi määrä hiekkaa). Varmista huolellisesti, että sedimenttiin lisättävä testiaine sekoittuu sedimenttiin hyvin ja tasaisesti. Homogeenisuusasteen voi määrittää tarvittaessa analysoimalla osanäytteitä.

TESTISUUNNITELMA

17. ”Testisuunnitelma” tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, astioiden lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja toukkien lukumäärää astiaa kohti. Suunnitelmat EC-pisteen arviointia, NOEC:n määritystä ja rajatestin tekemistä varten on kuvattu.

Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma

18. Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. EC_{15}, EC_{50}) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta.Tarkkuus ja etenkin luotettavuus, jolla vaikutuspitoisuuksien (EC_x) estimaatit voidaan tehdä, paranee yleensä, kun vaikutuspitoisuus sijoittuu testattujen pitoisuuksien alueelle. Ekstrapolointia paljon matalimman positiivisen pitoisuuden alle tai korkeimman pitoisuuden ylle on vältettävä. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa (katso kohta 27).

▼M4

19. Jos halutaan arvioida EC_x, jokaisesta pitoisuudesta tarvitaan vähintään viisi testipitoisuutta ja kolme rinnakkaisnäytettä. On joka tapauksessa suositeltavaa käyttää riittäviä testipitoisuuksia, jotta mallin estimointi onnistuu hyvin. Pitoisuuksien välinen kerroin ei saa olla yli kaksi (poikkeus voidaan tehdä, jos annosvastekäyrä on loiva). Käsittelyssä käytettävien toistojen määrää voidaan laskea, jos eri vasteita aiheuttavien testipitoisuuksien määrää nostetaan. Jos toistojen määrää lisätään tai testipitoisuuden välejä pienennetään, testin luottamusväli yleensä kapenee. Toistoja tarvitaan lisää, jos halutaan arvioida toukkien eloonjäänti ja kasvu 10 päivän aikana.

NOEC:n/LOEC:n estimointiin suositeltava testisuunnitelma

20. Jos halutaan arvioida LOEC tai NOEC, on käytettävä vähintään viittä testipitoisuutta ja vähintään neljää rinnakkaisnäytettä, eikä pitoisuuksien välinen kerroin saa olla yli kaksi. Rinnakkaisnäytteiden määrän on oltava riittävän suuri, jotta tilastollinen voima on riittävä ja kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Kehittymisnopeuteen soveltuu yleensä varianssianalyysi (ANOVA), kuten Dunnett-testi ja Williams-testi (17)(18)(19)(20). Kuoriutumisasteeseen voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferronin korjauksella) tai Mantel-Haenszelin testiä.

Rajatesti

21. Rajatesti (yksi testipitoisuus ja kontrolli) voidaan tehdä, jos alustavassa pitoisuusalueen määrityksessä ei havaittu vaikutuksia. Rajatestin tarkoituksena on tehdä testi riittävän suurella pitoisuudella, jotta päättäjät voivat sulkea pois testiaineen mahdolliset toksiset vaikutukset, ja raja asetetaan pitoisuuteen, jota ei odoteta esiintyvän missään tilanteessa. Suositeltava arvo on 1 000 mg/kg (kuivapaino). Yleensä vähintään kuusi rinnakkaisnäytettä sekä testiettä kontrollinäytteestä on tarpeen. On osoitettava, että tilastollinen voima on riittävä, jotta kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Jos vaste on metrinen (kehittymisnopeus ja paino), t-testi on soveltuva tilastollinen menetelmä, jos tiedot täyttävät tämän testin vaatimukset (normaalisuus, homogeeniset vaihtelut). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa variansit ovat heterogeenisia, tai parametritonta testiä, kuten Wilcoxon-Mann-Whitheyn testiä. Fisherin tarkka testi soveltuu kuoriutumisasteeseen.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Vesi-sedimenttisysteemin valmistelu käyttäen sedimenttiä, johon tutkittavaa ainetta on lisätty

22. Testimenetelmässä C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla kuvattu lisäysmenetelmä on suositeltava tapa lisätä testiainetta (14). Sedimentit, joihin testiaine on lisätty, asetetaan astioihin ja niiden päälle lisätään vettä, kunnes sedimentin ja veden tilavuussuhde on 1:4 (katso kohdat 11 ja 15). Sedimenttikerroksen syvyyden on oltava 1,5–3 cm. Sedimentin voi peittää muovikiekolla, kun testivettä lisätään vesipatsaaseen, jotta sedimentin ainesosien erottuminen ja hienon materiaalin resuspensio voidaan välttää, mutta kiekko on poistettava heti tämän jälkeen. Myös muut välineet voivat olla sopivia.

23. Testiastiat on peitettävä (esim. lasilevyillä). Jos vettä haihtuu tutkimuksen aikana, lisää vettä, kunnes veden tilavuus on alkuperäisellä tasolla. Käytä tähän tarkoitukseen tislattua tai deionisoitua vettä, jotta suoloja ei keräydy.

▼M4

Stabilointi

24. Kun sedimenttiin on lisätty testiaine ja sedimentin yläpuolelle on lisätty vesi, testiaineen on hyvä antaa erottua vesifaasista sedimenttiin (3)(4)(6)(13). Tämä on suositeltavaa tehdä samassa lämpötilassa ja ilmastuksessa, joita testissä käytetään. Sopiva tasapainottumisaika määräytyy sedimentin ja kemikaalin mukaan, ja se voi vaihdella tunneista päiviin tai harvinaisissa tapauksissa jopa viikkoihin (4–5 viikkoa). Koska monet kemikaalit voisivat hajota tässä ajassa, tasapainotilaa ei jäädä odottamaan, vaan tasapainottumisajaksi suositellaan 48 tuntia. Tämän tasapainottumisajan jälkeen testiaineen pitoisuus on mitattava sedimentin yläpuolisessa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä vähintään suurimmassa pitoisuudessa ja alemmassa pitoisuudessa (katso kohta 38). Näiden testiaineen analyyttisten määritysten perusteella voidaan laskea massatase, ja tulokset voidaan ilmoittaa mitattujen pitoisuuksien pohjalta.

Testiorganismien lisääminen

25. Neljä tai viisi päivää ennen testiorganismien lisäämistä munamassat otetaan viljelmistä ja pannaan pieniin astioihin kasvatusalustassa. Alustana voidaan käyttää kantaliuoksesta saatua kypsynyttä alustaa tai vasta valmistettua alustaa. Jälkimmäisessä tapauksessa kasvatusalustaan lisätään pieni määrä ravintoa, kuten viherlevää ja/tai muutama pisara hienoksi jauhetuista kalanruokahiutaleista saatua suodosta (katso lisäys 2). Käytä ainoastaan vastamunittuja munamassoja. Tavallisesti toukat alkavat kuoriutua muutama päivä munimisen jälkeen (*Chironomus riparius* 2–3 vrk lämpötilassa 20 °C, *Chironomus tentans* 1–4 vrk lämpötilassa 23 °C ja *Chironomus yoshimatui* 1–4 vrk lämpötilassa 25 °C), ja toukkien kasvu tapahtuu neljässä vaiheessa, joista jokainen kestää 4–8 päivää. Testissä käytetään ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkia (2–3 tai 1–4 vrk kuoriutumisen jälkeen). Sääskien kehitysvaiheen voi tarkistaa pääkapselin leveydestä (6).

26. Kaksikymmentä munatoukkaa sijoitetaan satunnaisesti tylpällä pipetillä jokaiseen testiastiaan, jossa on testiainetta sisältävää sedimenttiä ja vettä. Veden ilmastus on lopetettava, kun toukkia lisätään testiastioihin eikä sitä saa aloittaa 24 tuntiin toukkien lisäämisen jälkeen (katso kohdat 25 ja 32). Käytetyn testisuunnitelman (katso kohdat 19 ja 20) mukaisesti toukkien määrä pitoisuutta kohti on vähintään 60 EC-pisteen arviointia varten ja 80 NOEC-määritystä varten.

Testipitoisuudet

27. Raja-annostesti voi auttaa määrittämään pitoisuusaluetta varsinaista testiä varten. Tähän tarkoitukseen käytetään testiaineen pitoisuuksia laajoin pitoisuusvälein. Jotta surviaissääskien pintatiheys on sama, jota käytetään varsinaisessa testissä, surviaissääsket altistetaan jokaiselle testiaineen pitoisuudelle siksi aikaa, että sopivat testipitoisuudet voidaan arvioida. Rinnakkaisnäytteitä ei tarvita.

28. Varsinaisessa testissä käytettävät testipitoisuudet päätetään raja-annostestin perusteella. Käytössä on oltava vähintään viisi pitoisuutta, jotka valitaan kohdissa 18 ja 20 kuvatulla tavalla.

▼M4

Kontrollit

29. Testissä on käytettävä kontrolliastioita, joissa on sedimenttiä mutta ei testiainetta, ja soveltuvaa määrää rinnakkaisnäytteitä (katso kohdat 19–20). Jos testiaineen lisäyksessä on käytetty liuotinta (katso kohta 16), sedimentin liuotinkontrolli on lisättävä.

Testijärjestelmä

30. Käytettävät järjestelmät ovat staattisia. Puolistaattisia tai läpivirtausjärjestelmiä, joissa sedimentin yläpuolinen vesi uusiutuu ajoittain tai jatkuvasti, voidaan käyttää poikkeustapauksissa, kuten jos vedenlaatu ei sovellu testiorganismille tai vaikuttaa kemialliseen tasapainoon (esim. liuenneen hapen pitoisuus laskee liian matalaksi, eritystuotteiden pitoisuus nousee liian korkeaksi tai sedimentistä uuttuu mineraaleja, jotka vaikuttavat pH-arvoon ja/tai veden kovuuteen). Yleensä muut sedimentin päällä olevan veden laatua kohentavat toimet, kuten ilmastus, ovat kuitenkin riittäviä ja suositeltavia.

Ravinto

31. Toukkia on ruokittava mieluiten päivittäin tai vähintään kolmesti viikossa. Riittävä määrä kalanruokaa (suspensiona vedessä tai hienoksi jauhettuna, esim. TetraMin tai TetraPhyll, lisätietoja lisäyksessä 2) on 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui* -lajille) päivässä toukkaa kohden ensimmäisten 10 päivän aikana. Tätä vanhemmat toukat voivat tarvita vähän enemmän ruokaa: 0,5–1 mg päivässä toukkaa kohden pitäisi riittää testin loppuun saakka. Ravinnon määrää täytyy pienentää kaikissa käsittelyissä ja kontrolleissa, jos sienikasvua ilmenee tai kontrolleissa esiintyy kuolleisuutta. Jos sienikasvua ei saada loppumaan, testi on toistettava. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, organismien eloonjääntiin ja luontaiseen kasvuun tarvittava ravinnon määrä voidaan lisätä synteettiseen sedimenttiin ennen stabiloitumisvaihetta. Tässä tapauksessa on käytettävä kalanruoan sijaan kasviainesta, kuten 0,5 prosenttia (kuivapaino) nokkosen (*Urtica dioica*), valkomulperin (*Morus alba*), valkoapilan (*Trifolium repens*), pinaatin (*Spinacia oleracea*) tai muun kasviaineksen (*Cerophyl* tai alfaselluloosa) hienoksi jauhettuja lehtiä.

Inkubaatio-olosuhteet

32. Sedimentin päällä olevaa vettä aletaan ilmastaa varovasti mieluiten 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen, ja ilmastusta jatketaan testin loppuun saakka (on pidettävä huoli, ettei liuenneen hapen pitoisuus laske alle 60 prosenttiin ilman kyllästysarvosta). Ilmastus tapahtuu lasisella Pasteur-pipetillä, joka on kiinnitetty 2–3 senttiä sedimenttikerroksen yläpuolelle (yksi tai muutama kupla sekunnissa). Haihtuvia kemikaaleja testattaessa voidaan harkita, jätetäänkö vesi-sedimenttisysteemi ilmastamatta.

33. Testi tehdään vakiolämpötilassa 20 °C (± 2 °C). Suositeltu lämpötila *C. tentans* -lajille on 23 °C (± 2 °C) ja *C. yoshimatui* -lajille 25 °C (± 2 °C). Valoisa aika on 16 tuntia, ja valon voimakkuuden pitää olla 500–1 000 luksia.

▼M4

Altistuksen kesto

34. Altistus alkaa, kun toukat lisätään astioihin, joissa on testiainetta, ja kontrolliastioihin. Altistuksen enimmäiskesto on 28 vuorokautta lajeille *C. riparius* ja *C. yoshimatsui*, ja 65 vuorokautta lajille *C. tentans*. Jos sääsket kuoriutuvat aikaisemmin, testi voidaan lopettaa vähintään viisi päivää sen jälkeen, kun viimeinen surviaissääski on kasvanut täysikasvuiseksi kontrollissa.

Havainnot

Kuoriutuminen

35. Kehitysaika ja täysin kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien yhteismäärä määritetään. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

36. Testiastioita on tarkkailtava vähintään kolmesti viikossa ja epänormaalia käyttäytymistä on arvioitava silmämääräisesti (esim. sedimentistä poistuminen, epätavallinen uinti) kontrolliin verrattuna. Sääsket on laskettava päivittäin, kun kuoriutuminen on odotettavissa. Täysikasvuisten sääskien sukupuoli ja lukumäärä kirjataan päivittäin. Tunnistuksen jälkeen sääsket poistetaan astioista. Ennen testin loppua mahdollisesti munitut munamassat on kirjattava ylös ja poistettava, jottei sedimenttiin tule lisää toukkia. Myös niiden näkyvissä olevien koteloiden määrä, jotka eivät ole kuoriutuneet, on merkittävä ylös. Kuoriutumisen mittausohjeet ovat lisäyksessä 5.

Kasvu ja eloonjääänti

37. Jos tiedot 10 vuorokauden toukkien eloonjäännistä ja kasvusta tarvitaan, testin alussa on otettava käyttöön ylimääräisiä testiastioita myöhempää käyttöä varten. Toukat seulotaan ylimääräisten astioiden sedimentistä 250 µm:n seulalla. Kuolleiksi lasketaan toukat, jotka eivät liiku tai reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin. Myös ne toukat, joita ei otettu talteen, lasketaan kuolleiksi (mikrobit ovat saattaneet hajottaa testin alussa kuolleet toukat). Eloonjääneiden toukkien (tuhkaton) kuivapaino testiastiaa kohden määritetään ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiassa lasketaan. On hyödyllistä määrittää, missä kehitysvaiheessa eloonjääneet toukat ovat. Tähän tarkoitukseen voidaan mitata kunkin toukan pääkapselin leveys.

Mittaukset

Testiaineen pitoisuus

38. Ennen testin aloittamista (eli toukkien lisäämistä) otetaan sedimenttinäytteet (bulk) vähintään yhdestä astiasta käsittelyä kohden, jotta testiaineen pitoisuus sedimentissä voidaan määrittää. On suositeltavaa, että vähintään yläpuolisen veden, huokosveden ja sedimentin näytteet analysoidaan testin alussa (katso kohta 24) ja lopussa suurimmassa pitoisuudessa ja matalammassa pitoisuudessa. Testiaineen pitoisuudesta saadaan tietoa testiaineen käyttäytymisestä ja jakautumisesta vesi-sedimenttisysteemissä.

39. Jos välimittauksia tehdään (esim. päivänä 7) ja analyysiin tarvitaan suuria näytteitä, joiden ottaminen testiastioista vaikuttaisi testijärjestelmään, analyyttisiin määrityksiin käytetään ylimääräisistä testiastioista otettuja näytteitä. Näitä astioita käsitellään samalla tavoin kuin testiastioita (mukaan lukien testiorganismien lisääminen), mutta niitä ei käytetä biologiseen havainnointiin.

▼M4

40. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esim. 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää. Joskus pitoisuuksien analysointi huokosvedestä ei ole mahdollista, koska näyte on liian pieni.

Fysikaalis-kemialliset parametrit

41. Testiastioiden pH ja lämpötila on mitattava asiaankuuluvasti (katso kohta 10). Kovuus ja ammoniakki on mitattava kontrolliastioissa ja yhdessä testiastiassa suurimmalla pitoisuudella testin alussa ja lopussa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

42. Tämän testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutus uros- ja naarassääskien kehittymisnopeuteen ja täysin kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärään. 10 päivän testissä määritetään vaikutukset toukkien eloonjääntiin ja painoon. Jos eri sukupuolten herkkyydessä ei ilmene tilastollisesti merkitsevää eroa, urosten ja naaraiden tulokset voidaan yhdistää tilastollisia analyysejä varten. Sukupuolten väliset herkkyyserot voidaan määrittää tilastotieteellisesti esimerkiksi χ^2-r × 2 -taulukkotestillä. Toukkien eloonjäänti ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden määritetään 10 päivän kuluttua, jos tarpeen.

43. Kuivapainoon perustuvat vaikutuspitoisuudet lasketaan mieluiten testin alussa mitattujen sedimenttipitoisuuksien perusteella (katso kohta 38).

44. EC_{50}:n tai minkä tahansa muun EC_x:n piste-estimaattia laskettaessa astiakohtaisia tilastotietoja voidaan käyttää aitoina toistoina. Laskettaessa minkä tahansa EC_x-arvon luottamusväliä astioiden välinen vaihtelu on otettava huomioon tai vaihtoehtoisesti osoitettava vaihtelu niin pieneksi, että se voidaan jättää huomiotta. Jos malliin sovelletaan pienimmän neliösumman menetelmää, astiakohtaisiin tilastotietoihin on sovellettava muunnosta, jotta varianssin homogeenisuus paranee. EC_x-arvot on kuitenkin laskettava sen jälkeen, kun vaste on muunnettu takaisin alkuperäisarvoon.

45. Kun NOEC/LOEC on tarkoitus määrittää tilastollisen hypoteesin testillä, astioiden välinen vaihtelu on huomioitava esimerkiksi hierarkkisella ANOVAlla. Robustimpia testejä (21) voidaan käyttää soveltuvissa tilanteissa, kun tavalliset ANOVAn oletukset eivät täyty.

Kuoriutumisaste

46. Kuoriutumisasteet ovat dikotomisia tietoja, ja ne voidaan analysoida Cochran-Armitagen testillä, jota sovelletaan alaspäin askeltavasti, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa, ja näitä tietoja pidetään tämän odotuksen mukaisina. Jos näin ei ole, voidaan käyttää Fisherin tarkkaa testiä tai Mantel-Haenszelin testiä, jossa p-arvot on korjattu Bonferroni-Holmin menetelmällä. Jos on näyttöä siitä, että saman pitoisuuden toistojen välinen varianssi on suurempi kuin binomijakauma antaa edellyttää (ylihajonta), voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä tai Fisherin tarkkaa testiä (21).

▼**M4**

Kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa (ne) määritetään, ja summa jaetaan lisättyjen sääskien määrällä (na):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

jossa:

ER = kuoriutumisaste

n_e = kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa

n_a = astiaan lisättyjen toukkien määrä

47. Kun näytekoko on suuri ja ylihajontaa esiintyy, paras vaihtoehto on pitää kuoriutumisastetta jatkuvana vasteena ja käyttää esimerkiksi Williamsin testiä, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa ja yhdenmukainen kuoriutumisastetietojen kanssa. Dunnettin testi soveltuu, kun monotonisuutta ei esiinny. Näytekoko määritetään tässä suureksi, jos sekä kuoriutuneiden että kuoriutumattomien toukkien määrä on toistossa (astiassa) yli viisi.

48. Jos halutaan soveltaa ANOVA-menetelmiä, ER-arvot on ensin muunnettava arcsin-neliöjuuri-muunnoksella tai Tukey-Freemanin muunnoksella, jotta saadaan likimääräinen normaalijakauma ja varianssi tasoittuu. Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferroni) tai Mantel-Haenszelin testiä voidaan soveltaa, kun käytetään absoluuttisia frekvenssejä. Arcsin-neliöjuuri-muunnosta sovelletaan ottamalla kuoriutumisasteen neliöjuuren käänteinen sini ($\sin^{-1}$).

49. Kuoriutumisasteissa EC_x-arvot lasketaan käyttämällä regressioanalyysiä (tai esim. probit- (22), logit- tai Weibull-mallia tai soveltuvaa kaupallista ohjelmistoa). Jos regressioanalyysi epäonnistuu (esim. osittaisia vasteita on alle kaksi), käytetään muita parametrittomia menetelmiä, kuten liukuvaa keskiarvoa tai yksinkertaista interpolaatiota.

Kehittymisnopeus

50. Keskimääräinen kehittymisaika edustaa keskimääräistä ajanjaksoa toukkien lisäämisestä (testipäivä 0) kokeellisen sääskikohortin kuoriutumiseen. (Aidon kehittymisajan laskennassa on huomioitava toukkien ikä lisäyshetkellä.) Kehittymisnopeus on kehittymisajan käänteisluku (yksikkö: 1/vrk) ja edustaa päivässä tapahtuvaa toukkien kehittymistä. Kehittymisnopeuden käyttö on suositeltavaa näiden sedimentin toksisuuskokeiden arvioinnissa, sillä sen varianssi on pienempi ja se on homogeenisempi ja lähempänä normaalijakaumaa kuin kehittymisaika. Siksi tehokkaita parametritestimenetelmiä käytetään mieluummin kehittymisnopeuden kuin kehittymisajan kanssa. Kun kehittymisnopeus on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida regressioanalyysillä (esim. (23), (24)).

51. Seuraavissa tilastollisissa testeissä oletetaan, että tarkastuspäivänä × havaittu sääskimäärä kuoriutuu päivän x ja päivän x-l välissä (l = tarkastusvälin pituus, yleensä 1 päivä). Keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa (x) lasketaan seuraavasti:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼**M4**

jossa:

$\overline{x}$: keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa

i: tarkastusvälin indeksi

m: tarkastusvälien enimmäismäärä

f_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien määrä

n_e: testin lopussa kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärä ($=\sum f_i$)

x_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien kehittymisnopeus

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

jossa:

day_i: tarkastuspäivä (päivää lisäyksen jälkeen)

l_i: tarkastusvälin i pituus (päivissä, yleensä 1 päivä)

Testiraportti

52. Testiraportin on sisällettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (vesiliukoisuus, höyrynpaine, jakaantumiskerroin maa-aineksessa (tai sedimentissä, jos saatavissa), stabiilisuus vedessä jne.)

— kemialliset tunnistetiedot (yleisnimi, kemiallinen nimi, rakennekaava, CAS-numero jne.) sekä puhtaus ja testiaineen kvantifioinnissa käytetty analyysimenetelmä.

Testilajit:

— käytetyt koe-eläimet: lajit, tieteellinen nimi, eliöiden lähde ja kasvatusolosuhteet

— tiedot munamassojen ja toukkien käsittelystä

— koe-eläinten ikä testiastioihin lisättäessä.

Testiolosuhteet:

— käytetty sedimentti, eli luonnollinen vai synteettinen sedimentti

— luonnollisen sedimentin osalta sedimentin näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan lukien, jos mahdollista, kontaminaatiohistoria, ominaisuudet: pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, C/N-suhde ja rakeisuus (tarvittaessa)

— synteettisen sedimentin valmistus: ainesosat ja niiden ominaisuudet (orgaanisen hiilen pitoisuus, pH, kosteus jne. testin alussa)

— testiveden valmistus (jos käytetään synteettistä vettä) ja ominaisuudet (happipitoisuus, pH, johtavuus, kovuus jne. testin alussa)

— sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys

— sedimentin päällä olevan veden ja huokosveden tilavuus, märän sedimentin paino huokosveden kanssa ja ilman huokosvettä

▼M4

— testiastiat (materiaali ja koko)

— tapa, jolla testiaine lisättiin sedimenttiin: käytetyt pitoisuudet, toistojen määrä ja mahdollisen liuottimen käyttö

— vesi-sedimenttisysteemin stabilointivaihe: kesto ja olosuhteet

— inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valojakso ja valon voimakkuus, ilmastus (taajuus ja voimakkuus)

— yksityiskohtaiset tiedot syöttämisestä, kuten ravinnon tyyppi, valmistus, määrä ja syöttöaikataulu.

Tulokset:

— kaikki nimelliset testipitoisuudet, mitatut testipitoisuudet ja tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritettiin testiaineen pitoisuus testiastiassa

— testiastioissa olevan veden laatu, eli pH, lämpötila, liuennut happi, kovuus ja ammoniakki

— mahdollinen haihtuneen testiveden korvaus

— kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien määrä astiassa päivää kohden

— kuoriutumattomien toukkien määrä astiassa

— toukkien keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden, kehitysasteittain jos tarpeen

— kuoriutumisprosentti rinnakkaisnäytteessä ja testipitoisuudessa (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— täysin kuoriutuneiden sääskien keskimääräinen kehittymisnopeus rinnakkaisnäytteessä ja testissä (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— toksisten tutkittavien ominaisuuksien estimaatit, kuten EC_x (ja siihen liittyvät luottamusvälit), NOEC ja/tai LOEC, ja niiden määrittämiseen käytetyt tilastolliset menetelmät

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼**M4**

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850,1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Tämän liitteen testimenetelmä C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Synteettinen sedimentti on luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

Yläpuolinen vesi on testiastiassa sedimentin päällä oleva vesi.

Huokosvesi on sedimenttirakeiden välissä olevaa vettä.

Sedimentti, johon on lisätty testiaine.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 2

***Chironomus riparius* -lajin kasvatussuosituksia**

1. *Chironomus*-toukkia voi kasvattaa kiteytysmaljoissa tai suurissa astioissa. Astian pohjalle levitetään noin 5–10 mm:n paksuinen kerros hienoa kvartsihiekkaa. Myös piimaa (esim. Merck, tuotenro 8117) on osoitettu soveltuvaksi substraatiksi (ohuempi, enintään muutaman millimetrin paksuinen kerros riittää). Sen jälkeen lisätään monta senttiä soveltuvaa vettä. Jos haihtumista tapahtuu, kuivuminen on estettävä lisäämällä vettä tarvittaessa. Vesi voidaan vaihtaa tarvittaessa. Varovainen ilmastus on tarpeen. Toukkien kasvatusastioita on säilytettävä soveltuvassa häkissä, jotta kuoriutuvat aikuiset eivät pääse pakenemaan. Häkin on oltava tarpeeksi tilava, jotta kuoriutuneet aikuiset mahtuvat parveilemaan. Muutoin parittelua ei välttämättä tapahdu (vähimmäiskoko on n. 30 × 30 × 30 cm).

2. Häkkejä säilytetään huoneenlämmössä tai huoneessa, jonka lämpötila on vakioitu (20 ± 2 °C). Valoisa jakso on 16 tuntia (voimakkuus n. 1 000 luksia), pimeys 8 tuntia. On ilmoitettu, että lisääntyminen voi estyä, jos ilman suhteellinen kosteus on alle 60 prosenttia.

Laimennusvesi

3. Mitä tahansa soveltuvaa luonnollista tai synteettistä vettä voidaan käyttää. Kaivovesi, talousvesi, josta on poistettu kloori, ja keinotekoinen neste (esim. Elendtin ”M4”- tai ”M7”-liuos, ks. jäljempänä) ovat yleisesti käytettyjä. Vesi on ilmastettava ennen käyttöä. Kasvatusvesi voidaan tarvittaessa uusia kaatamalla tai lappamalla käytetty vesi kasvatusastioista varoen tuhoamasta toukkaputkia.

Toukkien ruokinta

4. *Chironomus*-toukat ruokitaan kalojen hiutaleruoalla (TetraMin®, TetraPhyll® tai muu vastaava kaupallinen kalanruoka), jota annetaan noin 250 mg astiaa kohden päivässä. Ruoka voidaan antaa kuivana jauheena tai suspensiona vedessä: 1,0 g hiutaleruokaa lisätään 20 ml:aan laimennusvettä ja seos sekoitetaan homogeeniseksi. Tätä valmistetta voi antaa noin 5 ml astiaa kohden päivässä (ravista ennen käyttöä). Vanhoille toukille voi antaa enemmän ruokaa.

5. Ruokkimista säädellään vedenlaadun mukaan. Jos kasvatusalusta muuttuu sameaksi, ravinnon määrää on vähennettävä. Ravinnon määrän lisäämistä on seurattava tarkasti. Jos ravintoa on liian vähän, toukat siirtyvät kohti vesipatsasta, ja jos ravintoa on liian paljon, mikrobien toiminta voi lisääntyä ja happipitoisuudet laskea. Kumpikin vaihtoehto voi laskea kasvunopeutta.

6. Vähän viherlevän (esim. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) soluja voidaan lisätä, kun uusia kasvatusastioita perustetaan.

Kuoriutuneiden aikuisten ruokinta

7. Eräät kokeen suorittajat ovat ehdottaneet, että kylläisessä sakkaroosiliuoksessa liotettu vanutuppo saattaa riittää kuoriutuneiden aikuisten ravinnoksi.

▼M4

Kuoriutuminen

8. Kun lämpötila on 20 ± 2 °C, toukkien kasvatusastioista alkaa kuoriutua aikuisia noin 13–15 päivän kuluttua. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

Munamassat

9. Kun kasvatushäkissä on aikuisia, kaikista toukkien kasvatusastioista on tarkistettava kolme kertaa viikossa, onko niissä hyytelömäisiä munamassoja. Jos munamassoja on, ne on poistettava varovasti. Ne siirretään pieneen astiaan, jossa on pieni määrä kasvatusvettä. Munamassoja voi käyttää uuden viljelyastian perustamiseen (esim. 2–4 munamassaa astiaa kohden) tai toksisuustesteihin.

10. Munatoukkien pitäisi kuoriutua 2–3 päivän kuluttua.

Uusien viljelyastioiden perustaminen

11. Kun viljelmät on perustettu, uuden toukkaviljelyastian voi aloittaa testivaatimusten mukaan kerran viikossa tai harvemmin. Vanhat astiat poistetaan, kun aikuiset sääsket ovat kuoriutuneet. Näin saadaan säännöllisesti aikuisia mahdollisimman vähäisellä vaivalla.

Testiliuosten ”M4” ja ”M7” valmistus

12. Elendt (1990) kuvasi ”M4”-liuoksen. ”M7”-liuos valmistetaan samoin kuin ”M4” lukuun ottamatta taulukossa 1 merkittyjä aineita, joiden pitoisuus on neljä kertaa pienempi ”M7”-liuoksessa kuin ”M4”-liuoksessa. ”M7”-liuosta koskeva julkaisu on valmisteilla (Elendt, henkilökohtainen viesti). Testiliuosta ei valmisteta Elendtin ja Biasin mukaan (1990), sillä kantaliuosten valmistusta varten annetut $NaSiO_3$-, 5 H_2O-, $NaNO_3$-, KH_2PO_4- ja K_2HPO_4-pitoisuudet eivät ole riittäviä.

”M7”-liuoksen valmistus

13. Jokainen kantaliuos (I) valmistetaan erikseen, ja näistä kantaliuoksista (I) valmistetaan yhdistetty kantaliuos (II) (katso taulukko 1). ”M7”-liuos valmistetaan täyttämällä 50 millilitraa yhdistettyä kantaliuosta (II) ja taulukossa 2 annetut määrät jokaista makroravinteiden kantaliuosta 1 litraksi deionisoitua vettä. Vitamiinien kantaliuos valmistetaan lisäämällä deionisoituun veteen kolmea vitamiinia taulukon 3 mukaisesti, ja 0,1 millilitraa yhdistettyä vitamiinien kantaliuosta lisätään lopulliseen ”M7”-liuokseen vähän ennen käyttöä. (Vitamiinien kantaliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä.) Liuos ilmastetaan ja stabiloidaan.

KIRJALLISUUSVIITTEET

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Taulukko 1

Hivenaineiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

Kantaliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn kantaliuoksen (II) valmistus: Sekoita seuraavat määrät (ml) kantaliuoksia (I) ja täytä 1 litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Nämä aineet ovat erilaiset M4- ja M7-liuoksissa, kuten edellä kerrottiin.
(2) Nämä liuokset valmistetaan erikseen. Sitten ne kaadetaan yhteen ja käsitellään välittömästi autoklaavissa.

Taulukko 2

Makroravinteiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn makroravinteiden kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Taulukko 3

Vitamiinien kantaliuos M4- ja M7-liuosta varten. Kaikki kolme vitamiiniliuosta yhdistetään yhdeksi vitamiinien kantaliuokseksi.

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn vitamiinien kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinihydrokloridi	750	0,1	0,075
Syaanikobalamiini (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiini	7,5	0,1	0,00075

KIRJALLISUUSVIITTEET

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

Lisäys 3

SYNTEETTISEN SEDIMENTIN VALMISTUS

Sedimentin koostumus

Synteettisen sedimentin koostumuksen on oltava seuraavanlainen:

Ainesosa	Ominaisuudet	Prosenttiosuus sedimentin kuivapainosta
Turve	Rahkasuoturvetta, pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä, hienoksi jauhettuna (hiukkaskoko ≤ 1 mm) ja ilmakuivattuna	4–5
Kvartsihiekka	Raekoko: > 50 prosenttia hiukkasista on oltava kokoa 50–200 μm	75–76
Kaoliniittisavi	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %	20
Orgaaninen hiili	Säädetään lisäämällä turvetta ja hiekkaa	2 (± 0,5)
Kalsiumkarbonaatti	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas	0,05–0,1
Vesi	Johtavuus ≤ 10 μS/cm	30–50

Valmistelut

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi. Tarvittava määrä turvejauhetta suspendoidaan deionisoituun veteen käyttämällä tehokasta homogenisointilaitetta. Suspension pH-arvoksi säädetään 5,5 ± 0,5 $CaCO_3$:lla. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen. Arvon pitäisi olla 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen turvesuspensioon sekoitetaan muut ainesosat (hiekka ja kaoliniittisavi) ja deionisoitu vesi, jotta saadaan homogeenistä sedimenttiä, jonka vesipitoisuus on 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta. Lopullisen seoksen pH mitataan vielä kerran, ja se säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla alueelle 6,5–7,5. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. On suositeltavaa, että synteettistä sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-elöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat.

Säilytys

Synteettisen sedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa huoneenlämmössä. Valmistettua (märkää) sedimenttiä ei saa säilyttää ennen käyttöä tässä testissä. Se on käytettävä heti valmistuksen lopussa olevan 7 päivän sopeutusajan jälkeen.

KIRJALLISUUSVIITTEET

Tämän liitteen luku C.8. Myrkyllisyystutkimus madoilla.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Lisäys 4

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

Aine	Pitoisuudet
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Kovuus $CaCO_3$:na	< 400 mg/l (*)
Jäännöskloori	< 10 mg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

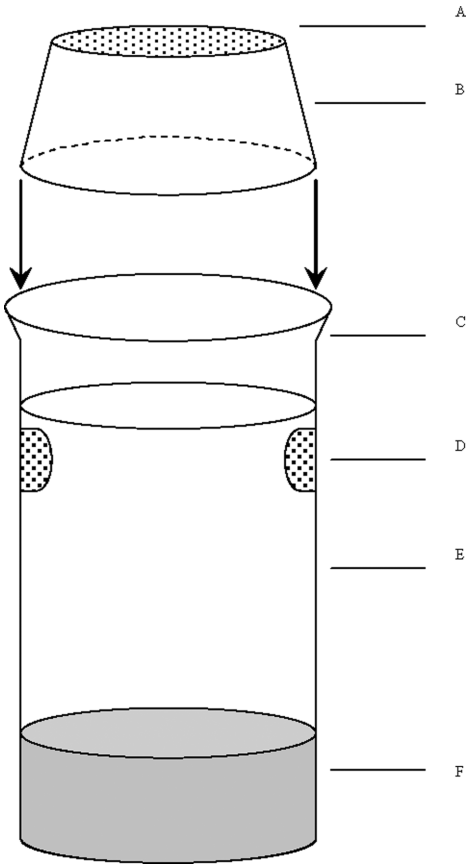
(*) Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä).

▼**M4**

Lisäys 5

Chironomid-toukkien kuoriutumisen tarkkailuohjeet

Dekantterilaseihin asetetaan pyydykset kuoriutuneita toukkia varten. Näitä pyydyksiä tarvitaan päivästä 20 lähtien testin loppuun saakka. Alla on esimerkki käytetystä pyydyksestä:



A: polyamidiverkko

B: ylösalaisin käännetyt muovikupit

C: reunukseton altistusdekantterilasi

D: verkkoaukot vedenvaihtoa varten

E: vettä

F: sedimentti

▼M4

C.28 MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN VETTÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 219 (2004). Tällä testimenetelmällä on tarkoitus arvioida pitkäaikaisen kemikaalialtistuksen vaikutuksia makean veden kaksisiipisen *Chironomus*-lajin (surviaissääsken) toukkiin, jotka elävät sedimentissä. Menetelmä perustuu pääosion BBA:n ohjeistukseen, jossa käytetään vesi-sedimenttisysteemiä, keinomaata ja vesipatsaan altistusmenetelmää (1). Siinä huomioidaan myös *Chironomus riparius*- ja *Chironomus tentans* -lajien toksisuustestimenettelyt, jotka on kehitetty Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) ja vahvistettu yhteistutkimuksissa (ring-test) (1)(6)(9). Myös muita hyvin dokumentoituja chironomid-lajeja, kuten *Chironomus yoshimatsui* (10)(11), voidaan käyttää.

2. Tässä testimenetelmässä altistaminen tapahtuu lisäämällä testiainetta veteen. Soveltuvan altistuksen valinta määräytyy testin sovellustarkoituksen mukaan. Vesialtistuksessa, jossa testiainetta lisätään vesipatsaaseen, tarkoituksena on simuloida torjunta-aineiden lentosumutusta. Se kattaa alkuhuippupitoisuudet huokosvedessä. Menetelmä on hyödyllinen myös muuntyyppisissä altistuksissa (mukaan lukien kemikaalivuoto) lukuun ottamatta kertymisprosesseja, jotka kestävät kauemmin kuin testijakso.

3. Aineet, joita sedimentissä elävillä eliöillä testataan, säilyvät yleensä sedimentissä pitkään. Sedimentissä elävien eliöiden altistamiseen voidaan käyttää useita reittejä. Jokaisen altistusreitin suhteellinen tärkeys sekä toksiseen kokonaisvaikutukseen vaadittava aika määräytyvät käytettävän kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, kontaminoituneen ravinnon nauttiminen voi olla tärkeä altistusreitti. Jotta hyvin rasvahakuisten aineiden myrkyllisyyttä ei aliarvioida, voidaan harkita ravinnon lisäämistä sedimenttiin ennen testiaineen lisäämistä. Jotta kaikki mahdolliset altistusreitit voidaan huomioida, tämä testimenetelmä keskittyy pitkäaikaiseen altistukseen. Testin kesto on 20–28 päivää *C. riparius*- ja *C. yoshimatsui* -lajeille ja 28–65 päivää *C. tentans* -lajille. Jos lyhytaikaisia tietoja tarvitaan tiettyyn tarkoitukseen, kuten epävakaiden kemikaalien vaikutusten tutkimiseen, ylimääräiset rinnakkaisnäytteet voidaan poistaa 10 päivän jälkeen.

4. Mitatut tutkittavat ominaisuudet ovat kuoriutuneiden täysikasvuisten kokonaismäärä ja kuoriutumiseen kulunut aika. Jos lyhytaikaiset lisätiedot ovat tarpeen, toukkien eloonjäämistä ja kasvua on suositeltavaa mitata vasta kymmenen päivän kuluttua käyttämällä ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä.

5. Synteettisen sedimentin käyttö on suositeltavaa. Synteettisellä sedimentillä on useita etuja luonnolliseen sedimenttiin verrattuna:

— kokeellinen vaihtelu vähenee, koska sedimentti on toistettava ”vakiomatriisi”, eikä kontaminoitumattomia ja puhtaita sedimenttilähteitä tarvitse etsiä

— testit voidaan aloittaa milloin tahansa ilman, että testisedimentin kausivaihtelua esiintyy, sedimentistä ei tarvitse poistaa alkuperäiselimistöä esikäsittelyllä ja lisäksi synteettisen sedimentin käyttö pienentää kuluja, joita rutiinitestaukseen tarvittavan sedimenttimäärän keräämisestä kentältä syntyy

▼M4

— synteettisen sedimentin käyttö sallii toksisuuden vertailun ja aineiden lajittelemisen myrkyllisyyden mukaan: testien, joissa käytettiin luonnollista sedimenttiä ja synteettistä sedimenttiä, toksisuustiedot olivat verrattavissa useiden kemikaalien osalta (2).

6. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

7. Surviaissääsken munatoukat altistetaan testiaineen pitoisuusalueelle vesi-sedimenttisysteemeissä. Testi aloitetaan lisäämällä munatoukkia dekanterilaseihin, joissa on vesi-sedimenttisysteemiä, ja lisäämällä sen jälkeen testiainetta veteen. Surviaissääskien kuoriutumisaste ja kehittymisnopeus mitataan testin lopussa. Toukkien eloonjäänti ja paino voidaan myös tarvittaessa mitata 10 päivän kuluttua (käytättämällä soveltuvia ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä). Nämä tiedot analysoidaan regressiomallilla, jolla arvioidaan pitoisuus, joka aiheuttaa X prosentin laskun kuoriutumisessa, toukkien eloonjäännissä tai painossa (esim. EC_{15}, EC_{50}), tai tilastollisen hypoteesin testillä, jolla määritetään NOEC/LOEC. Jälkimmäinen vaihtoehto edellyttää vaikutusarvojen vertaamista vertailuarvoihin tilastotutkimuksilla.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

8. Testiaineen vesiliukoisuuden, höyrynpaineen, mitatun tai lasketun erottumisen erottuminen sedimenttiin sekä stabiiliuden vedessä ja sedimentissä on oltava tiedossa. Käytössä on oltava luotettava analyysimenetelmä, jolla testiaine voidaan kvantifioida sedimentin päällä olevassa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä, ja menetelmän tarkkuus ja havaitsemisraja tunnetaan ja ne on raportoitu. Hyödyllisiä tietoja ovat esimerkiksi rakennekaava ja testiaineen puhtaus. Myös testiaineen kemiallinen kohtalo (esim. häviäminen, abioottinen ja bioottinen hajoaminen) on hyödyllistä tietää. Kirjallisuusviitteessä (12) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

VERTAILUKEMIKAALIT

9. Testimenettelyn ja testiolosuhteiden luotettavuus voidaan tarkistaa testaamalla ajoittain vertailukemikaaleja. Esimerkkejä vertailumyrkyistä, joita on käytetty onnistuneesti yhteistutkimuksissa ja validointitutkimuksissa: lindaani, trifluraliini, pentakloorifenoli, kadmiumkloridi ja kaliumkloridi. (1)(2)(5)(6)(13).

TESTIN LUOTETTAVUUS

10. Testi on luotettava, jos

— kuoriutuvuus kontrolleissa on vähintään 70 prosenttia testin lopussa (1)(6)

— *C. riparius* ja *C. yoshimatsui* aikuistuvat kontrolliastioissa 12–23 päivän kuluessa astiaan laittamisesta. *C. tentans* vaatii 20–65 päivää

— testin lopussa mitataan jokaisen astian pH ja liuenneen hapen pitoisuus. Happipitoisuuden täytyy olla vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta (ASV) käytetyssä lämpötilassa, ja sedimentin päällä olevan veden pH-arvon pitää olla 6–9 kaikissa testiastioissa

▼M4

— veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,0 °C. Veden lämpötilaa voidaan kontrolloida tasalämpöisessä huoneessa, jolloin huoneen lämpötila on tarkistettava soveliain väliajoin.

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

11. Tutkimus tehdään 600 ml:n dekantterilaseissa, joiden halkaisija on 8 cm. Muitakin astioita voidaan käyttää, kunhan sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys on sopiva. Sedimentin pinta-alan on oltava riittävä, jotta tilaa on 2–3 cm^2 toukkaa kohden. Sedimenttikerroksen ja sen päällä olevan veden syvyyden suhteen on oltava 1:4. Testiastioiden ja muiden testijärjestelmän kanssa kosketuksissa olevien välineiden on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia (esim. teflonia).

Lajin valinta

12. Paras laji tähän testiin on *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* soveltuu myös, mutta sen käsittely on hankalampaa ja se edellyttää pidempää testijaksoa. Myös *Chironomus yohimatsui* -lajia voidaan käyttää. Tietoa *Chironomus riparius* -lajin kasvatusmenetelmistä on lisäyksessä 2. Myös muiden lajien kasvatusolosuhteista on saatavissa tietoa: *Chironomus tentans* (4) and *Chironomus yoshimatsui* (11). Lajin tunnistus on varmistettava ennen testiä, mutta sitä ei ole tarpeen tehdä ennen joka testiä, jos eliöt ovat peräisin omasta kasvattamosta.

Sedimentti

13. Synteettisen sedimentin (keinosedimentin) käyttö on suositeltavaa. Jos kuitenkin käytetään luonnollista sedimenttiä, se on kuvailtava (vähintään pH, orgaaninen kokonaishiilipitoisuus, mutta myös muut parametrit, kuten C/N-suhde ja rakeisuus ovat suositeltavia), eikä siinä saa olla kontaminaatiota tai muita organismeja, jotka saattavat kilpailla chironomid-eliöiden kanssa tai syödä ne. Lisäksi on suositeltavaa, että luonnollista sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat. Tätä testiä varten suositellaan seuraavaa synteettistä sedimenttiä, joka perustuu testimenetelmässä C.8 (14) käytettyyn keinomaahan (1)(15)(16):

a) 4–5 % (kuivapaino) turvetta: pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0; on tärkeää käyttää ainoastaan ilmakuivattua jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm)

b) 20 % (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 %)

c) 75–76 % (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, yli 50 prosenttia 50–200 μm:n hiukkasia)

d) deionisoitua vettä lisätään, kunnes lopullisen seoksen kosteus on 30–50 %

e) kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5

f) orgaanisen hiilen pitoisuuden on oltava lopullisessa seoksessa 2 % (± 0,5 %). Sitä voidaan säätää lisäämällä sopiva määrä turvetta ja hiekkaa kohtien a ja c mukaisesti.

▼M4

14. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperän on oltava tiedossa. Tarkista, ettei sedimentin ainesosissa ole kemikaalista kontaminaatiota (esim. raskasmetalleja, orgaanisia klooriyhdisteitä ja orgaanisia fosforiyhdisteitä). Esimerkki synteettisen sedimentin valmistuksesta on lisäyksessä 3. Myös kuivien ainesosien sekoittaminen on hyväksyttävää, jos voidaan osoittaa, että sedimentin ainesosat eivät erotu (esim. kelluvia turvehiukkasia) veden lisäämisen jälkeen ja että turve tai sedimentti on sopeutunut tarpeeksi.

Vesi

15. Testivedeksi soveltuu vesi, joka täyttää lisäyksissä 2 ja 4 luetellut laimennusveden kemialliset ominaisuudet. Kasvatus- ja testivedeksi soveltuu mikä tahansa vesi, luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi (katso lisäys 2) tai talousvesi, josta on poistettu kloori, jos surviaissääsket voivat elää siinä viljelyn ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Testiveden pH-arvon on oltava testin alussa 6–9, eikä kokonaiskovuus $CaCO_3$:na saa olla yli 400 mg/l. Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä). Samantyyppistä vettä on käytettävä koko tutkimuksen ajan. Lisäyksessä 4 luetellut vedenlaadun ominaisuudet on mitattava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi.

Kantaliuokset – vesi, johon on lisätty testiainetta

16. Testipitoisuudet lasketaan vesipatsaan eli sedimentin päällä olevan veden pitoisuuksien perusteella. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan tavallisesti kantaliuoksista laimentamalla. Kantaliuokset valmistetaan mieluiten liuottamalla testiainetta testiviljelyaineeseen. Liuottimien tai dispergointiaineiden käyttö voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi. Esimerkkejä sallituista liuottimista ovat asetoni, etanoli, metanoli, etyleeniglykolimonoetyylieetteri, etyleeniglykolidimetyylieetteri, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sallittuja dispergointiaineita ovat Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metyyliselluloosa ja HCO-40. Liuotusapuaineen pitoisuuden on oltava mahdollisimman pieni lopullisessa testiviljelyaineessa (≤ 0,1 ml/l), ja sen on oltava sama kaikissa käsittelyissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta eloonjäämiseen eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia varhaisiin kehitysvaiheisiin. Se on osoitettava ainoastaan liuotinta sisältävän kontrollin avulla. Näiden aineiden käyttöä on kuitenkin vältettävä mahdollisimman pitkälle.

TESTISUUNNITELMA

17. ”Testisuunnitelma” tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, astioiden lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja toukkien lukumäärää astiaa kohti. Suunnitelmat EC-pisteen arviointia, NOEC:n määritystä ja rajatestin tekemistä varten on kuvattu. Regressioanalyysi on parempi vaihtoehto kuin hypoteesin testaus.

Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma

18. Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. EC_{15}, EC_{50}) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta. Tarkkuus ja etenkin luotettavuus, jolla vaikutuspitoisuuksien (EC_x) estimaatit voidaan tehdä, paranee yleensä, kun vaikutuspitoisuus

▼M4

sijoittuu testattujen pitoisuuksien alueelle. Ekstrapolointia paljon matalimman positiivisen pitoisuuden alle tai korkeimman pitoisuuden ylle on vältettävä. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa (katso kohta 27).

19. Jos halutaan arvioida EC_x, jokaisesta pitoisuudesta tarvitaan vähintään viisi testipitoisuutta ja kolme rinnakkaisnäytettä. On joka tapauksessa suositeltavaa käyttää riittäviä testipitoisuuksia, jotta mallin estimointi onnistuu hyvin. Pitoisuuksien välinen kerroin ei saa olla yli kaksi (poikkeus voidaan tehdä, jos annosvastekäyrä on loiva). Käsittelyssä käytettävien toistojen määrää voidaan laskea, jos eri vasteita aiheuttavien testipitoisuuksien määrää nostetaan. Jos toistojen määrää lisätään tai testipitoisuuden välejä pienennetään, testin luottamusväli yleensä kapenee. Toistoja tarvitaan lisää, jos halutaan arvioida toukkien eloonjäänti ja kasvu 10 päivän aikana.

NOEC:n/LOEC:n estimointiin suositeltava testisuunnitelma

20. Jos halutaan arvioida LOEC tai NOEC, on käytettävä vähintään viittä testipitoisuutta ja vähintään neljää toistoa, eikä pitoisuuksien välinen kerroin saa olla yli kaksi. Toistojen määrän on oltava riittävän suuri, jotta tilastollinen voima on riittävä ja kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Kehittymisnopeuteen soveltuu yleensä varianssianalyysi (ANOVA), kuten Dunnett-testi ja Williams-testi (17)(18)(19)(20). Kuoriutumisasteeseen voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferronin korjauksella) tai Mantel-Haenszelin testiä.

Rajatesti

21. Rajatesti (yksi testipitoisuus ja kontrolli) voidaan tehdä, jos alustavassa pitoisuusalueen määrityksessä ei havaittu vaikutuksia. Rajatestin tarkoituksena on osoittaa, että testiaineen toksisuusarvo on suurempi kuin testattu rajapitoisuus. Tässä testimenetelmässä ei voida suositella pitoisuutta, joten asia jätetään sääntelyviranomaisten harkittavaksi. Yleensä vähintään kuusi rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä on tarpeen. On osoitettava, että tilastollinen voima on riittävä, jotta kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Jos vaste on metrinen (kehittymisnopeus ja paino), t-testi on soveltuva tilastollinen menetelmä, jos tiedot täyttävät tämän testin vaatimukset (normaalisuus, homogeeniset vaihtelut). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia, tai parametritonta testiä, kuten Wilcoxon-Mann-Whitheyn testiä. Fisherin tarkka testi soveltuu kuoriutumisasteeseen.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Vesi-sedimenttisysteemin valmistelu käyttäen vettä, johon tutkittavaa ainetta on lisätty

22. Testiastioihin lisätään sopiva määrä synteettistä sedimenttiä (katso kohdat 13–14 ja lisäys 3), jotta kerroksen paksuus on vähintään 1,5 cm. Vettä lisätään, kunnes sen syvyys on 6 cm (katso kohta 15). Sedimenttikerroksen ja veden syvyyden suhde ei saa olla yli 1:4, eikä sedimenttikerroksen paksuus saa olla yli 3 cm. Vesi-sedimenttisysteemiä on ilmastettava varovasti seitsemän päivää ennen testiorganismien lisäämistä (katso kohta 14 ja lisäys 3). Sedimentin voi peittää muovikiekolla, kun vettä kaadetaan päälle, jotta sedimentin ainesosien erottuminen ja hienon materiaalin resuspensio voidaan välttää, mutta kiekko on poistettava heti tämän jälkeen. Myös muut välineet voivat olla sopivia.

▼M4

23. Testiastiat on peitettävä (esim. lasilevyillä). Jos vettä haihtuu tutkimuksen aikana, lisää vettä, kunnes veden tilavuus on alkuperäisellä tasolla. Käytä tähän tarkoitukseen tislattua tai deionisoitua vettä, jotta suoloja ei keräydy.

Testiorganismien lisääminen

24. Neljä tai viisi päivää ennen testiorganismien lisäämistä munamassat otetaan viljelmistä ja pannaan pieniin astioihin kasvatusalustassa. Alustana voidaan käyttää kantaliuoksesta saatua kypsynyttä alustaa tai vasta valmistettua alustaa. Jälkimmäisessä tapauksessa kasvatusalustaan lisätään pieni määrä ravintoa, kuten viherlevää ja/tai muutama pisara hienoksi jauhetuista kalanruokahiutaleista saatua suodosta (katso lisäys 2). Käytä ainoastaan vastamunittuja munamassoja. Tavallisesti toukat alkavat kuoriutua muutama päivä munimisen jälkeen (*Chironomus riparius* 2–3 vrk lämpötilassa 20 °C, *Chironomus tentans* 1–4 vrk lämpötilassa 23 °C ja *Chironomus yoshimatui* 1–4 vrk lämpötilassa 25 °C), ja toukkien kasvu tapahtuu neljässä vaiheessa, joista jokainen kestää 4–8 päivää. Testissä käytetään ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkia (2–3 tai 1–4 vrk kuoriutumisen jälkeen). Sääskien kehitysvaiheen voi tarkistaa pääkapselin leveydestä (6).

25. Kaksikymmentä munatoukkaa sijoitetaan satunnaisesti tylpällä pipetillä jokaiseen testiastiaan, jossa on testiainetta sisältävää sedimenttiä ja vettä. Veden ilmastus on lopetettava, kun toukkia lisätään testiastioihin eikä sitä saa aloittaa 24 tuntiin toukkien lisäämisen jälkeen (katso kohdat 24 ja 32). Käytetyn testisuunnitelman (katso kohdat 19 ja 20) mukaisesti toukkien määrä pitoisuutta kohti on vähintään 60 EC-pisteen arviointia varten ja 80 NOEC-määritystä varten.

26. 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen sedimentin päällä olevaan veteen lisätään testiainetta, ja aloitetaan kevyt ilmastus. Pieni määrä testiaineliuosta lisätään pipetillä vedenpinnan alle. Sen jälkeen sedimentin päällä oleva vesi sekoitetaan varoen häiritsemästä sedimenttiä.

Testipitoisuudet

27. Raja-annostesti voi auttaa määrittämään pitoisuusaluetta varsinaista testiä varten. Tähän tarkoitukseen käytetään testiaineen pitoisuuksia laajoin pitoisuusvälein. Jotta surviaissääskien pintatiheys on sama, jota käytetään varsinaisessa testissä, surviaissääsket altistetaan jokaiselle testiaineen pitoisuudelle siksi aikaa, että sopivat testipitoisuudet voidaan arvioida. Rinnakkaisnäytteitä ei tarvita.

28. Varsinaisessa testissä käytettävät testipitoisuudet päätetään raja-annostestin perusteella. Käytössä on oltava vähintään viisi pitoisuutta, jotka valitaan kohdissa 18 ja 20 kuvatulla tavalla.

Kontrollit

29. Testissä on käytettävä kontrolliastioita, joissa on sedimenttiä mutta ei testiainetta, ja soveltuvaa määrää rinnakkaisnäytteitä (katso kohdat 19–20). Jos testiaineen lisäyksessä on käytetty liuotinta (katso kohta 16), sedimentin liuotinkontrolli on lisättävä.

▼M4

Testijärjestelmä

30. Käytettävät järjestelmät ovat staattisia. Puolistaattisia tai läpivirtausjärjestelmiä, joissa sedimentin yläpuolinen vesi uusiutuu ajoittain tai jatkuvasti, voidaan käyttää poikkeustapauksissa, kuten jos vedenlaatu ei sovellu testiorganismille tai vaikuttaa kemialliseen tasapainoon (esim. liuenneen hapen pitoisuus laskee liian matalaksi, erityistuotteiden pitoisuus nousee liian korkeaksi tai sedimentistä uuttuu kivennäisaineita, jotka vaikuttavat pH-arvoon ja/tai veden kovuuteen). Yleensä muut sedimentin päällä olevan veden laatua kohentavat toimet, kuten ilmastus, ovat kuitenkin riittäviä ja suositeltavia.

Ravinto

31. Toukkia on ruokittava mieluiten päivittäin tai vähintään kolmesti viikossa. Riittävä määrä kalanruokaa (suspensiona vedessä tai hienoksi jauhettuna, esim. TetraMin tai TetraPhyll, lisätietoja lisäyksessä 2) on 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui* -lajille) päivässä toukkaa kohden ensimmäisten 10 päivän aikana. Tätä vanhemmat toukat voivat tarvita vähän enemmän ruokaa: 0,5–1 mg päivässä toukkaa kohden pitäisi riittää testin loppuun saakka. Ruoan määrää pitää pienentää kaikissa käsittelyissä ja säädellä, jos sienikasvua ilmenee tai kontrolleissa esiintyy kuolleisuutta. Jos sienikasvua ei saada loppumaan, testi on toistettava. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow}>5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, organismien eloonjääntiin ja luontaiseen kasvuun tarvittava ravinnon määrä voidaan lisätä synteettiseen sedimenttiin ennen stabiloitumisvaihetta. Tässä tapauksessa on käytettävä kalanruoan sijaan kasviainesta, kuten 0,5 prosenttia (kuivapaino) nokkosen (*Urtica dioica*), valkomulperin (*Morus alba*), valkoapilan (*Trifolium repens*), pinaatin (*Spinacia oleracea*) tai muun kasviaineksen (*Cerophyl* tai alfaselluloosan) hienoksi jauhettuja lehtiä.

Inkubaatio-olosuhteet

32. Sedimentin päällä olevaa vettä aletaan ilmastaa varovasti mieluiten 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen, ja ilmastusta jatketaan testin loppuun saakka (on pidettävä huoli, ettei liuenneen hapen pitoisuus laske alle 60 prosenttiin ilman kyllästysarvosta). Ilmastus tapahtuu lasisella Pasteur-pipetillä, joka on kiinnitetty 2–3 senttiä sedimenttikerroksen yläpuolelle (yksi tai muutama kupla sekunnissa). Haihtuvia kemikaaleja testattaessa voidaan harkita, jätetäänkö vesi-sedimenttisysteemi ilmastamatta.

33. Testi tehdään vakiolämpötilassa 20 °C (± 2 °C). Suositeltu lämpötila *C. tentans* -lajille on 23 °C (± 2 °C) ja *C. yoshimatui* -lajille 25 °C (± 2 °C). Valoisa aika on 16 tuntia, ja valon voimakkuuden pitää olla 500–1 000 luksia.

Altistuksen kesto

34. Altistus alkaa, kun toukat lisätään astioihin, joissa on testiainetta, ja kontrolliastioihin. Altistuksen enimmäiskesto on 28 vuorokautta lajeille *C. riparius* ja *C. yoshimatsui*, ja 65 vuorokautta lajille *C. tentans*. Jos sääsket kuoriutuvat aikaisemmin, testi voidaan lopettaa vähintään viisi päivää sen jälkeen, kun viimeinen surviaissääski on kasvanut täysikasvuiseksi kontrollissa.

HAVAINNOT

Kuoriutuminen

35. Kehitysaika ja täysin kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien yhteismäärä määritetään. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

▼M4

36. Testiastioita on tarkkailtava vähintään kolmesti viikossa ja epänormaalia käyttäytymistä on arvioitava silmämääräisesti (esim. sedimentistä poistuminen, epätavallinen uinti) kontrolliin verrattuna. Sääsket on laskettava päivittäin, kun kuoriutuminen on odotettavissa. Täysikasvuisten sääskien sukupuoli ja lukumäärä kirjataan päivittäin. Tunnistuksen jälkeen sääsket poistetaan astioista. Ennen testin loppua mahdollisesti munitut munamassat on kirjattava ylös ja poistettava, jottei sedimenttiin tule lisää toukkia. Myös niiden näkyvissä olevien koteloiden määrä, jotka eivät ole kuoriutuneet, on merkittävä ylös. Kuoriutumisen mittausohjeet ovat lisäyksessä 5.

Kasvu ja eloonjäänti

37. Jos tiedot 10 vuorokauden toukkien eloonjäännistä ja kasvusta tarvitaan, testin alussa on otettava käyttöön ylimääräisiä testiastioita myöhempää käyttöä varten. Toukat seulotaan ylimääräisten astioiden sedimentistä 250 µm:n seulalla. Kuolleiksi lasketaan toukat, jotka eivät liiku tai reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin. Myös ne toukat, joita ei otettu talteen, lasketaan kuolleiksi (mikrobit ovat saattaneet hajottaa testin alussa kuolleet toukat). Eloonjääneiden toukkien (tuhkaton) kuivapaino testiastiaa kohden määritetään ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiassa lasketaan. On hyödyllistä määrittää, missä kehitysvaiheessa eloonjääneet toukat ovat. Tähän tarkoitukseen voidaan mitata kunkin toukan pääkapselin leveys.

Mittaukset

Testiaineen pitoisuus

38. Vähintään sedimentin päällä olevan veden, huokosveden ja sedimentin näytteet analysoidaan testin alussa (mieluiten yksi tunti testiaineen lisäämisen jälkeen) ja lopussa suurimmassa pitoisuudessa ja matalammassa pitoisuudessa. Testiaineen pitoisuudesta saadaan tietoa testiaineen käyttäytymisestä ja jakautumisesta vesi-sedimenttisysteemissä. Sedimenttinäytteen ottaminen testin alussa voi vaikuttaa testijärjestelmään (esim. testitoukkia poistuu), joten testin alussa ja testin aikana tehtäviä analyyttisiä määrityksiä varten on tarvittaessa käytettävä ylimääräisiä testiastioita (katso kohta 39). Sedimentin mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen, jos testiaineen jakautuminen veden ja sedimentin välille on määritetty selkeästi vesi/sedimentti-tutkimuksessa vastaavissa olosuhteissa (esim. sedimentin ja veden suhde, sovelluksen tyyppi, orgaanisen hiilen pitoisuus sedimentissä).

39. Jos välimittauksia tehdään (esim päivänä 7) ja analyysiin tarvitaan suuria näytteitä, joiden ottaminen testiastioista vaikuttaisi testijärjestelmään, analyyttisiin määrityksiin käytetään ylimääräisistä testiastioista otettuja näytteitä. Näitä astioita käsitellään samalla tavoin kuin testiastioita (mukaan lukien testiorganismien lisääminen), mutta niitä ei käytetä biologiseen havainnointiin.

40. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esim. 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää. Joskus pitoisuuksien analysointi huokosvedestä ei ole mahdollista, koska näyte on liian pieni.

▼M4

Fysikaalis-kemialliset parametrit

41. Testiastioiden pH ja lämpötila sekä testiveteen liuennut happi on mitattava asiaankuuluvasti (katso kohta 10). Kovuus ja ammoniakki on mitattava kontrolliastioissa ja yhdessä testiastiassa suurimmalla pitoisuudella testin alussa ja lopussa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

42. Tämän testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutus uros- ja naarassääskien kehittymisnopeuteen ja täysin kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärään. 10 päivän testissä määritetään vaikutukset toukkien eloonjääntiin ja painoon. Jos eri sukupuolten herkkyydessä ei ilmene tilastollisesti merkitsevää eroa, urosten ja naaraiden tulokset voidaan yhdistää tilastollisia analyysejä varten. Sukupuolten väliset herkkyyserot voidaan määrittää tilastotieteellisesti esimerkiksi χ^2-r × 2 -taulukkotestillä. Toukkien eloonjäänti ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden määritetään 10 päivän kuluttua, jos tarpeen.

43. Vaikutuspitoisuudet ilmaistaan pitoisuuksina sedimentin päällä olevassa vedessä, ja vaikutuspitoisuudet lasketaan mieluiten testin alussa mitattujen sedimenttipitoisuuksien perusteella (katso kohta 38).

44. EC_{50}:n tai minkä tahansa muun EC_x:n piste-estimaattia laskettaessa astiakohtaisia tilastotietoja voidaan käyttää aitoina toistoina. Laskettaessa minkä tahansa EC_x-arvon luottamusväliä astioiden välinen vaihtelu on otettava huomioon tai vaihtoehtoisesti osoitettava vaihtelu niin pieneksi, että se voidaan jättää huomiotta. Jos malliin sovelletaan pienimmän neliösumman menetelmää, astiakohtaisiin tilastotietoihin on sovellettava muunnosta, jotta varianssin homogeenisuus paranee. EC_x-arvot on kuitenkin laskettava sen jälkeen, kun vaste on muunnettu takaisin alkuperäisarvoon.

45. Kun NOEC/LOEC on tarkoitus määrittää tilastollisen hypoteesin testillä, astioiden välinen vaihtelu on huomioitava esimerkiksi hierarkkisella ANOVAlla. Robustimpia testejä (21) voidaan käyttää soveltuvissa tilanteissa, kun tavalliset ANOVAn oletukset eivät täyty.

Kuoriutumisaste

46. Kuoriutumisasteet ovat dikotomisia tietoja, ja ne voidaan analysoida Cochran-Armitagen testillä, jota sovelletaan alaspäin askeltavasti, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa, ja näitä tietoja pidetään tämän odotuksen mukaisina. Jos näin ei ole, voidaan käyttää Fisherin tarkkaa testiä tai Mantel-Haenszelin testiä, jossa p-arvot on korjattu Bonferroni-Holmin menetelmällä. Jos on näyttöä siitä, että saman pitoisuuden toistojen välinen varianssi on suurempi kuin binomijakauma antaa edellyttää (ylihajonta), voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä tai Fisherin tarkkaa testiä (21).

47. Kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa (n_e) määritetään, ja summa jaetaan lisättyjen sääskien määrällä (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

jossa:

ER = kuoriutumisaste

n_e = kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa

n_a = astiaan lisättyjen toukkien määrä

48. Kun näytekoko on suuri ja ylihajontaa esiintyy, paras vaihtoehto on pitää kuoriutumisastetta jatkuvana vasteena ja käyttää esimerkiksi Williamsin testiä, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa ja yhdenmukainen kuoriutumisastetietojen kanssa. Dunnettin testi soveltuu, kun monotonisuutta ei esiinny. Näytekoko määritetään tässä suureksi, jos sekä kuoriutuneiden että kuoriutumattomien toukkien määrä on toistossa (astiassa) yli viisi.

49. Jos halutaan soveltaa ANOVA-menetelmiä, ER-arvot on ensin muunnettava arcsin-neliöjuuri-muunnoksella tai Freeman-Tukeyn muunnoksella, jotta saadaan likimääräinen normaalijakauma ja varianssi tasoittuu. Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferroni) tai Mantel-Haenszelin testiä voidaan soveltaa, kun käytetään absoluuttisia frekvenssejä. Arcsin-neliöjuuri-muunnosta sovelletaan ottamalla kuoriutumisasteen neliöjuuren käänteinen sini ($sini^{-1}$).

50. Kuoriutumisasteissa EC_x-arvot lasketaan käyttämällä regressioanalyysiä (tai esim. probit- (22), logit- tai Weibull-mallia tai soveltuvaa kaupallista ohjelmistoa). Jos regressioanalyysi epäonnistuu (esim. osittaisia vasteita on alle kaksi), käytetään muita parametrittomia menetelmiä, kuten liukuvaa keskiarvoa tai yksinkertaista interpolaatiota.

Kehittymisnopeus

51. Keskimääräinen kehittymisaika edustaa keskimääräistä ajanjaksoa toukkien lisäämisestä (testipäivä 0) kokeellisen sääskikohortin kuoriutumiseen. (Aidon kehittymisajan laskennassa on huomioitava toukkien ikä lisäyshetkellä.) Kehittymisnopeus on kehittymisajan käänteisluku (yksikkö: 1/vrk) ja edustaa päivässä tapahtuvaa toukkien kehittymistä. Kehittymisnopeuden käyttö on suositeltavaa näiden sedimentin toksisuuskokeiden arvioinnissa, sillä sen varianssi on pienempi ja se on homogeenisempi ja lähempänä normaalijakaumaa kuin kehittymisaika. Siksi tehokkaita parametritestimenetelmiä käytetään mieluummin kehittymisnopeuden kuin kehittymisajan kanssa. Kun kehittymisnopeus on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida regressioanalyysillä (esim. (23) ja (24)).

52. Seuraavissa tilastollisissa testeissä oletetaan, että tarkastuspäivänä x havaittu sääskimäärä kuoriutuu päivän x ja päivän x-l välissä (l = tarkastusvälin pituus, yleensä 1 päivä). Keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa (x) lasketaan seuraavasti:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

jossa:

$\overline{x}$: keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa

i: tarkastusvälin indeksi

m: tarkastusvälien enimmäismäärä

▼**M4**

f_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien määrä

n_e: testin lopussa kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärä ($=\sum f_i$)

x_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien kehittymisnopeus

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

jossa:

day_i: tarkastuspäivä (päivää lisäyksen jälkeen)

l_i: tarkastusvälin i pituus (päivissä, yleensä 1 päivä)

Testiraportti

53. Testiraportin on sisällettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (vesiliukoisuus, höyrynpaine, jakaantumiskerroin maa-aineksessa (tai sedimentissä, jos saatavissa), stabiilisuus vedessä jne.)

— kemialliset tunnistetiedot (yleisnimi, kemiallinen nimi, rakennekaava, CAS-numero jne.) sekä puhtaus ja testiaineen kvantifioinnissa käytetty analyysimenetelmä.

Testilajit:

— käytetyt koe-eläimet: lajit, tieteellinen nimi, eliöiden lähde ja kasvatusolosuhteet

— tiedot munamassojen ja toukkien käsittelystä

— koe-eläinten ikä testiastioihin lisättäessä.

Testiolosuhteet:

— käytetty sedimentti, eli luonnollinen vai synteettinen sedimentti

— luonnollisen sedimentin osalta sedimentin näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan lukien, jos mahdollista, kontaminaatiohistoria, ominaisuudet: pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, C/N-suhde ja rakeisuus (tarvittaessa)

— synteettisen sedimentin valmistus: ainesosat ja niiden ominaisuudet (orgaanisen hiilen pitoisuus, pH, kosteus jne. testin alussa)

— testiveden valmistus (jos käytetään synteettistä vettä) ja ominaisuudet (happipitoisuus, pH, johtavuus, kovuus jne. testin alussa)

— sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys

— sedimentin päällä olevan veden ja huokosveden tilavuus, märän sedimentin paino huokosveden kanssa ja ilman huokosvettä

— testiastiat (materiaali ja koko)

— kantaliuosten valmistusmenetelmät ja testipitoisuudet

▼M4

— testiaineen lisääminen: käytetyt testipitoisuudet, toistojen määrä ja mahdollisen liuottimen käyttö

— inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valojakso ja valon voimakkuus, ilmastus (taajuus ja voimakkuus)

— yksityiskohtaiset tiedot syöttämisestä, kuten ravinnon tyyppi, valmistus, määrä ja syöttöaikataulu.

Tulokset:

— kaikki nimelliset testipitoisuudet, mitatut testipitoisuudet ja tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritettiin testiaineen pitoisuus testiastiassa

— testiastioissa olevan veden laatu, eli pH, lämpötila, liuennut happi, kovuus ja ammoniakki

— mahdollinen haihtuneen testiveden korvaus

— kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien määrä astiassa päivää kohden

— kuoriutumattomien toukkien määrä astiassa

— toukkien keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden, kehitysasteittain jos tarpeen

— kuoriutumisprosentti rinnakkaisnäytteessä ja testipitoisuudessa (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— täysin kuoriutuneiden sääskien keskimääräinen kehittymisnopeus rinnakkaisnäytteessä ja testissä (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— toksisten tutkittavien ominaisuuksien estimaatit, kuten EC_x (ja siihen liittyvät luottamusvälit), NOEC ja/tai LOEC, ja niiden määrittämiseen käytetyt tilastolliset menetelmät

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850,1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Tämän liitteen luku C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼**M4**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Synteettinen sedimentti on luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

Yläpuolinen vesi on testiastiassa sedimentin päällä oleva vesi.

Huokosvesi on sedimenttirakeiden välissä olevaa vettä.

Vesi, johon on lisätty testiaine.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 2

***Chironomus riparius* -lajin kasvatussuosituksia**

1. *Chironomus*-toukkia voi kasvattaa kiteytysmaljoissa tai suurissa astioissa. Astian pohjalle levitetään noin 5–10 mm:n paksuinen kerros hienoa kvartsihiekkaa. Myös piimaa (esim. Merck, tuotenro 8117) on osoitettu soveltuvaksi substraatiksi (ohuempi, enintään muutaman millimetrin paksuinen kerros riittää). Sen jälkeen lisätään monta senttiä soveltuvaa vettä. Jos haihtumista tapahtuu, kuivuminen on estettävä lisäämällä vettä tarvittaessa. Vesi voidaan vaihtaa tarvittaessa. Varovainen ilmastus on tarpeen. Toukkien kasvatusastioita on säilytettävä soveltuvassa häkissä, jotta kuoriutuvat aikuiset eivät pääse pakenemaan. Häkin on oltava tarpeeksi tilava, jotta kuoriutuneet aikuiset mahtuvat parveilemaan. Muutoin parittelua ei välttämättä tapahdu (vähimmäiskoko on n. 30 × 30 × 30 cm).

2. Häkkejä säilytetään huoneenlämmössä tai huoneessa, jonka lämpötila on vakioitu (20 ± 2 °C). Valoisa jakso on 16 tuntia (voimakkuus n. 1 000 luksia), pimeys 8 tuntia. On ilmoitettu, että lisääntyminen voi estyä, jos ilman suhteellinen kosteus on alle 60 prosenttia.

Laimennusvesi

3. Mitä tahansa soveltuvaa luonnollista tai synteettistä vettä voidaan käyttää. Kaivovesi, talousvesi, josta on poistettu kloori, ja keinotekoinen neste (esim. Elendtin ”M4”- tai ”M7”-liuos, ks. jäljempänä) ovat yleisesti käytettyjä. Vesi on ilmastettava ennen käyttöä. Kasvatusvesi voidaan tarvittaessa uusia kaatamalla tai lappamalla käytetty vesi kasvatusastioista varoen tuhoamasta toukkaputkia.

Toukkien ruokinta

4. *Chironomus*-toukat ruokitaan kalojen hiutaleruoalla (TetraMin®, TetraPhyll® tai muu vastaava kaupallinen kalanruoka), jota annetaan noin 250 mg astiaa kohden päivässä. Ruoka voidaan antaa kuivana jauheena tai suspensiona vedessä: 1,0 g hiutaleruokaa lisätään 20 ml:aan laimennusvettä ja seos sekoitetaan homogeeniseksi. Tätä valmistetta voi antaa noin 5 ml astiaa kohden päivässä (ravista ennen käyttöä). Vanhoille toukille voi antaa enemmän ruokaa.

5. Ruokkimista säädellään vedenlaadun mukaan. Jos kasvatusalusta muuttuu sameaksi, ravinnon määrää on vähennettävä. Ravinnon määrän lisäämistä on seurattava tarkasti. Jos ravintoa on liian vähän, toukat siirtyvät kohti vesipatsasta, ja jos ravintoa on liian paljon, mikrobien toiminta voi lisääntyä ja happipitoisuudet laskea. Kumpikin vaihtoehto voi laskea kasvunopeutta.

6. Vähän viherlevän (esim. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) soluja voidaan lisätä, kun uusia kasvatusastioita perustetaan.

Kuoriutuneiden aikuisten ruokinta

7. Eräät kokeen suorittajat ovat ehdottaneet, että kylläisessä sakkaroosiliuoksessa liotettu vanutuppo saattaa riittää kuoriutuneiden aikuisten ravinnoksi.

▼M4

Kuoriutuminen

8. Kun lämpötila on 20 ± 2 °C, toukkien kasvatusastioista alkaa kuoriutua aikuisia noin 13–15 päivän kuluttua. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

Munamassat

9. Kun kasvatushäkissä on aikuisia, kaikista toukkien kasvatusastioista on tarkistettava kolme kertaa viikossa, onko niissä hyytelömäisiä munamassoja. Jos munamassoja on, ne on poistettava varovasti. Ne siirretään pieneen astiaan, jossa on pieni määrä kasvatusvettä. Munamassoja voi käyttää uuden viljelyastian perustamiseen (esim. 2–4 munamassaa astiaa kohden) tai toksisuustesteihin.

10. Munatoukkien pitäisi kuoriutua 2–3 päivän kuluttua.

Uusien viljelyastioiden perustaminen

11. Kun viljelmät on perustettu, uuden toukkaviljelyastian voi aloittaa testivaatimusten mukaan kerran viikossa tai harvemmin. Vanhat astiat poistetaan, kun aikuiset sääsket ovat kuoriutuneet. Näin saadaan säännöllisesti aikuisia mahdollisimman vähäisellä vaivalla.

Testiliuosten ”M4” ja ”M7” valmistus

12. Elendt (1990) kuvasi ”M4”-liuoksen. ”M7”-liuos valmistetaan samoin kuin ”M4” lukuun ottamatta taulukossa 1 merkittyjä aineita, joiden pitoisuus on neljä kertaa pienempi ”M7”-liuoksessa kuin ”M4”-liuoksessa. ”M7”-liuosta koskeva julkaisu on valmisteilla (Elendt, henkilökohtainen viesti). Testiliuosta ei valmisteta Elendtin ja Biasin mukaan (1990), sillä kantaliuosten valmistusta varten annetut $NaSiO_3$-, 5 H_2O-, $NaNO_3$-, KH_2PO_4- ja K_2HPO_4-pitoisuudet eivät ole riittäviä.

”M7”-liuoksen valmistus

13. Jokainen kantaliuos (I) valmistetaan erikseen, ja näistä kantaliuoksista (I) valmistetaan yhdistetty kantaliuos (II) (katso taulukko 1). ”M7”-liuos valmistetaan täyttämällä 50 millilitraa yhdistettyä kantaliuosta (II) ja taulukossa 2 annetut määrät jokaista makroravinteiden kantaliuosta 1 litraksi deionisoitua vettä. Vitamiinien kantaliuos valmistetaan lisäämällä deionisoituun veteen kolmea vitamiinia taulukon 3 mukaisesti, ja 0,1 millilitraa yhdistettyä vitamiinien kantaliuosta lisätään lopulliseen ”M7”-liuokseen vähän ennen käyttöä. (Vitamiinien kantaliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä.) Liuos ilmastetaan ja stabiloidaan.

Taulukko 1

Hivenaineiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

Kantaliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn kantaliuoksen (II) valmistus: Sekoita seuraavat määrät (ml) kantaliuoksia (I) ja täytä 1 litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Kantaliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn kantaliuoksen (II) valmistus: Sekoita seuraavat määrät (ml) kantaliuoksia (I) ja täytä 1 litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Nämä aineet ovat erilaiset M4- ja M7-liuoksissa, kuten edellä kerrottiin.
(2) Nämä liuokset valmistetaan erikseen. Sitten ne kaadetaan yhteen ja käsitellään välittömästi autoklaavissa.

Taulukko 2

Makroravinteiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn makroravinteiden kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Taulukko 3

Vitamiinien kantaliuos M4- ja M7-liuosta varten

Kaikki kolme vitamiiniliuosta yhdistetään yhdeksi vitamiinien kantaliuokseksi.

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn vitamiinien kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinihydrokloridi	750	0,1	0,075
Syaanikobalamiini (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiini	7,5	0,1	0,00075

KIRJALLISUUSVIITTEET

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

Lisäys 3

SYNTEETTISEN SEDIMENTIN VALMISTUS

Sedimentin koostumus

Synteettisen sedimentin koostumuksen on oltava seuraavanlainen:

Ainesosa	Ominaisuudet	Prosenttiosuus sedimentin kuivapainosta
Turve	Rahkasuoturvetta, pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä, hienoksi jauhettuna (hiukkaskoko ≤ 1 mm) ja ilmakuivattuna	4–5
Kvartsihiekka	Raekoko: > 50 prosenttia hiukkasista on oltava kokoa 50–200 μm	75–76
Kaoliniittisavi	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %	20
Orgaaninen hiili	Säädetään lisäämällä turvetta ja hiekkaa	2 (± 0,5)
Kalsiumkarbonaatti	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas	0,05–0,1
Vesi	Johtavuus ≤ 10 μS/cm	30–50

Valmistelut

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi. Tarvittava määrä turvejauhetta suspendoidaan deionisoituun veteen käyttämällä tehokasta homogenisointilaitetta. Suspension pH-arvoksi säädetään 5,5 ± 0,5 $CaCO_3$:lla. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen. Arvon pitäisi olla 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen turvesuspensioon sekoitetaan muut ainesosat (hiekka ja kaoliniittisavi) ja deionisoitu vesi, jotta saadaan homogeenistä sedimenttiä, jonka vesipitoisuus on 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta. Lopullisen seoksen pH mitataan vielä kerran, ja se säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla alueelle 6,5–7,5. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. On suositeltavaa, että synteettistä sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat.

Säilytys

Synteettisen sedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa huoneenlämmössä. Valmistettua (märkää) sedimenttiä ei saa säilyttää ennen käyttöä tässä testissä. Se on käytettävä heti valmistuksen lopussa olevan 7 päivän sopeutusajan jälkeen.

KIRJALLISUUSVIITTEET:

Tämän liitteen luku C.8. Myrkyllisyystutkimus madoilla.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

▼**M4**

Lisäys 4

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

Aine	Pitoisuudet
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 μg/l
Kovuus $CaCO_3$:na	< 400 mg/l (*)
Jäännöskloori	< 10 mg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

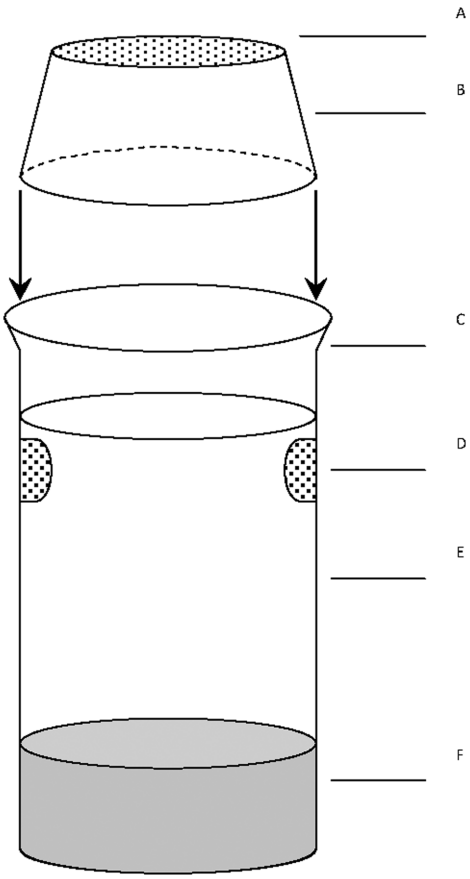
(*) Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä).

▼**M4**

Lisäys 5

Chironomid-toukkien kuoriutumisen tarkkailuohjeet

Dekantterilaseihin asetetaan pyydykset kuoriutuneita toukkia varten. Näitä pyydyksiä tarvitaan päivästä 20 lähtien testin loppuun saakka. Alla on esimerkki käytetystä pyydyksestä:



A: polyamidiverkko

B: ylösalaisin käännetyt muovikupit

C: reunukseton altistusdekantterilasi

D: verkkoaukot vedenvaihtoa varten

E: vettä

F: sedimentti

▼M4

C.29 BIOHAJOAVUUS – CO_2 SULJETUISSA ASTIOISSA (HEADSPACE-TESTI)

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 310 (2006). Testimenetelmällä voidaan arvioida kemikaalien biohajoavuutta, ja sen avulla saadaan vastaavaa tietoa kuin tämän liitteen luvussa C.4, A–F kuvatuilla kuudella testimenetelmällä. Niinpä kemikaalia, jonka tulokset ovat positiiviset tässä testimenetelmässä, voidaan pitää helposti biohajoavana, eli se hajoaa nopeasti ympäristössä.

2. Vakiintunut hiilidioksidimenetelmä (CO_2) (1), joka perustuu Sturmin alkuperäiseen testiin (2) ja jolla arvioidaan orgaanisten kemikaalien biohajoavuutta mittaamalla mikrobien toiminnan tuloksena syntyvää hiilidioksidia, on tavallisesti ensimmäinen vaihtoehto, kun testataan heikosti liukenevia ja voimakkaasti adsorboivia kemikaaleja. Sitä käytetään myös liukeneville (mutta ei haihtuville) kemikaaleille, sillä monet pitävät hiilidioksidin muodostumista ainoana pitävänä todisteena mikrobien toiminnasta. Liuenneen orgaanisen hiilen poistumista voivat aiheuttaa fyysis-kemialliset prosessit – adsorptio, haihtuminen, saostuminen, hydrolyysi – sekä mikrobien toiminta, ja monet ei-biologiset reaktiot kuluttavat happea. Orgaaniset kemikaalit harvoin tuottavat hiilidioksidia abioottisesti. Alkuperäisessä ja muunnetussa Sturmin testissä (1)(2) CO_2:ta poistetaan nestefaasista absorboiviin astioihin kuplittamalla (sparging) eli hiilidioksidia poistetaan kuplittamalla ilmaa nestefaasin läpi. Larsonin versiossa (3)(4) CO_2 siirretään puolestaan reaktioastiasta absorboiviin materiaaleihin kuljettamalla hiilidioksidia sisältämätöntä ilmaa kaasutilan (headspace) läpi ja lisäksi ravistamalla testiastiaa jatkuvasti. Ainoastaan Larsonin muunnoksessa reaktioastiaa ravistetaan. Liukenemattomia aineita sekoitetaan standardissa ISO 9439 (5) ja alkuperäisessä yhdysvaltalaisessa versiossa (6), joissa kummassakin käytetään kuplitusta (sparging) kaasutilan vaihdon sijaan. Toisessa virallisessa US EPA -menetelmässä (7), joka perustuu Gledhillin menetelmään (8), ravistettu reaktioastia suljetaan ilmatiiviisti, ja tuotettu CO_2 sidotaan astiassa olevaan emäkseen suoraan kaasufaasista, kuten klassisissa Warburgin/Barcroftin respirometripulloissa.

3. On kuitenkin osoitettu, että epäorgaaninen hiili (IC) kerääntyy standardin Sturmin muunnetun testin aikana väliaineessa useisiin kemikaaleihin (9). Epäorgaanisen hiilen pitoisuus oli jopa 8 mg/l aniliinin (20 mg C/l) hajoamisen aikana. Siten CO_2:n sitominen emäkseen ei antanut oikeaa kuvaa siitä, miten paljon CO_2:ta tuotettiin mikrobiologisesti hajoamisen aikana. Tästä syystä vaatimus, että > 60 prosenttia $ThCO_2$:sta on kerättävä 10-päiväisen jakson aikana (10 %:n hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää), jotta testikemikaali voidaan luokitella helposti biohajoavaksi, ei täyty joidenkin sellaisten kemikaalien osalta, jotka määriteltäisiin helposti biohajoaviksi DOC-poistuman perusteella.

4. Kun hajoamisprosentti on alempi kuin odotettu arvo, epäorgaanista hiiltä saattaa kerääntyä testiliuokseen. Silloin hajoavuutta voidaan arvioida muilla nopean biohajoavuuden testeillä.

▼M4

5. Sturmin menetelmän muiden heikkouksien (vaivalloinen, aikaa vievä, alttiimpi koevirheille eikä sovellu haihtuville kemikaaleille) vuoksi oli aiemmin alettu etsiä Gledhillin tekniikan lisäksi toista suljetun astian menetelmää läpivirtausjärjestelmien (10)(11) sijaan. Boatman *et al* (12) tarkastelivat aiempia menetelmiä ja ottivat käyttöön suljetun kaasutilan järjestelmän, jossa CO_2 vapautetaan kaasutilaan inkubaation jälkeen happamoittamalla väliaine. CO_2 mitattiin kaasukromatografisella (GC)/IC-analyysillä automaattisesti kaasutilasta otetuista näytteistä, mutta nestefaasin liuennutta epäorgaanista hiiltä (DIC) ei huomioitu. Lisäksi käytetyt astiat olivat hyvin pieniä (20 ml) ja niissä oli vain 10 ml:aa väliainetta, mikä aiheutti ongelmia esimerkiksi, kun liukenemattomia testikemikaaleja lisättiin hyvin pieniä määriä. Lisäksi siirrostetussa liuoksessa ei välttämättä ole ollenkaan tai tarpeeksi mikro-organismeja, jotka pystyvät hajottamaan testikemikaaleja.

6. Nämä vaikeudet voitettiin Struijsin ja Stoltenkampin (13) sekä Birchin ja Fletcherin (14) itsenäisissä tutkimuksissa. Jälkimmäiset saivat inspiraation anaerobisen biohajoavuuden testissä käytetystä laitteesta (15). Ensimmäisessä menetelmässä (13) CO_2 mitataan kaasutilassa happamoittamisen ja tasapainottumisen jälkeen, kun taas jälkimmäisessä (14) DIC mitataan sekä kaasuettä nestefaasissa, ilman käsittelyä. Yli 90 prosenttia muodostuneesta IC:stä oli nestefaasissa. Kummassakin menetelmässä on etunsa Sturmin testiin verrattuna, sillä niissä testijärjestelmä on pienempi ja helpompi käsitellä, haihtuvia kemikaaleja voidaan testata ja mahdollinen viive tuotetun CO_2:n mittauksessa vältetään.

7. Nämä kaksi lähestymistapaa yhdistettiin ISO Headspace CO_2 -standardissa (16), joka rengastestattiin (17). Nykyinen testimenetelmä perustuu juuri tähän standardiin. Noita kahta lähestymistapaa on käytetty myös US EPA -menetelmässä (18). CO_2:n mittaamiseen suositellaan kahta menetelmää eli CO_2 kaasutilassa happamoittamisen jälkeen (13) ja IC nestefaasissa emäksisen aineen lisäämisen jälkeen. Jälkimmäisen menetelmän otti käyttöön Peterson, kun tälle Headspace-menetelmälle, joka oli muunnettu luontaisen biohajoavuuden mittausta varten, tehtiin laboratorioiden välinen CONCAWE-tutkimus (19). Tähän testimenetelmään on sisällytetty muutokset, jotka tehtiin vuonna 1992 (20) tämän liitteen lukuun C.4 Biohajoavuuden määritys, joten olosuhteet (väliaine, kesto jne.) ovat muuten samat kuin muutetussa Sturmin testissä (20). Birch ja Fletcher (14) ovat osoittaneet, että tällä Headspace-testillä saatiin samoilla kemikaaleilla hyvin samankaltaisia tuloksia kuin tarkistettujen testimenetelmien OECD:n yhteistutkimuksissa (21).

TESTIN PERIAATE

8. Testikemikaali (tavallisesti 20 mg C/l), joka on ainoa hiilen ja energia lähde, inkuboidaan puskuri-mineraalisuolaliuoksessa, johon on siirrostettu sekapopulaatiosta otettuja mikroeliöitä. Testi tehdään suljetuissa pulloissa, joissa on ylätilassa ilmaa, joka toimii happivarastona aerobista biohajoamista varten. Testikemikaalin lopullisen aerobisen biohajoamisen tuottama CO_2 määritetään mittaamalla, kuinka paljon enemmän epäorgaanista hiiltä muodostuu testipulloissa verrattuna pulloihin, joissa on vain siirrostettua liuosta. Biohajoaminen ilmaistaan ThIC-arvona, joka perustuu alun perin lisätyn testikemikaalin (orgaanisena hiilenä) määrään.

9. DOC-poistuma ja/tai testikemikaalin primäärisen biohajoamisen laajuus voidaan myös mitata (20).

▼M4

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

10. Testikemikaalin orgaanisen hiilen pitoisuuden (% w/w) on oltava tiedossa kemiallisen rakenteen tai mittauksen perusteella, jotta hajoamisprosentti voidaan laskea. Jos testikemikaalit ovat haihtuvia, mitattu tai laskettu Henryn lain vakio auttaa määrittämään soveltuvan kaasutilan ja nestetilavuuden suhteen. Testikemikaalin toksisuus mikro-organismeille on hyvä olla tiedossa, kun valitaan soveltuvaa testipitoisuutta ja tulkitaan heikosta biohajoavuudesta kertovia tuloksia. Inhibitiota on suositeltavaa kontrolloida, ellei olet tiedossa, että testikemikaali ei estä mikrobien toimintaa (katso kohta 24).

MENETELMÄN SOVELTUVUUS

11. Tätä testiä voidaan soveltaa vesiliukoisiin ja liukenemattomiin testikemikaaleihin, mutta testikemikaalin hyvä dispersio on varmistettava. Kun käytetään suositeltua kaasutilan ja nestetilavuuden välistä suhdetta 1:2, voidaan testata haihtuvia kemikaaleja, joiden Henryn lain vakio on enintään 50 Pa m^3 mol^{-1}, sillä testikemikaalin osuus kaasutilassa ei ole yli 1 prosenttia (13). Kaasutilan tilavuuden on oltava pienempi, kun testataan tätä haihtuvampia kemikaaleja, mutta niiden biologinen hyötyosuus voi asettaa rajoituksia varsinkin, jos ne liukenevat heikosti veteen. Käyttäjien on kuitenkin valittava kaasutilan ja nestetilavuuden suhde sekä testikemikaalin pitoisuus siten, että happi riittää täydelliseen aerobiseen biohajoamiseen (esimerkiksi suuren substraattipitoisuuden ja pienen kaasutilavuuden käyttöä on vältettävä). Ohjeet ovat kirjallisuusviitteissä (13)(23).

VERTAILUKEMIKAALIT

12. Testimenetelmän toimivuus tarkistetaan testaamalla rinnakkaisesti vertailukemikaalia, jonka biohajoavuus on tiedossa. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää aniliinia, natriumbentsoaattia tai etyleeniglykolia, kun testataan vesiliukoisia kemikaaleja, ja 1-oktanolia, kun testataan heikosti liukenevia kemikaaleja (13). Näiden kemikaalien biohajoavuuden täytyy olla > 60 % ThIC 14 päivän kuluessa.

TOISTETTAVUUS

13. Menetelmän ISO-yhteistutkimuksessa (17) saatiin seuraavat tulokset, kun käytettiin suositeltuja olosuhteita ja hiilen pitoisuus testikemikaalissa oli 20 mg C/l.

Testikemikaali	Biohajoavuuden keskiarvo (28 vrk)	Variaatiokerroin (%)	Laboratorioiden määrä
Aniliini	90	16	17
1-oktanoli	85	12	14

Testin sisäinen variaatio (toistettavuus) oli pieni, kun käytettiin aniliinia. Variaatiokerroin oli enintään 5 prosenttia lähes kaikissa testiajoissa. Kahdessa tapauksessa toistettavuus oli huonompi, ja suurempi variaatio johtui luultavasti suuresta IC:n tuotannosta nollakokeissa (kontrolleissa). Toistettavuus oli huonompi käytettäessä 1-oktanolia, mutta se oli silti alle 10 prosenttia 79 prosentissa testiajoista. Suurempi testin sisäinen variaatio saattoi johtua annosteluvirheistä, sillä suljettuihin testipulloihin injektoitiin pieni määrä (3–4 µl) 1-oktanolia. Variaatiokertoimet ovat suuremmat, kun käytetään testikemikaalin pienempiä pitoisuuksia ja varsinkin kun pitoisuus on alle 10 mg C/l. Tämä voidaan estää osittain pienentämällä epäorgaanisen hiilen kokonaismäärää (TIC) inokulaatissa.

▼M4

14. Kun EU:n yhteistutkimuksessa (24) viittä pinta-aktiivista ainetta lisättiin pitoisuudella 10 mg C/l, saatiin seuraavat tulokset.

Testikemikaali	Biohajoavuuden keskiarvo (28 vrk)	Variaatiokerroin (%)	Laboratorioiden määrä
Tetraprolyleeni Bentseenisulfonaatti	17	45	10
Di-iso-oktyylisulfo-sukkinaatti (anioninen)	72	22	9
Heksadekyyli-trimetyyli (*) Ammoniumkloridi (kationinen)	75	13	10
Iso-nonyylifenoli-(etoksylaatti)$_9$ (ioniton)	41	32	10
Kokamidopropyyli Dimetyylihydroksi Sulfobetaiini (amfoteerinen)	60	23	11

(*) Toksisuutta neutraloitiin lisäämällä SiO_2:ta.

Tulokset osoittavat, että variaatio oli yleensä suurempi, jos pinta-aktiivinen aine oli huonosti hajoava. Testin sisäinen variaatio oli alle 15 prosenttia yli 90 prosentissa tapauksista. Suurin variaatio oli 30–40 prosenttia.

HUOMAUTUS: Useimmat pinta-aktiiviset aineet eivät ole yksimolekyylisiä lajeja, vaan isomeerien, homologien jne. sekoituksia. Ne hajoavat erilaisten latenssiaikojen jälkeen ja erilaisilla kineettisillä nopeuksilla, jolloin käyrät ovat loivia ja epäselviä eikä 60 prosentin kynnysarvoa välttämättä saavuteta 10-päiväisessä jaksossa, vaikka yksin testattuna jokainen yksittäinen molekyylilaji saavuttaisi > 60 prosentin kynnysarvon 10 päivässä. Sama voi ilmetä myös muissa monimutkaisissa seoksissa.

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

15. Tavallinen laboratoriolaite ja lisäksi:

a) lasisia seerumipulloja, suljettu butyylikumitulpalla ja alumiinisulkimilla. Suositeltu koko on 125 ml, jolloin kokonaistilavuus on noin 160 ml (tässä tapauksessa jokaisen pullon tilavuuden pitää olla tunnetusti 160 ± 1 ml). Pienempää astiaa voidaan käyttää, kun tulokset täyttävät kohdissa 66 ja 67 kuvatut ehdot

b) hiilianalysaattori tai muu väline (esim. kaasukromatografi) epäorgaanisen hiilen mittaamista varten

▼M4

c) ruiskuja, joiden tarkkuus on suuri, kaasu- ja nestenäytteitä varten

d) orbital-ravistelija ympäristössä, jonka lämpötila on vakioitu

e) hiilidioksiditonta ilmaa – tätä voidaan valmistaa kuljettamalla ilmaa sooda-kalkkirakeiden läpi tai käyttämällä kaasuseosta, jossa on 80 prosenttia N_2:ta ja 20 prosenttia 0_2:ta (valinnainen) (katso kohta 28)

f) kalvosuodatin, huokoskoko 0,20–0,45 μm (valinnainen)

g) orgaanisen hiilen analysaattori (valinnainen).

Reagenssit

16. Käytä pelkästään analyysilaatuisia reagensseja.

Vesi

17. Tislattu tai deionisoitu vesi, jonka orgaaninen kokonaishiilipitoisuus on ≤ 1 mg/l. Tämä edustaa alkuperäistä, testikemikaalin suositellun annoksen antamaa ≤ 5 prosentin orgaanista hiilipitoisuutta.

Mineraalisuolakasvatusalustan kantaliuokset

18. Kantaliuokset ja mineraalisuolakasvatusalusta vastaavat standardia ISO 14593 (16) ja luvun C.4 biohajoavuuden testejä (20). Suuremman ammoniumkloridipitoisuuden (2,0 g/l eikä 0,5 g/l) käyttö on tarpeen vain poikkeustapauksissa, kuten jos testikemikaalin pitoisuus on > 40 mg C/l. Kantaliuokset säilytetään jääkaapissa ja hävitetään kuuden kuukauden kuluttua tai aiemmin, jos on merkkejä saostumisesta tai mikrobikasvustosta. Valmista seuraavat kantaliuokset:

a) kaliumdivetyfosfaatti (KH_2PO_4) 8,50 g

dikaliumvetyfosfaatti (K_2HPO_4) 21,75 g

dinatriumvetyfosfaattidihydraatti ($Na_2HPO_42H_2O$) 33,40 g

ammoniumkloridi (NH_4Cl) 0,50 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi. Liuoksen pH-arvon on oltava 7,4 (± 0,2). Jos näin ei ole, valmista uusi liuos.

b) kalsiumkloridididihydraatti ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi.

c) magnesiumsulfaattiheptahydraatti ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi.

d) rauta(III)kloridiheksahydraatti ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Liuota veteen, täytä 1 litraksi ja lisää yksi tippa väkevöityä HCl-liuosta.

Epäorgaanisen liuoksen valmistus

19. Sekoita 10 ml liuosta (a) ja noin 800 ml vettä (kohta 17), lisää sitten 1 ml liuoksia (b), (c) ja (d) ja täytä sitten vedellä 1 litraksi (kohta 17).

Muut reagenssit

20. Väkevöity ortofosforihappo (H_3PO_4) (massa tilavuutta kohti > 85 %).

▼M4

Natriumhydroksidiliuos 7M

21. Liuota 280 g natriumhydroksidia (NaOH) 1 litraan vettä (kohta 17). Määritä tämän liuoksen DIC-pitoisuus ja huomioi arvo testitulosta laskettaessa (katso kohdat 55 ja 61), etenkin kohdassa 66 (b) annetun laatuvaatimuksen kannalta. Valmista uusi liuos, jos DIC-pitoisuus on liian suuri.

Testikemikaali

22. Valmista kantaliuos riittävän vesiliukoisesta testikemikaalista veteen (kohta 17) tai testiviljelyaineeseen (kohta 19). On suositeltavaa, että pitoisuus on satakertainen verrattuna lopulliseen testissä käytettävään pitoisuuteen. Kantaliuoksen pH-arvon säätäminen voi olla tarpeen. Kantaliuos lisätään epäorgaaniseen liuokseen, jotta lopullinen orgaanisen hiilen pitoisuus on 2–40 mg C/l, mieluiten 20 mg C/l. Jos käytetty pitoisuus on tätä alempi, tarkkuus saattaa kärsiä. Liukenevat ja liukenemattomat nestemäiset kemikaalit voi lisätä astioihin suoraan ruiskulla, jonka tarkkuus on suuri. Heikosti liukenevat ja liukenemattomat testikemikaalit saattavat vaatia erityiskäsittelyä (25). Vaihtoehdot ovat seuraavat:

a) tunnettujen punnittujen määrien lisääminen suoraan

b) ultraäänidispersio ennen lisäystä

c) dispersio käyttämällä tarvittavia emulgointiaineita, jotta voidaan määrittää ennen lisäystä, onko niillä inhiboivia tai stimuloivia vaikutuksia mikrobien toimintaan

d) nestemäisten testikemikaalien adsorptio tai liuotus soveltuvaan haihtuvaan liuottimeen, inerttiin aineeseen tai kantaja-aineeseen (esim. lasikuitusuodattimeen), minkä jälkeen mahdollinen liuotin haihdutetaan ja tunnetut määrät lisätään suoraan

e) testikemikaaliliuoksen tunnetun tilavuuden lisääminen helposti haihtuvaan liuottimeen tyhjässä testiastiassa, minkä jälkeen liuotin haihdutetaan.

Aineiden ja liuottimien, joita käytetään kohdissa (c), (d) ja (e), mahdolliset stimuloivat tai inhiboivat vaikutukset mikrobien toimintaan on testattava (katso kohta 42(b)).

Vertailukemikaali

23. Valmista (liukenevan) vertailukemikaalin kantaliuos veteen (kohta 17). On suositeltavaa, että pitoisuus on satakertainen verrattuna lopulliseen testissä käytettävään pitoisuuteen (20 mg C/l).

Inhibition tarkistus

24. Testikemikaalit eivät usein hajoa merkittävästi biohajoavuuden määrittämiseen käytetyissä olosuhteissa. Yksi mahdollinen syy on, että testikemikaali estää inokulaattia pitoisuudella, jossa sitä lisätään testiin. Testiin voidaan sisällyttää inhibition tarkistus, mikä helpottaa inhibition tunnistamista (takautuvasti) mahdolliseksi syyksi tai osatekijäksi. Inhibition tarkistuksella voidaan myös sulkea pois tällaiset vaikutukset ja osoittaa, että nollahajoaminen tai heikko hajoaminen liittyy ainoastaan siihen, että testikemikaalit eivät ole alttiita mikrobihyökkäykselle testiolosuhteissa. Testikemikaalin toksisuudesta (aerobisille) mikro-organismeille saadaan tietoa valmistamalla testiviljelyaine, joka sisältää testikemikaalia ja vertailukemikaalia (kohta 19), kumpaakin lisättävinä pitoisuuksina (katso kohdat 22 ja 23).

▼M4

Siirrosaine

25. Siirrosaine voi olla peräisin monesta eri lähteestä: aktiivilietteestä, jätevedestä (ilman kloorikäsittelyä), pintavedestä, maa-aineksesta tai näiden seoksesta (20). Lähteen biohajoamistoiminta on tarkistettava vertailukemikaalin avulla. Oli lähde mikä tahansa, aiemmin testikemikaalille altistuneita mikro-organismeja ei saa käyttää, jos menetelmää käytetään nopean biohajoavuuden testaamiseen.

Varoitus: aktiiviliete, jätevesi ja poistovesi sisältävät patogeenisiä organismeja, ja niitä on käsiteltävä varoen.

26. Kokemuksen perusteella siirrosaineen optimaalinen tilavuus täyttää seuraavat ehdot:

— mahdollistaa riittävän biohajoamistoiminnan

— hajottaa vertailukemikaalia määrätyssä määrin (katso kohta 66)

— antaa 10^2–10^5 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä millilitraa kohden lopullisessa seoksessa

— antaa normaalisti suspendoituneen kiintoaineen pitoisuudeksi 4 mg/l lopullisessa seoksessa, kun käytetään aktiivilietettä. Pitoisuus voi olla enintään 30 mg/l, mutta se voi nostaa CO_2-tuotantoa merkittävästi nollakokeissa (26)

— antaa alle 10 prosenttia testikemikaalin antamasta alkuperäisestä orgaanisen hiilen pitoisuudesta

— 1–10 ml siirrosainetta 1 testiliuoslitraa kohden.

Aktiiviliete

27. Aktiiviliete kerätään tuoreena pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän vedenpuhdistamon tai laboratoriolaitoksen ilmastussäiliöstä. Tarvittaessa karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla (esim. 1 mm^2:n verkkoseulalla), minkä jälkeen liete pidetään aerobisena.

28. Lietteen annetaan asettua tai se sentrifugoidaan (esimerkiksi 1 100 × g 10 minuutin ajan) karkeiden hiukkasten poiston jälkeen. Pintaliete hylätään. Lietettä voidaan pestä epäorgaanisessa liuoksessa. Väkevöity liete suspendoidaan epäorgaaniseen liuokseen (lopullinen pitoisuus 3–5 g kuiva-ainetta/1) ja säilötään ilmastettuna.

29. Lietteen on tultava tehokkaasti toimivasta, perinteisen tekniikan mukaisesta laitoksesta. Jos liete on otettava suurkuormituslaitoksesta tai jos epäillään lietteen sisältävän inhibiittoreita, liete on pestävä. Liete sekoitetaan hyvin, minkä jälkeen uudelleen suspendoitunut liete saa asettua tai se sentrifugoidaan. Pintaliete hylätään ja pesty liete suspendoidaan uudelleen uuteen epäorgaaniseen liuokseen. Menettelyä toistetaan, kunnes voidaan katsoa, ettei lietteessä ole enää ylimääräistä substraattia tai inhibiittoria.

30. Kun liete on täysin uudelleensuspendoitunut (tai jos lietettä käytetään sellaisenaan), näyte kerätään välittömästi ennen käyttöä. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus määritetään näytteestä.

31. Yksi vaihtoehto on lisäksi aktiivilietteen homogenointi (3–5 g suspendoitunutta kuiva-ainetta/l). Lietettä käsitellään Waring-sekoittimessa keskinopeudella 2 minuutin ajan. Sekoitetun lietteen annetaan asettua 30 minuutin ajan (tai tarvittaessa kauemmin), ja neste dekantoidaan. Näin saatua nestettä käytetään siirrosaineena (pitoisuus: 10 ml/l epäorgaanista liuosta).

▼M4

32. CO_2:n muodostumista nollakokeessa voidaan vähentää vielä lisää ilmastamalla lietettä yön yli ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia. Käytä 4 mg/l aktiivilietteen kiintoainesta siirrosaineen pitoisuutena tässä testissä (13).

Sekundaarinen jätevesi

33. Siirrosaineen lähteenä voidaan käyttää myös pääosin kotitalousjätevesiä puhdistavasta käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta saatavaa sekundaarista jätevettä. Säilytä näyte aerobisissa olosuhteissa ja käytä se näytteenottopäivänä tai esikäsittele tarvittaessa. Karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla jätevesi karkealla suodattimella ja pH-arvo mitataan.

34. IC-pitoisuutta lasketaan ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia (kohta 15 e), tunnin ajan samalla, kun pH pidetään arvossa 6,5 ortofosforihapolla (kohta 20). pH-arvo palautetaan alkuperäiseen arvoon natriumhydroksidilla (kohta 21), ja näytteen annetaan asettua noin tunnin, minkä jälkeen siirrosaineeksi otetaan soveltuva tilavuus pintalietettä. Hiilidioksidittoman ilman käyttö laskee siirrosaineen IC-pitoisuutta. Kun suodatetun, ilmakäsitellyn jäteveden suositeltua enimmäistilavuutta (100 ml) litraa kohden käytettiin siirrosaineena, kontrolliastioiden IC-pitoisuus oli 0,4–1,3 mg/l (14), mikä vastaa 2–6,5 prosenttia, kun hiilen pitoisuus testikemikaalissa on 20 mg C/l, ja 4–13 prosenttia, kun hiilen pitoisuus on 10 mg C/l.

Pintavedet

35. Soveltuvasta pintavedestä otetaan näyte. Näytettä säilytetään aerobisissa olosuhteissa, ja se on käytettävä näytteenottopäivänä. Näyte väkevöidään tarvittaessa suodattamalla tai sentrifugoimalla. Jokaisessa testiastiassa käytettävän siirrosaineen tilavuuden on täytettävä kohdassa 26 annetut ehdot.

Maa-ainekset

36. Soveltuvasta maa-aineksesta otetaan näyte enintään 20 cm maan pinnan alta. Kivet, kasvien jäännökset ja selkärangattomat poistetaan maanäytteestä, minkä jälkeen se seulotaan 2 mm:n verkkosiivilällä (jos näyte on niin märkä, ettei sitä voi seuloa heti, anna sen kuivua osittain). Näytettä säilytetään aerobisissa olosuhteissa, ja se on käytettävä näytteenottopäivänä. (Jos näytettä kuljetetaan löysästi suljetussa mustassa polyeteenikassissa, sitä voidaan säilyttää kassissa kuukauden 2–4 °C:n lämpötilassa).

Siirrosaineen esikäsittely

37. Esikäsittelyn avulla siirrosaine voidaan sopeuttaa testiolosuhteisiin, mutta ei testattavaan kemikaaliin. Esikäsittely voi vähentää CO_2:n muodostumista nollakokeessa. Esikäsittelyssä testiaineen pitoisuudeksi laimennetaan 30 mg/l, ja sen jälkeen aktiivilietettä ilmastetaan kostella ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia, 5–7 päivän ajan testilämpötilassa.

TESTIMENETELMÄ

Pullojen määrä

38. Testiin tarvittava pullojen määrä (kohta 15 a) määräytyy analyysitiheyden ja testin keston mukaan.

39. On suositeltavaa, että kolme pulloa analysoidaan rinnakkain riittävien aikavälien jälkeen, jotta 10-päiväinen jakso voidaan tunnistaa. Vähintään viisi testipulloa (kohta 15 a) sarjoista (a), (b) ja (c) (ks. kohta 42) analysoidaan testin lopussa, jotta biohajoavuuden keskiarvolle voidaan laskea 95 prosentin luottamusvälit.

▼M4

Siirrostettu liuos

40. Siirrosainetta käytetään pitoisuudella 4 mg litrassa aktiivilietteen kiintoainetta. Valmista riittävä määrä siirrostettua liuosta juuri ennen käyttöä lisäämällä esimerkiksi 2 ml sopivasti käsiteltyä aktiivilietettä (kohdat 27–32) pitoisuudella 2 000 mg/l yhteen litraan mineraalisuolakasvatusalustaa (kohta 19). Jos käytetään sekundaarista jätevettä, lisää enintään 100 ml jätevettä (kohta 33) 900 ml:aan mineraalisuolakasvatusalustaa (kohta 19) ja laimenna siirrosaineella 1 litraksi.

Pullojen valmistelu

41. Siirrostetun liuoksen alikvootteja annostellaan rinnakkaispulloihin siten, että kaasutilan (headspace) ja nesteen suhde on 1:2 (jos pullon tilavuus on esim. 160 ml, lisää 107 ml). Muitakin suhteita voi käyttää, mutta katso kohdassa 11 annettu varoitus. Kun käytetään muuntyyppistä siirrosainetta, on varmistettava huolellisesti, että siirrostettu liuos on sekoitettu hyvin, jotta se jakautuu tasaisesti testipulloihin.

42. Pullosarjoihin (kohta 15 a) kuuluvat seuraavat osat:

a) testiastiat (F_T), jotka sisältävät testikemikaalia

b) kontrollipullot (F_B), jotka sisältävät vain testiviljelyainetta ja siirrosainetta. Lisäksi testikemikaalin siirtämiseen testiastioihin voidaan tarvita kemikaaleja, liuottimia, aineita ja lasikuitusuodattimia

c) astiat (F_C), jotka sisältävät vertailukemikaalia testimenettelyn tarkistamista varten

d) tarvittaessa astiat (F_I), joilla tarkistetaan testikemikaalin inhibitiovaikutus ja joissa on sekä testikemikaalia että vertailukemikaalia samoissa pitoisuuksissa (kohta 24) kuin pulloissa F_T ja F_C

e) astiat (F_S), joilla tarkistetaan mahdollinen abioottinen hajoaminen (a) plus 50 mg/l $HgCl_2$:ta tai muulla tavoin steriloituna (esim. autoklaavissa).

43. Vesiliukoiset testikemikaalit ja vertailukemikaalit lisätään vesipitoisina kantaliuoksina (kohdat 22, 23 ja 24), kunnes pitoisuus on 10–20 mg C/l.

44. Liukenemattomat testikemikaalit ja liukenemattomat vertailukemikaalit lisätään pulloihin eri tavoin (katso kohdat 22 a–e) testikemikaalin luonteen mukaan. Ne lisätään joko ennen siirrostettua liuosta tai sen jälkeen testikemikaalin käsittelyn mukaan. Jos käytössä on jokin kohdissa 22 a–e annetuista menetelmistä, kontrollipulloja F_B (kohta 42 b) käsitellään muuten samoin, mutta ilman testikemikaalia tai vertailukemikaalia.

45. Haihtuvat testikemikaalit injektoidaan suljettuihin pulloihin (kohta 47) mikroruiskulla. Annos lasketaan injektoidun tilavuuden ja testikemikaalin tiheyden mukaan.

46. Astioihin lisätään tarvittaessa vettä, jotta nestetilavuus on sama jokaisessa astiassa. On varmistettava, että kaasutilan ja nesteen suhde (yleensä 1:2) ja testikemikaalin pitoisuus ovat sellaisia, että kaasutilassa on riittävästi happea täydellistä biohajoamista varten.

▼M4

47. Sen jälkeen kaikki pullot suljetaan esimerkiksi butyylikumikalvolla tai alumiinikorkilla. Haihtuvat testikemikaalit lisätään tässä vaiheessa (kohta 45). Jos testiliuoksen DOC-pitoisuuden laskua halutaan seurata ja alkuperäisen IC-pitoisuuden nollahetken analyysejä (steriilit kontrollit, kohta 42 e) tai muita analyysejä halutaan tehdä, ota sopivan kokoinen näyte testiastiasta. Hävitä testiastia ja sen sisältö tämän jälkeen.

48. Suljetut pullot asetetaan pyörivään ravistimeen (kohta 15 d), jonka ravistusnopeus riittää pitämään pullojen sisällön hyvin sekoitettuna ja suspendoituneena (esim. 150–200 rpm), ja niitä inkuboidaan pimeässä lämpötilassa 20 °C ± 1 °C.

Näytteenotto

49. Näytteenottotapa määräytyy lag-vaiheen ja testikemikaalin biohajoamisen kineettisen nopeuden mukaan. Pullot analysoidaan näytteenottopäivänä, joita pidetään vähintään kerran viikossa tai useammin (esim. kahdesti viikossa), jos täydellinen hajoamiskäyrä on tarpeen. Tarvittava määrä rinnakkaispulloja (F_T, F_B ja F_C sekä F_I ja F_S, jos käytössä) otetaan ravistajasta (ks. kohta 42). Testin normaali kesto on 28 päivää. Jos biohajoamiskäyrä osoittaa, että tasannevaihe on saavutettu ennen päivää 28, testi voidaan lopettaa jo aikaisemmin. Ota näytteet viidestä pullosta, jotka on varattu testipäivän 28 analysointia varten, ja laske tulosten perusteella luottamusvälit tai biohajoamisprosentin variaatiokerroin. Inhibition ja abioottisen hajoamisen tarkistusta varten varatuista pulloista ei tarvitse ottaa näytteitä yhtä usein kuin muista pulloista. Riittää, kun näyte otetaan päivänä 1 ja 28.

Epäorgaanisen hiilen (IC) analyysi

50. Pullojen CO_2-tuotanto määritetään mittaamalla epäorgaanisen hiilen (IC) pitoisuuden nousu inkubaation aikana. Testin aikana tuotetun IC:n mittaamiseen on kaksi suositeltavaa menetelmää, jotka on kuvattu alla. Koska näiden menetelmien tulokset voivat poiketa hieman toisistaan, käytä vain yhtä menetelmää yhdessä testiajossa.

51. Menetelmä (a) on suositeltava, jos siirrosaineessa on todennäköisesti jäänteitä lasisuodatinpaperista ja/tai liukenemattomasta testikemikaalista. Analyysi voidaan tehdä kaasukromatografilla, jos hiilianalysaattoria ei ole käytettävissä. On tärkeää, että pullot ovat testilämpötilassa tai sitä lähellä, kun kaasutilan kaasua analysoidaan. Menetelmä (b) voi olla helpompi, jos laboratoriossa käytetään hiilianalysaattoreita IC:n mittaamiseen. On tärkeää, että natriumhydroksidiliuos (kohta 21), jolla CO_2 muunnetaan karbonaatiksi, on vasta valmistettu tai sen IC-pitoisuus on tunnettu, jotta se voidaan huomioida testituloksia laskettaessa (ks. kohta 66 b.)

Menetelmä (a): happamoittaminen pH-arvoon < 3

52. Ennen jokaista analyysierää IC-analysaattori kalibroidaan käyttämällä soveltuvaa IC-standardia (esim. 1 % w/w CO_2:ta N_2:ssa). Väkevöity ortofosforihappo (kohta 20) injektoidaan jokaisen pullon kalvon läpi, jotta siirrosaineen pH-arvoksi tulee < 3 (esim. 1 ml, kun testiviljelyaineen tilavuus on 107 ml). Pullot asetetaan takaisin ravistajaan. Kun pulloja on ravistettu yksi tunti testilämpötilassa, ne otetaan pois ravistajasta, kaasualikvootit (esim. 1 ml) otetaan jokaisen pullon kaasutilasta ja injektoidaan IC-analysaattoriin. Mitatut IC-pitoisuudet rekisteröidään (mg C/l).

▼**M4**

53. Tämä menetelmä perustuu siihen, että kun pH-arvo on happamoitettu alle kolmeen ja tasapainotus tehty lämpötilassa 20 °C, CO_2:n jakautumisen testipullojen neste- ja kaasufaasin välillä tasapainovakio on 1,0 pitoisuutena mitattuna (13). Tämä on osoitettava vähintään kerran seuraavalla tavalla:

Valmistele pullot, joissa IC:tä on 5 ja 10 mg/l, käyttämällä vedetöntä natriumkarbonaattia (Na_2CO_3) ja vettä, joka ei sisällä CO_2:ta ja joka valmistetaan happamoittamalla veden pH-arvoksi 6,5 ortofosrofihapolla (kohta 20). Kuplita yön yli ilmalla, joka ei sisällä CO_2:ta, ja nosta pH neutraaliksi emäksellä. Varmista, että kaasutilan ja nesteen tilavuuksien suhde on sama kuin testeissä (esim. 1:2). Happamoita ja tasapainota kohdan 52 ohjeiden mukaisesti ja mittaa IC-pitoisuudet sekä kaasutilasta että nestefaasista. Tarkista, että nämä kaksi pitoisuutta ovat samat koevirheen sisällä. Jos näin ei ole, työvaiheet on käytävä läpi. IC:n jakautumista neste- ja kaasufaasin välille ei tarvitse tarkistaa aina, kun testi tehdään. Se voidaan tehdä kalibroinnin yhteydessä.

54. Jos DOC-poistumaa halutaan mitata (vain vesiliukoiset testikemikaalit), näytteet otetaan erillisten (happamoittamattomien) pullojen nestefaasista, kalvosuodatetaan ja injektoidaan DOC-analysaattoriin. Näitä pulloja voidaan tarvittaessa käyttää muihin analyyseihin, primaarisen biohajoamisen mittaamista varten.

Menetelmä (b): CO_2:n muuntaminen karbonaatiksi

55. IC-analysaattori kalibroidaan ennen jokaista analyysierää soveltuvalla standardilla, kuten natriumbikarbonaattiluoksella ($NaHCO_3$) vedessä, joka ei sisällä CO_2:ta (ks. kohta 53), IC-pitoisuus 0–20 mg/l. Natriumhydroksidiliuos (7M, kohta 21) (esim. 1 ml, kun testiviljelyaineen tilavuus on 107 ml) injektoidaan kalvon läpi jokaiseen pulloon, josta näyte otetaan, ja pulloja ravistetaan 1 tunti testilämpötilassa. Käytä samaa NaOH-liuosta kaikissa tiettynä päivänä analysoitavissa pulloissa. Samaa liuosta ei kuitenkaan tarvitse käyttää testin kaikilla näytteenottokerroilla. Jos IC:n absoluuttiset nolla-arvot tarvitaan kaikilla näytteenottokerroilla, NaOH-liuoksen IC on määritettävä aina ennen käyttöä. Pullot otetaan pois ravistajasta, ja niiden annetaan tasaantua. Jokaisen pullon nestefaasista otetaan sopiva tilavuus (esim. 50–1 000 µl) ruiskulla. Nämä näytteet injektoidaan IC-analysaattoriin, ja IC-pitoisuudet merkitään ylös. On varmistettava, että käytettävä analysaattori soveltuu tällä menetelmällä tuotettujen emäksisten näytteiden käsittelyyn.

56. Tämä menetelmä perustuu siihen, että kun emästä on lisätty ja pulloja ravistettu, IC-pitoisuus kaasutilassa on hyvin pieni. Tämä on tarkistettava vähintään kerran käyttämällä IC-standardeja, lisäämällä emästä, tasapainottamalla ja mittaamalla IC-pitoisuus sekä kaasutilassa että nestefaasissa (ks. kohta 53). Pitoisuuden pitäisi olla lähes nolla kaasutilassa. Tätä virtuaalisesti täydellisen CO_2-absorption tarkistusta ei tarvitse tehdä aina, kun testi tehdään.

57. Jos DOC-poistumaa halutaan mitata (vain vesiliukoiset testikemikaalit), näytteet otetaan erillisten pullojen (joihin ei ole lisätty emästä) nestefaasista, kalvosuodatetaan ja injektoidaan DOC-analysaattoriin. Näitä pulloja voidaan tarvittaessa käyttää muihin analyyseihin, primaarisen biohajoamisen mittaamista varten.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten laskeminen

58. Jos oletetaan, että testikemikaali on mineralisoitunut sataprosenttisesti CO_2:ksi, kontrollien tuotannon ylittävä ThIC on yhtä kuin jokaiseen testipulloon testin alussa lisätty TOC, eli:

$$ThIC = TOC.$$

Yhdessä pullossa olevan epäorgaanisen hiilen kokonaismassa (TIC) (mg) on:

$$TIC = (\text{mg C nesteessä} + \text{mg C kaasutilassa}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Yhtälö [1]}$$

jossa:

V_L = nesteen tilavuus pullossa (litraa)

CL = IC-pitoisuus nesteessä (mg/l hiilenä)

VH = kaasutilan tilavuus (litraa)

CH = IC-pitoisuus kaasutilassa (mg/l hiilenä).

TIC-laskelmat tässä testissä IC:n mittaamiseen käytettyä kahta analyysimenetelmää varten on kuvattu kohdissa 60 ja 61. Biohajoamisprosentti (*% D*) saadaan seuraavasti:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Yhtälö [2]}$$

jossa:

TICt = mg TIC testipullossa aikana t

TICb = keskimääräinen mg TIC vertailupulloissa aikana t

TOC = alun perin testiastiaan lisätty mg TOC.

Biohajoamisprosentti % D lasketaan testipulloille (F_T), vertailupulloille (F_C) ja mahdollisille inhibition seurantaan tarkoitetuille pulloille (F_I) kuhunkin näytteenottoaikaan mennessä tuotetun TIC:n määrästä.

59. Jos TIC-pitoisuus on noussut merkittävästi steriileissä kontrolleissa (F_S) testijakson aikana, voidaan päätellä, että testikemikaali on hajonnut abioottisesti. Tämä on huomioitava laskettaessa D:tä kaavalla [2].

Happamoittaminen pH-arvoon < 3

60. Koska happamoittaminen pH-arvoon < 3 ja tasapainottaminen tasapainottaa TIC-pitoisuuden neste- ja kaasufaasissa, ainoastaan kaasufaasin IC-pitoisuus mitataan. Kaava [1]$TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, jossa V_B = seerumipullon tilavuus.

CO_2:n muuntaminen karbonaatiksi

61. Tässä menetelmässä laskelmat tehdään kuten kaavassa [1], mutta kaasufaasin hyvin pieni IC-määrä jätetään huomioimatta, eli$V_H \times C_H = 0$, ja$TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Tulosten ilmaiseminen

62. Biohajoamiskäyrä saadaan esittämällä biohajoamisprosentti D suhteessa inkubaatioaikaan ja lag-vaihe, biohajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja tasannevaihe eli vaihe, jolloin maksimaalinen hajoaminen on saavutettu ja biohajoamiskäyrä on loiventunut, ilmaistaan, jos mahdollista. Jos rinnakkaistestipulloista F_T saadaan verrattavissa olevat tulokset (ero < 20 %), piirretään keskiarvokäyrä (ks. lisäys 2, kuva 1). Jos näin ei ole, jokaista astiaa varten piirretään oma käyrä. Tasannevaiheen biohajoamisprosentin keskiarvo määritetään tai korkein arvo arvioidaan (esim. kun käyrä laskee tasannevaiheessa), mutta jälkimmäisessä tapauksessa on tärkeää varmistaa, että arvo ei ole poikkeava havainto. Kirjaa tämä biohajoamisen enimmäistaso testiraporttiin testikemikaalin biohajoamisasteena. Jos testiastioiden määrä ei riittänyt tasannevaiheen osoittamiseen, keskiarvo lasketaan testin viimeisenä päivänä mitatuista tiedoista. Tämä viimeinen arvo, viiden rinnakkaisnäytteen keskiarvo, osoittaa biohajoamisprosentin määritystarkkuuden. Kirjaa ylös myös 10-päiväisen jakson lopussa saatu arvo.

63. Vertailukemikaalin F_C käyrä laaditaan samalla tavalla, ja samoin abioottisen eliminaation tarkistuksen F_S ja inhibition tarkistuksen F_I, jos ne olivat käytössä.

64. TIC:n määrät kontrollipulloissa (F_B) kirjataan samoin kuin pulloissa F_S (abioottinen tarkistus), jos sellaiset olivat käytössä.

65. Laske F_I-astioiden D ainoastaan seoksen vertailukomponentin odotetun teoreettisen IC-saannin perusteella. Jos päivänä 28 $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, voidaan olettaa, että testikemikaali esti siirrosaineen toimintaa, mikä voi selittää testiolosuhteissa saadut matalat D_{FT}-arvot. Tässä tapauksessa testi voidaan toistaa käyttämällä alempaa testipitoisuutta ja mielellään vähentämällä DIC:n määrää siirrosaineessa ja kontrollipulloissa muodostuvaa TIC:tä, sillä muutoin alempi pitoisuus heikentää menetelmän tarkkuutta. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää toista siirrosainetta. Jos TIC-pitoisuus nousee merkittävästi (> 10 %) F_S-pullossa (abioottinen), abioottisia hajoamisprosesseja on voinut tapahtua.

Tulosten luotettavuus

▼M7

66. Testi on luotettava, jos

a) keskimääräinen hajoamisprosentti astioissa F_C, jotka sisältävät vertailukemikaalia, on > 60 prosenttia 14. inkubaatiopäivään mennessä ja

b) TIC:n keskimääräinen määrä kontrollipulloissa F_B testin lopussa on > 3mg C/l.

Jos nämä ehdot eivät täyty, testi on toistettava käyttämällä toisesta lähteestä saatua siirrosainetta ja/tai testivaiheet on käytävä läpi. Jos esimerkiksi ongelmana on suuri IC-tuotanto kontrollipulloissa, on noudatettava kohdissa 27–32 annettuja ohjeita.

(1) Hajoamisprosentti astioissa F_C, jotka sisältävät vertailuainetta
(2) Hajoamisprosentti astioissa F_I

▼M4

67. Jos testikemikaali ei saavuteta arvoa 60 % ThIC ja se on osoitettu ei-inhiboivaksi (kohta 65), testi voidaan toistaa käyttämällä suurempaa siirrosaineen pitoisuutta (enintään 30 mg/l aktiivilietettä ja 100 ml jätevettä/l) tai eri lähteestä saatua siirrosainetta, varsinkin jos hajoaminen oli suuruudeltaan 20–60 prosenttia.

Tulosten tulkinta

68. Jos biohajoaminen on > 60 % ThIC 10-päiväisen jakson aikana tässä testissä, testikemikaali on helposti biohajoava aerobisissa oloissa.

69. Jos kynnysarvoa 60 % ThIC ei saavuteta, määritä aineen pH-arvo pulloissa, joita ei ole muutettu happamaksi tai emäksiseksi. Jos arvo on alle 6,5, nitrifikaatiota on voinut tapahtua. Toista tässä tapauksessa testi käyttämällä puskuriliuosta, jonka pitoisuus on suurempi.

Testiraportti

70. Laadi taulukko, johon merkitään jokaisen testipullon (F_T), vertailupullon (F_C) ja mahdollisten inhibition seurantaan tarkoitettujen pullojen (F_I) % D-arvo jokaisena näytteenottopäivänä. Jos rinnakkaispulloista saadaan verrattavissa olevat tulokset, piirrä käyrä arvon % D keskiarvosta ajan suhteen. Kirjaa ylös TIC:n määrä kontrollipulloissa (F_B) ja steriileissä kontrollipulloissa (F_S) DOC ja/tai muut määreet sekä niiden poistumaprosentit.

71. Määritä % D -arvon keskiarvo tasannevaiheessa tai käytä korkeinta arvoa, jos biohajoamiskäyrä laskee tasannevaiheessa, ja anna tämä arvo testikemikaalin biohajoamisasteena. Jälkimmäisessä tapauksessa on tärkeää varmistaa, että korkein arvo ei ole poikkeava arvo.

72. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava ja merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— testikemikaalin puhtaus (epäpuhtaudet),

Testiolosuhteet:

— viittaus tähän testimenetelmään

— käytetyn testijärjestelmän kuvaus (astian tilavuus, kaasutilan ja nesteen suhde, sekoitustapa jne.)

— testikemikaalin ja vertailukemikaalin lisääminen testijärjestelmään: käytetty testipitoisuus ja jokaiseen pulloon annostellun hiilen määrä, mahdollinen liuottimien käyttö

— käytetyn siirrosaineen tiedot, mahdollinen esikäsittely

— inkubointilämpötila

— IC-analyysin periaatteen validointi

— käytetyn IC-analysaattorin (ja muiden käytettyjen analyysimenetelmien) pääominaisuudet

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— raakatiedot ja lasketut biohajoavuusarvot taulukkomuodossa

▼M4

— testi- ja vertailukemikaalin hajoamisprosenttikäyrä suhteessa aikaan, lag-vaihe, hajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja kulmakerroin

— poistumaprosentti tasannevaiheessa, testin lopussa ja 10-päiväisen jakson jälkeen

— syyt mahdolliseen testitulosten hylkäämiseen

— muut käytetyn menetelmän kannalta merkitykselliset tiedot

— tulosten pohdinta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys – hiilidioksidin muodostumiskoe (Menetelmä C.4-C).

2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159–167.

3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153–1161.

4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195–1210.

5) ISO 9439 (1990; tarkistettu 1999). Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922–929.

9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181–185.

11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51–53.

12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204–211.

14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507–524.

15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527–1550.

▼**M4**

16) ISO 14593, (1999) Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO_2 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813–1822.

18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An ”inherent” biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

20) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman’s report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

22) Tämän liitteen luku C.11 Aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25) ISO 10634 (1996) Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Lisäys 1

LYHENTEET JA MÄÄRITELMÄT

IC: ”Inorganic carbon” – Epäorgaaninen hiili

$ThCO_2$: ”Theoretical carbon dioxide” (mg) – Hiilidioksidimäärä, joka lasketaan saatavan testattavan aineen tunnetusta tai mitatusta, epäorgaaniseen muotoon muunnetusta hiilestä. $ThCO_2$ ilmaistaan myös muodostuneen hiilidioksidin painona (mg) testattavan kemikaalin massaa (mg) kohti.

DOC: ”Dissolved organic carbon” – Liuoksessa oleva orgaaninen hiili tai orgaaninen hiili, joka läpäisee 0,45 μm:n suodattimen tai jää pinnalle, kun liuosta on sentrifugoitu nopeudella 40 000 ms^{-2} (n. 4 000 g) 15 minuutin ajan.

DIC: ”Dissolved inorganic carbon” – liuennut epäorgaaninen hiili

ThIC: ”Theoretical inorganic carbon” – teoreettinen epäorgaaninen hiili

TIC: ”Total inorganic carbon” – epäorgaanisen hiilen kokonaismäärä

Helposti biohajoava: Tietyt lopullisen biohajoamisen seulontatestit läpäisseiden kemikaalien yleisluokitus. Kyseiset testit ovat niin tiukkoja, että tällaisten aineiden voidaan katsoa olevan nopeasti ja täydellisesti biohajoavia vedessä ja aerobisissa olosuhteissa.

10-päiväinen jakso: 10 prosentin hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää.

Itsestään/luontaisesti biohajoava: Kemikaali, jonka tiedetään varmojen todisteiden perusteella olevan primäärisesti tai lopullisesti biohajoava kaikissa tunnetuissa biohajoavuustesteissä.

Lopullinen aerobinen biohajoaminen: Hajoamisen taso, joka saavutetaan, kun eliöt ovat hyödyntäneet testattavan aineen täysin. Tämän prosessin tuloksena syntyy hiilidioksidia, vettä, epäorgaanisia suoloja ja uutta mikrobista solukkoa (biomassaa).

Mineralisaatio: Orgaanisen yhdisteen täydellinen hajoaminen CO_2:ksi ja H_2O:ksi aerobisissa olosuhteissa sekä CH_4:ksi, CO_2:ksi ja H_2O:ksi anaerobisissa olosuhteissa.

Lag-vaihe: Aika testin alusta siihen, kun hajottavien mikro-organismien sopeutuminen ja/tai adaptaatio on tapahtunut ja testikemikaalin tai orgaanisen aineen biohajoamisaste on havaittavalla tasolla (esim. 10 prosenttia biohajoamisen teoreettisesta enimmäistasosta tai tätä alempi, riippuen mittaustekniikan tarkkuudesta).

Hajoamisvaihe: Hajoamisaika on lag-vaiheen päättymistä seuraava, 90 prosentin hajoamistason saavuttamiseen kuluva ajanjakso.

Tasannevaihe: Tasannevaihe on vaihe, jolloin maksimaalinen hajoaminen on saavutettu ja biohajoamiskäyrä on loiventunut.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

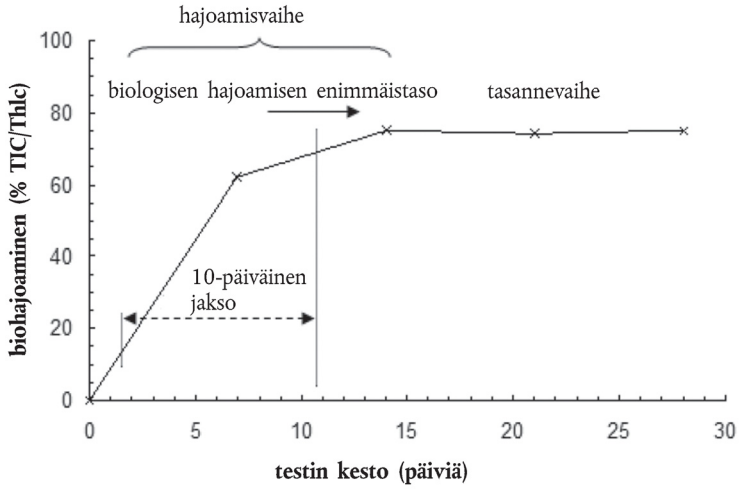
▼**M4**

Lisäys 2

Esimerkki biohajoamiskäyrästä

Kuva 1

1-oktanolin biologinen hajoaminen CO_2-kaasutilatestissä (headspace)



Sanasto

biohajoaminen

hajoamisvaihe

biologisen hajoamisen enimmäistaso

tasannevaihe:

10-päiväinen jakso

testin kesto (päiviä)

▼M4

C.30 BIOKERTYVYYS MAALLA ELÄVISSÄ HARVASUKASMADOISSA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 317 (2010). Ympäristökohtaloon liittyvistä testimenetelmistä Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa (tämän liitteen luku C.13 (49)) julkaistiin vuonna 1996 ja Biokertyvyys pohjaeläiminä lietteessä elävissä harvasukasmadoissa (53) julkaistiin vuonna 2008. Vesiympäristöstä saatujen biokertyvyystietojen ekstrapolointi maalla eläviin organismeihin, kuten lieroihin, on vaikeaa tai mahdotonta. Testikemikaalin rasvahakuisuuteen perustuvia mallilaskelmia, kuten (14) (37), käytetään tätä nykyä, kun arvioidaan kemikaalien biologista kertymistä maahan, kuten esimerkiksi EU:n teknisessä ohjeessa (19). Osa-aluekohtaisen testimenetelmän tarvetta on jo käsitelty, esim. (55). Tällainen menetelmä on erityisen tärkeä, kun arvioidaan sekundaarista myrkytystä maaravintoketjuissa (4). Useissa kansallisissa testimenetelmissä käsitellään biokertymistä muissa organismeissa kuin kaloissa. Esimerkkinä (2) ja (72). ASTM (American Society for Testing and Materials) (3) on kehittänyt menetelmän, jolla voidaan mitata saastuneen maa-aineksen biokertymistä lieroihin (*Eisenia fetida,* Savigny) ja änkyrimatoihin. Kansainvälisesti hyväksytty menetelmä biokertymisen määrittämiseen maaperässä, johon testiainetta on lisätty, edistää kemikaalien riskinarviointia maa-alueen ekosysteemeissä (25) (29).

2. Maata syövät selkärangattomat altistuvat maaperään sitoutuneille kemikaaleille. Näiden eläinten joukossa maalla elävillä harvasukasmadoilla on tärkeä rooli maaperän rakenteessa ja toiminnassa (15) (20). Nämä harvasukasmadot elävät maassa ja osittain maan pinnalla (erityisesti karikkeessa). Ne ovat usein runsaimpia lajeja biomassalla mitattuna (54). Koska nämä eläimet aiheuttavat maaperän bioturbaatiota ja ovat saaliseläimiä, niillä voi olla suuri vaikutus kemikaalien biologiseen hyötyosuuteen muille organismeille, kuten selkärangattomille (kuten petopunkeille ja kovakuoriaisille, esim. (64)) tai selkärankaisille saalistajille (kuten ketuille ja lokeille) (18) (62). Osa maalla elävien harvasukasmatojen lajeista, joita käytetään nykyään ekotoksikologisissa testeissä, on kuvattu liitteessä 5.

3. ASTM:n oppaassa ”Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus” (3) on paljon tärkeää ja hyödyllistä tietoa nykyisen maaperän biokertyvyyden testimenetelmän toiminnasta. Muita asiakirjoja, joihin tässä testimenetelmässä viitataan, ovat tämän liitteen luku C.13 Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa (49) ja OECD:n testiohje nro 315: Biokertyvyys pohjaeläiminä lietteessä elävissä harvasukasmadoissa (53). Lisäksi testimenetelmän tietolähteinä on käytetty käytännön kokemusta maaperän biokertymistutkimuksista ja julkaistua kirjallisuutta, kuten (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) ja (79).

4. Tämä testimenetelmä soveltuu lähinnä stabiileille, neutraaleille orgaanisille kemikaaleille, jota adsorboituvat maaperään. Maaperään liittyvien stabiileiden metalliorgaanisten yhdisteiden biokertyvyyden testaaminen voi olla mahdollista tällä testimenetelmällä. Menetelmää voidaan soveltaa myös metalleihin ja muihin hivenaineisiin.

ENNAKKOEDELLYTYS

5. Kemikaalin biokertyminen maalla eläviin harvasukasmatoihin on mitattu raskasmetalleilla (ks. esim. (63)) ja pysyvillä orgaanisilla kemikaaleilla, joiden log K_{ow} -arvo on välillä 3,0–6,0, esim. (40). Tällaiset testit koskevat myös seuraavia aineita:

— kemikaalit, joiden log K_{ow} -arvo on yli 6,0 (superhydrofobiset kemikaalit)

▼M4

— kemikaalit, jotka kuuluvat sellaisten orgaanisten kemikaalien luokkaan, jotka voivat tunnetusti biokertyä eläviin organismeihin, kuten pinta-aktiiviset tai hyvin adsorboituvat kemikaalit

— kemikaalit, joiden rakenteelliset ominaisuudet viittaavat mahdolliseen biokertyvyyteen, kuten tunnetusti biokertyvien kemikaalien analogit

— metallit.

6. Testikemikaalin tiedot, kuten yleisnimi, kemiallinen nimi (mieluiten IUPAC-nimi), rakennekaava, CAS-numero, puhtaus, turvallisuus ja varotoimet, asianmukaiset säilytysolosuhteet ja analyysimenetelmät, on selvitettävä ennen tutkimusta. Lisäksi seuraavien seikkojen on oltava tiedossa:

a) vesiliukoisuus

b) oktanoli/vesi-jakautumiskerroin K_{ow}

c) maa-vesijakautumiskerroin K_{oc}

d) höyrynpaine

e) hajoavuus (esim. maassa, vedessä)

f) tunnetut metaboliitit.

7. Radioaktiivisesti merkittyjä ja merkitsemättömiä testikemikaaleja voidaan käyttää. Radioaktiivisesti merkittyjen kemikaalien käyttö on kuitenkin suositeltavaa, sillä se helpottaa analyysiä. Päätös tehdään havaitsemisrajojen tai lähtökemikaalin ja metaboliittien mittaustarpeen perusteella. Jos käytetään radioaktiivisesti merkittyä testikemikaalia ja mitataan radioaktiivisten jäämien kokonaismäärää, on tärkeää, että radioaktiiviset jäämät sekä maaperässä että testiorganismeissa kuvataan lähtötestikemikaalin prosentteina ja merkitään ei-lähtökemikaaleiksi esimerkiksi tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopulla otetuissa näytteissä, jotta lähtötestikemikaalin ja maaperän metaboliittien biokertyvyystekijä (BAF) voidaan laskea (ks. kohta 50). Tässä kuvattua menetelmää on muokattava esimerkiksi käyttämällä riittävää biomassaa, kun mitataan orgaanisia testikemikaaleja tai metalleja, joita ei ole merkitty radioaktiivisesti. Kun mitataan radioaktiivisten jäämien kokonaismäärää (nestetuikelaskennalla uuton jälkeen, polttamalla tai kudosta liuottamalla), biokertyvyystekijä perustuu lähtötestikemikaaliin ja metaboliitteihin. BAF-laskennan on suositeltavaa perustua lähtötestikemikaalin pitoisuuteen organismeissa ja radioaktiivisten jäämien kokonaismäärään. BAF-arvosta lasketaan BSAF-kerroin, joka ilmaisee biokertyvyyttä maaperästä maaeliöstön lajeihin, normalisoituna matojen rasvapitoisuuden ja maaperän orgaanisen hiilen pitoisuuden (OC) suhteen, jotta eri biokertyvyystestien tuloksia voidaan vertailla.

8. Testikemikaalin toksisuuden testissä käytetyille lajeille on oltava tiedossa (esim. vaikutuspitoisuus ECx tai tappava pitoisuus LCx kertymävaiheessa). Ks. esim. (19). Testikemikaalin valitun pitoisuuden on oltava mieluiten noin 1 prosentti sen akuutista asymptoottisesta LC50-arvosta ja vähintään 10 kertaa korkeampi kuin sen havaitsemisraja maassa käytettävällä määritysmenetelmällä. On suositeltavaa käyttää subletaalien tutkittavien ominaisuuksien pitkäaikaisista tutkimuksista saatuja toksisuusarvoja, jos sellaisia on käytettävissä (51) (52). Jos tietoja ei ole saatavissa, välittömän myrkyllisyyden testistä saadaan hyödyllistä tietoa (ks. esim. (23)).

▼M4

9. Testiliuoksissa, maaperässä ja biologisessa aineksessa olevan kemikaalin kvantifioimiseksi täytyy olla käytettävissä sopiva määritysmenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan. Käytettävissä on oltava myös näytteen valmistusta ja säilyttämistä koskevat tiedot sekä materiaalin käyttöturvallisuustiedotteet. Testattavan aineen havaitsemisrajojen sekä maassa että madon kudoksissa pitäisi myös olla tiedossa. Käytettäessä 14C-merkittyä testattavaa ainetta, on tunnettava ominaisradioaktiivisuus (esim. Bq mol-1) ja epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden prosenttiosuus. Testikemikaalin ominaisradioaktiivisuuden on oltava tarpeeksi korkea, jotta analysointi helpottuu, eivätkä käytetyt testipitoisuudet saa aiheuttaa toksisia vaikutuksia.

10. Testi voidaan tehdä keinomaalla tai luonnonmaalla. Käytetyn luonnonmaan ominaisuudet, kuten maan tai sen ainesosien alkuperä, pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet) ja vedensitomiskyky (WHC), on tiedettävä ennen testin aloittamista (3) (48).

TESTIN PERIAATE

11. Testikemikaalin biokertymistä kuvaavia parametreja ovat biokertyvyystekijä (BAF), kertymävakio (k_s) ja poistumisvakio (k_e). Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

12. Testissä on kaksi vaihetta: kertymävaihe (altistusvaihe) ja poistumavaihe (altistuksen jälkeinen vaihe). Kertymävaiheen aikana matojen rinnakkaiset testiryhmät altistetaan maalle, johon on lisätty testikemikaalia. Testieläinten lisäksi on matojen kontrolliryhmä, jotka altistetaan muuten identtisille olosuhteille, mutta ilman testikemikaalia. Testiorganismien kuivapaino ja rasvapitoisuus mitataan. Mittaukset voidaan tehdä kontrolliryhmän madoille. Analyyttiset tausta-arvot saadaan analysoimalla kontrollimatojen ja maan näytteitä. Poistumavaiheessa madot siirretään maahan, joka ei sisällä testikemikaalia. Poistumavaihe tarvitaan muulloin kuin silloin, kun testikemikaalin kertymä on ollut hyvin vähäinen altistusvaiheen aikana. Poistumavaiheesta saadaan tietoa siitä, millä nopeudella testiorganismit erittävät testikemikaalia (esim. (27)). Jos tasapainotilaa ei saavuteta kertymävaiheen aikana, kineettisten parametrien – kineettisen biokertyvyystekijän BAFk, kertymis- ja poistumisvakioiden – määrityksen on hyvä perustua kertymä- ja poistumisvaiheen tulosten samanaikaiseen sovittamiseen. Testikemikaalin pitoisuutta madoissa ja matojen pinnalla seurataan testin kummassakin vaiheessa.

13. Kertymävaiheen aikana mittauksia tehdään näytteenottoajankohtina enintään 14 vuorokauden (änkyrimadot) tai 21 vuorokauden ajan (lierot), kunnes tasapainotila saavutetaan (11) (12) (67). Tasapainotila saavutetaan, kun pitoisuutta madoissa suhteessa aikaan esittävä käyrä on aika-akselin suuntainen ja kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä pitoisuusmääritystä eroavat enintään ± 20 prosenttia tilastollisen vertailun perusteella (esim. varianssianalyysi tai regressioanalyysi).

14. Poistumavaiheessa testiorganismit siirretään astioihin, joissa on samaa substraattia mutta ei testikemikaalia. Poistumavaiheen aikana mittauksia tehdään näytteenottoaikoina 14 vuorokautta (änkyrimadot) tai 21 vuorokautta (lierot), ellei analyyttinen määritys osoita aiemmin, että testikemikaalin jäämät ovat laskeneet madoissa 90 prosenttia. Testikemikaalin pitoisuus madoissa poistumavaiheen jälkeen raportoidaan eliminoitumattomina jääminä. Tasapainotilan biokertyvyystekijä (BAFss) lasketaan mieluiten sekä madoissa (Ca) ja

▼M4

maassa (Cs) olevan pitoisuuden suhteena, kun tasapainotila näyttää olevan saavutettu, että kineettisenä biokertyvyystekijänä (BAFK) maan kertymävakion (ks) ja poistumavakion (ke) 2 suhteena (määritelmät ovat lisäyksessä 1), kun oletetaan, että reaktio noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa (tietoa laskelmista on lisäyksessä 2). Jos on ilmeistä, että reaktio ei noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, on käytettävä muita malleja.

15. Kertymävakio, poistumavakio (tai vakiot, jos käytetään muita malleja), kineettinen biokertyvyystekijä (BAFK) ja mahdollisuuksien mukaan näiden muuttujien luottamusvälit lasketaan tietokonemalleista (ohjeet ovat lisäyksessä 2). Mallin soveltuvuuden voi määrittää esimerkiksi korrelaatiokertoimella tai determinaatiokertoimella (soveltuvuus on hyvä, jos kerroin on lähellä yhtä) tai khii^2-testillä. Myös keskivirheen koko tai arvioitujen parametrien luottamusväli voivat kuvata mallin soveltuvuutta.

16. Jos testikemikaali on hyvin lipofiilinen, testitulosten vaihtelua voi vähentää ilmaisemalla biokertyvyystekijät suhteessa rasvapitoisuuteen ja orgaanisen hiilen pitoisuuteen (kilossa maan orgaanista hiiltä, kilossa madon rasvamäärässä). Tämä perustuu siihen, että tietyissä kemikaalien luokissa biokertyvyyspotentiaalin ja rasvahakuisuuden välillä on selvä suhde, mikä osoitettu kalojen osalta (47). Kalan rasvapitoisuuden ja näiden kemikaalien biokertyvyyden välillä on suhde. Samanlaisia korrelaatioita on havaittu pohjaeliöissä. Tästä esimerkkinä (30) (44). Korrelaatio on osoitettu myös maalla elävien harvasukasmatojen osalta (esim. (5) (6) (7) (14)). Jos matojen kudosta on saatavilla riittävästi, eläinten rasvapitoisuus voidaan määrittää käyttämällä samaa biologista ainesta, jota käytettiin testikemikaalin pitoisuuden määrittämiseen. Rasvapitoisuus voidaan mitata myös kontrollieläimistä.

TESTIN LUOTETTAVUUS

17. Testi on luotettava, jos seuraavat ehdot täyttyvät sekä kontrolli- että käsittelyryhmässä:

— Testin lopussa yleinen kuolleisuus kertymä- ja poistumavaiheen aikana ei saa olla yli 10 prosenttia (lierot) tai 20 prosenttia (änkyrimadot) käytettyjen matojen kokonaismäärästä.

— *Eisenia fetida*- ja *Eisenia andrei* -lajien keskimääräinen painohäviö, joka mitataan kertymävaiheen ja poistumavaiheen lopussa, ei saa olla yli 20 prosenttia verrattuna jokaisen jakson alun alkuperäiseen tuorepainoon (f.w.).

MENETELMÄN KUVAUS

Testilajit

18. Biokertyvyystesteihin suositellaan useita maalla elävien harvasukasmatojen lajeja. Yleisimmin käytetyt lajit tunkioliero eli kompostiliero (*Eisenia fetida*) tai *Eisenia andrei* (Lumbricidae), änkyrimato (*Enchytraeus albidus*), *Enchytraeus crypticus* ja *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae)) on kuvattu lisäyksessä 5.

▼M4

Laite

19. Missään laitteiston osissa ei saisi käyttää materiaaleja, jotka voivat liuottaa tai adsorboida testikemikaalia, joista voi liueta muita kemikaaleja ja jotka voivat vaikuttaa haitallisesti testieläimiin. Testissä voidaan käyttää normaaleja suorakulmaisia tai lieriömäisiä astioita, jotka on valmistettu kemiallisesti inertistä materiaalista ja jotka ovat riittävän tilavia testimatojen määrään nähden. Ruostumatonta terästä, muovia tai lasia voidaan käyttää laitteissa ja välineissä, jotka ovat kosketuksissa testiliuosten kanssa. Testiastiat on peitettävä siten, että madot eivät pääse karkaamaan, mutta astiaan täytyy kuitenkin päästä riittävästi ilmaa. Jos käytettävän kemikaalin adsorptiokerroin on korkea, kuten synteettisillä pyretroideilla, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet on heitettävä pois käytön jälkeen (49). Radioaktiivisesti merkittyjä testiaineita ja haihtuvia kemikaaleja on estettävä karkaamasta. Testiastioista mahdollisesti haihtuvat jäämät on kerättävä loukuilla (esim. kaasunpesupulloilla), joissa on soveltuvaa adsorbenttia.

Maa-aines

20. Testissä käytettävän maa-aineksen on oltava laadultaan sellaista, että testiorganismit elävät ja mielellään myös lisääntyvät siinä totuttautumisvaiheen ja testin aikana ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään epänormaalia muutosta. Matojen kuuluu kaivautua maa-ainekseen.

21. Tämän liitteen luvussa C.8 (48) kuvattua keinomaata suositellaan käytettäväksi substraattina testeissä. Ohjeet keinomaan valmistamisesta biokertyvyystestejä varten ja keinomaan säilytysohjeet annetaan lisäyksessä 4. Ilmakuivattua keinomaata voidaan säilyttää huoneenlämpötilassa käyttöön asti.

22. Myös saastumattomalta paikalta kerättyä luonnonmaata voidaan käyttää testeissä ja/tai kasvatuksessa. Luonnonmaasta on annettava vähintään alkuperä (keräyspaikka), pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet), suurin mahdollinen vedensitomiskyky (WHCmax) ja vesipitoisuus prosentteina (3). Hyödyllistä tietoa saadaan, kun maa-aineksesta tai sen ainesosista analysoidaan mikrosaasteet ennen sen käyttöä. Jos käytettävä maa-aines on peräisin viljelysmaasta, sitä ei saa olla käsitelty kasvinsuojeluaineilla tai lannoitettu hoidetuista eläimistä saadulla lannalla vähintään vuoteen eikä orgaanisilla lannoitteilla vähintään kuuteen kuukauteen ennen näytteenottoa (50). Luonnonmaan käsittely ennen laboratoriossa tehtäviä ekotoksikologisia testejä harvasukasmadoilla kuvataan kohdassa (3). Jos käytetään luonnonmaata, säilytysaika laboratoriossa on pidettävä mahdollisimman lyhyenä.

Testikemikaalin lisääminen

23. Testikemikaali lisätään maa-ainekseen. Testikemikaalin fysikaaliskemialliset ominaisuudet on otettava huomioon. Jos testikemikaali on vesiliukoinen, se on liuotettava kokonaan veteen ennen sekoittamista maa-ainekseen. Heikosti veteen liukenevien testikemikaalien suositellussa lisäysmenetelmässä yksi tai monta (keino)maan ainesosaa pinnoitetaan testikemikaalilla. Esimerkiksi kvartsihiekkaa tai sen osaa voidaan liottaa liuoksessa, jossa on testikemikaalia ja soveltuvaa orgaanista liuotinta. Liuoksen annetaan hitaasti haihtua kuivaksi. Sen jälkeen testikemikaalilla pinnoitettu osio sekoitetaan märkään

▼M4

maahan. Tässä menetelmässä on se suuri etu, että maahan ei lisätä lainkaan liuotinta. Kun käytetään luonnonmaata, testikemikaali voidaan lisätä ilmakuivattuun maa-ainekseen, kuten edellä on kuvattu keinomaan osalta, tai sekoittaa märkään maahan, minkä jälkeen mahdollinen liuotusapuaine haihdutetaan. Märän maan ja liuottimien kosketusta on vältettävä, jos suinkin mahdollista. Seuraavat seikat on otettava huomioon (3):

— Jos liuottimena käytetään muuta kuin vettä, liuottimen on oltava veteen sekoittuvaa ja/tai se on voitava poistaa muulla tavoin (kuten haihduttamalla), jotta maa-ainekseen jää vain testikemikaalia.

— Jos liuotinkontrolli on käytössä, negatiivista kontrollia ei tarvita. Liuotinkontrollissa on oltava korkein pitoisuus maahan lisättyä liuotinta. Käytettävän liuottimen on oltava peräisin samasta erästä, josta kantaliuos on tehty. Liuottimen toksisuus ja haihtuvuus sekä testikemikaalin liukenevuus valittuun liuottimeen ovat tärkeimmät kriteerit soveltuvan liuotusapuaineen valinnassa.

24. Jos kemikaali liukenee heikosti veteen ja orgaanisiin liuottimiin, haluttu testipitoisuus saadaan sekoittamalla testikemikaaliin 2,0–2,5 g hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa testiastiaa kohden esimerkiksi huhmareella. Tämä kvartsihiekan ja testikemikaalin seos lisätään esikostutettuun maahan ja sekoitetaan hyvin soveltuvaan määrään deionisoitua vettä, jotta saadaan tarvittava kosteuspitoisuus. Lopullinen seos jaetaan testiastioihin. Sama toistetaan jokaista testipitoisuutta varten, ja lisäksi valmistellaan asianmukainen kontrolli, jossa on 2,0–2,5 g hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa testiastiaa kohden.

25. Testikemikaalin pitoisuus maassa on määritettävä testikemikaalin lisäämisen jälkeen. Ennen testiorganismien lisäämistä on varmistettava, että testikemikaali on jakautunut homogeenisesti maahan. Käytetty lisäysmenetelmä ja tietyn lisäysmenetelmän valintaperusteet ilmoitetaan (24).

26. Ihanteellisessa tilanteessa maa ja huokosvesifaasi ovat tasapainossa ennen organismien lisäämistä. Suositeltava tasapainotusjakso on neljä päivää lämpötilassa 20 °C. Useilla heikosti veteen liukenevilla orgaanisilla kemikaaleilla vie päiviä tai kuukausia, ennen kuin adsorboituneet ja liuotetut fraktiot ovat aidosti tasapainossa. Tutkimuksen tarkoituksen vaatiessa, esimerkiksi ympäristöolosuhteita jäljiteltäessä, maata, johon testikemikaalia on lisätty, voidaan ”kypsyttää” pidempäänkin, esimerkiksi kolme viikkoa lämpötilassa 20 °C, kun kyseessä ovat metallit (22).

Testiorganismien viljely

27. Madot pidetään mieluiten pysyvästi laboratorioviljelmässä. *Eisenia fetidan*, *Eisenia andrein* ja *Enchytraeid*-lajien laboratorioviljelyohjeet ovat lisäyksessä 5 (ks. myös (48) (51) (52)).

28. Testeissä käytettävillä madoilla ei saa olla havaittavia sairauksia, poikkeavuuksia tai loisia.

TESTIN SUORITTAMINEN

29. Testiorganismit altistetaan testikemikaalille kertymävaiheessa. Kertymävaiheen pituus on 14 vuorokautta (änkyrimadot) tai 21 vuorokautta (lierot), ellei jo aiemmin voida osoittaa, että tasapainotila on saavutettu.

▼M4

30. Poistumavaiheessa madot siirretään maahan, joka ei sisällä testikemikaalia. Ensimmäinen näyte otetaan 4–24 h poistumavaiheen alkamisen jälkeen. Esimerkkejä 21-päiväisen kertymävaiheen ja 21-päiväisen poistumavaiheen näytteenoton aikatauluista on lisäyksessä 3.

Testiorganismit

31. Monien maalla elävien änkyrimatolajien yksilöpaino on hyvin pieni (esim. *Enchytraeus albidus* -yksilöiden märkäpaino 5–10 mg ja *Enchytraeus crypticus*- ja *Enchytraeus luxuriosus* -lajien vähemmän). Jotta paino voidaan mitata ja kemiallinen analyysi tehdä, voi olla tarpeen yhdistää rinnakkaisten testiastioiden madot (eli kaikkia rinnakkaisastian matoja käytetään yhteen kudosanalyysiin). Jokaiseen rinnakkaisastiaan lisätään 20 änkyrimatoa, ja rinnakkaisnäytteitä on oltava vähintään kolme. Jos testikemikaalin analyyttinen havaitsemisraja on korkea, matoja saatetaan tarvita enemmän. Jos testilajin yksilöpaino on tätä suurempi (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei*), voidaan käyttää rinnakkaisnäyteastioita, joissa on vain yksi yksilö.

32. Testissä käytettävien lierojen on painettava suunnilleen yhtä paljon (esim. *Eisenia fetidan* ja *Eisenia andrein* yksilöpainon on oltava 250–600 mg). Änkyrimatojen (esim. *Enchytraeus albidus*) pituuden on oltava noin 1 cm. Kaikkien tietyssä testissä käytettävien matojen on oltava peräisin samasta lähteessä, ja eläinten on oltava aikuisia ja sukukypsiä (ks. lisäys 5). Koska eläimen paino ja ikä saattavat vaikuttaa BAF-arvoihin (esim. rasvapitoisuuden vaihtelun ja/tai munien vuoksi), nämä parametrit on kirjattava täsmällisesti ja huomioitava tuloksia tulkittaessa. Lisäksi BAF-arvoihin vaikuttaa myös munakoteloiden mahdollinen muniminen altistusjaksolla. On suositeltavaa, että testimatojen alaryhmä punnitaan ennen testiä, jotta keskimääräinen märkä- ja kuivapaino voidaan arvioida.

33. Maa-mato-suhteen on oltava korkea, jotta testikemikaalin pitoisuuden lasku maassa voidaan minimoida kertymisjakson aikana. *Eisenia fetida*- ja *Eisenia andrei* -lajeille maata on oltava vähintään 50 g (kuivapaino) matoa kohden, ja änkyrimadoille suositellaan vähintään 10–20 g maata (kuivapaino) testiastiaa kohden. Astiassa olevan maakerroksen paksuuden on oltava 2–3 cm (änkyrimadot) tai 4–5 cm (lierot).

34. Testissä käytetyt madot poistetaan viljelmästä (esim. änkyrimadot korupihdeillä). Aikuiset eläimet siirretään käsittelemättömään testimaahan totuttautumista varten ja ruokitaan (ks. kohta 36). Jos testiolosuhteet poikkeavat viljelyolosuhteista, 24–72 tunnin totuttamisjakso on riittävä, jotta madot ehtivät sopeutua testioloihin. Totuttamisjakson jälkeen lierot huuhdellaan siirtämällä ne lasimaljoihin (esim. petrimaljoihin), joissa on puhdasta vettä. Lierot punnitaan, ennen kuin ne lisätään testimaahan. Ennen punnitusta ylimääräinen vesi poistetaan madoista painamalla niitä varovasti astian reunaa vasten tai taputtelemalla ne varovasti kuiviksi kevyesti kostutetulla paperiliinalla.

35. Testiorganismien kaivautumiskäyttäytymistä havainnoidaan ja tiedot kirjataan ylös. Kun testeissä käytetään lieroja, eläimet (kontrolli- ja testieläimet) yleensä kaivautuvat maahan parissa tunnissa. Tarkista asia 24 tunnin kuluessa siitä, kun madot on lisätty testiastioihin. Jos lierot eivät kaivaudu maahan (esim. yli 10 prosenttia on kaivautumatta yli puolet aikaa kertymävaiheesta), testiolosuhteet eivät ole sopivat tai testiorganismit eivät ole

▼M4

terveitä. Tällöin testi on lopetettava ja aloitettava alusta. Änkyrimadot elävät lähinnä maan huokosissa, ja niiden ruumiinpeite on usein vain osittaisessa kosketuksessa ympäröivään substraattiin. Kaivautuvien ja ei-kaivautuvien änkyrimatojen altistuksen oletetaan olevan vastaava, eikä testiä tarvitse välttämättä toistaa, jos änkyrimadot eivät kaivaudu.

Ruokinta

36. Ruokintaa on harkittava, jos käytetään maata, jossa orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus on matala. Kun käytetään keinomaata, lieroille on suositeltavaa antaa kerran viikossa 7 mg kuivatettua lantaa yhtä grammaa maata (kuivapaino) kohden ja änkyrimadoille 2–2,5 mg jauhettuja kaurahiutaleita viikossa yhtä grammaa maata (kuivapaino) kohden (11). Ensimmäinen ravintoannos sekoitetaan maahan heti testiorganismien lisäämisen jälkeen. Viljelmissä on suositeltavaa käyttää samantyyppistä ravintoa (katso lisäys 5).

Valo ja lämpötila

37. Testeissä testiastioiden ympäristössä käytetään kontrolloitua valon ja pimeän vaihtelua siten, että 16 tuntia on valoisaa ja 8 tuntia pimeää. Valon suositeltava voimakkuus on 400–800 luksia (3). Lämpötilan on oltava 20 ± 2 °C koko testin ajan.

Testipitoisuudet

38. Testissä käytetään yhtä pitoisuutta. Lisäpitoisuutta tai -pitoisuuksia saa käyttää vain perustellusta syystä. Jos testikemikaalin toksisuus (ECx) on lähellä analyyttistä havaitsemisrajaa, on suositeltavaa käyttää radioaktiivisesti merkittyä testikemikaalia, jonka ominaisradioaktiivisuus on korkea. Metallien osalta pitoisuuden on oltava taustatasoa korkeampi kudoksissa ja maassa.

Rinnakkaisnäytteet

39. Kineettisissä mittauksissa (kertymä- ja poistumavaihe), käsiteltyjen rinnakkaisastioiden määrä on vähintään kolme näytteenottokertaa kohden. Rinnakkaisnäytteitä on valmistettava niin monta, että ne riittävät kaikkiin näytteenottokertoihin kertymä- ja poistumavaiheen aikana.

40. Biologisiin havaintoihin ja mittauksiin (esim. kuivapainon ja märkäpainon suhde, rasvapitoisuus) ja matojen ja maan taustapitoisuuksien analysointiin tarvitaan vähintään 12 rinnakkaisastiaa negatiivista kontrollia varten (neljä alussa, neljä kertymävaiheen lopussa ja neljä poistumavaiheen lopussa), jos ei käytetä muuta liuotinta kuin vettä. Jos testikemikaalin lisäämisessä käytetään jotakin liuotusapuainetta, käsiteltyjen rinnakkaisnäytteiden lisäksi tarvitaan liuotinkontrolli (neljä rinnakkaisastiaa alussa, neljä kertymävaiheen lopussa ja neljä poistumavaiheen lopussa), jossa on kaikki muut ainesosat testattavaa ainetta lukuun ottamatta. Tässä tapauksessa voidaan valmistella vielä neljä negatiivista kontrolliastiaa (ei liuotinta) valinnaista näytteenottoa varten kertymävaiheen lopussa. Rinnakkaisnäytteitä verrataan biologisesti liuotinkontrolliin, jotta saadaan tietoa liuottimen mahdollisesta vaikutuksesta testiorganismeihin. On suositeltavaa perustaa varalle riittävä määrä ylimääräisiä rinnakkaisastioita (esim. kahdeksan) käsittelyä ja kontrollia/kontrolleja varten.

▼M4

Maan laatua koskevien mittausten taajuus

41. Maan pH, maan kosteuspitoisuus ja lämpötila (jatkuva) testihuoneessa mitataan kertymä- ja poistumavaiheen alussa ja lopussa. Maan kosteuspitoisuus tarkistetaan kerran viikossa punnitsemalla testiastiat ja vertaamalla todellista painoa alkuperäiseen painoon testin alussa. Vedenhukka korvataan lisäämällä deionisoitua vettä.

Näytteenotto ja analyysit madoista ja maasta

42. Esimerkki lierojen ja änkyrimatojen biokertymistestien kertymä- ja poistumavaiheen aikataulusta on lisäyksessä 3.

43. Testiastioista otetaan maanäyte, josta määritetään testikemikaalin pitoisuus ennen matojen lisäämistä sekä kertymä- ja poistumavaiheen aikana. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään madoista ja maasta. Kokonaispitoisuudet maassa mitataan. Pitoisuudet huokosvedessä voidaan myös mitata haluttaessa. Tässä tapauksessa perusteet ja soveltuvat menetelmät on määritettävä ennen tutkimuksen aloittamista ja sisällytettävä raporttiin.

44. Madoista ja maasta otetaan näyte vähintään kuusi kertaa kertymä- ja poistumavaiheen aikana. Jos testikemikaalin stabiilisuus on osoitettu, maa-analyysien määrää voi vähentää. On suositeltavaa analysoida vähintään kolme rinnakkaisnäytettä kertymävaiheen alussa ja lopussa. Jos kertymävaiheen lopussa mitattu pitoisuus maassa poikkeaa alkuperäisestä pitoisuudesta yli 30 prosenttia, myös muina päivinä otetut maanäytteet on analysoitava.

45. Poista kunakin näytteenottoajankohtana madot tietyn rinnakkaisnäytteen maasta (esim. levittämällä rinnakkaisnäytteen maa-aines matalalle vadille ja poimimalla madot pehmeillä korupihdeillä) ja huuhtaise madot vedellä matalassa lasi- tai teräsastiassa. Poista ylimääräinen vesi (ks. kohta 34). Siirrä madot varovasti esipunnittuun astiaan ja punnitse ne heti suolen sisältö mukaan lukien.

46. Sen jälkeen lierojen (*Eisenia*) annetaan tyhjentää suoli yli esim. kostealle suodatinpaperille peitetyssä petrimaljassa (ks. kohta 34). Kun suoli on tyhjennetty, matojen paino määritetään, jotta mahdollinen biomassan lasku testin aikana voidaan määrittää (katso kohdassa 17 annetut luotettavuuskriteerit). Änkyrimadot punnitaan ja kudokset analysoidaan ilman suolen tyhjentämistä, sillä se on teknisesti vaikeaa matojen pienen koon vuoksi. Kun lopullinen painon määritys on tehty, madot tapetaan heti soveliaimmalla tavalla (esim. nestemäisellä typellä tai pakastamalla alle –18 °C:n lämpötilassa).

47. Poistumavaiheen aikana madot korvaavat kontaminoituneen suolensisällön puhtaalla maalla. Siitä syystä matojen, jotka eivät tyhjennä suolta (tässä yhteydessä änkyrimatojen), heti poistumavaiheen jälkeen tehdyissä mittauksissa on mukana suolen kontaminoitunut maa. Vedessä elävien harvasukasmatojen osalta oletetaan, että poistumavaiheen ensimmäisten 4–24 tunnin jälkeen kontaminoitunut suolen sisältö on korvautunut puhtaalla sedimentillä, esim. (46). Vastaavia löydöksiä on raportoitu lieroista radioaktiivisesti merkityn kadmiumin ja sinkin kertymisen tutkimuksissa (78). Änkyrimadoilla, joiden suolta ei ole tyhjennetty, tätä poistumavaiheen ensimmäistä näytettä voidaan pitää kudospitoisuutena suolen tyhjennyksen jälkeen. Jotta kontaminoitumattoman maan laimentava vaikutus testattavan aineen pitoisuuteen poistumavaiheessa voidaan huomioida, suolen sisällön paino voidaan arvioida madon märkäpainon ja tuhkapainon tai madon kuivapainon ja tuhkapainon suhteesta.

▼M4

48. Maa- ja matonäytteet on suositeltavaa analysoida heti poistamisen jälkeen (1–2 päivän kuluessa), jotta hajoaminen ja muu hävikki voidaan välttää, ja keskimääräiset kertymä- ja poistumanopeudet on suositeltavaa laskea testin kuluessa. Jos analyysi viivästyy, näytteitä säilytetään asianmukaisella tavalla, kuten pakastamalla (≤ –18 °C).

49. On tarkistettava, että kyseisessä menetelmässä kemiallisen analyysin tarkkuus ja toistettavuus sekä testikemikaalin saalis maa- ja matonäytteistä ovat tyydyttävät. Havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ) on raportoitava. On myös tarkistettava, että testikemikaalia ei havaita kontrolliastioissa taustapitoisuutta suurempina pitoisuuksina. Kun testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa Ca on > 0 kontrollimadoissa, se on sisällytettävä kineettisten parametrien laskentaan (ks. lisäys 2). Kaikkia näytteitä on käsiteltävä koko testin ajan siten, että esim. kontaminaatio ja hävikki (joka johtuu esim. testikemikaalin adsorboitumisesta näytteenottovälineeseen) on mahdollisimman vähäistä).

50. Kun testikemikaalit ovat radioaktiivisesti merkittyjä, voidaan analysoida lähtökemikaali ja metaboliitit. Lähtötestikemikaalin ja metaboliittien kvantifiointi tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa antaa tärkeää tietoa. Sen jälkeen näytteet ”puhdistetaan” siten, että lähtötestikemikaali voidaan määrittää erikseen. Jos yksittäiset metaboliitit muodostavat yli 10 prosenttia analysoidun näytteen tai näytteiden radioaktiivisuudesta, näiden metaboliittien tunnistus on suositeltavaa.

51. Kokonaissaanto sekä testikemikaalin saanto madoista, maasta ja mahdollisista loukuista, joissa on adsorbentteja haihtuneen testikemikaalin keräystä varten, on kirjattava ylös ja raportoitava.

52. Tietystä testiastiasta otetut yksilöt voidaan yhdistää, jos kyseessä ovat änkyrimadot, jotka ovat pienempiä kuin lierot. Jos yhdistäminen vähentää rinnakkaisnäytteiden määrää, soveltuvien tilastomenetelmien määrä laskee. Jos tietty tilastomenetelmä ja tilastollinen voima ovat tarpeen, testissä on oltava yhdistämisen, tarvittavien menetelmien ja tilastollisen voiman edellyttämä määrä rinnakkaisastioita.

53. BAF on suositeltavaa ilmaista kokonaiskuivapainon funktiona ja tarvittaessa (esim. hyvin hydrofobiset kemikaalit) rasvapitoisuuden funktiona. Rasvapitoisuus on määritettävä soveltuvilla menetelmillä (tähän tarkoitukseen mukautetaan olemassa olevia menetelmiä, esim. (31) (58)). Näissä menetelmissä käytetään kloroformi-metanoliuuttoa. Kloorattujen liuottimien käyttöä on kuitenkin hyvä välttää. Käytä kohdassa (17) kuvattua Blighin ja Dyerin menetelmän muunnosta (9). Koska eri menetelmillä ei välttämättä saada samoja arvoja, on tärkeää kuvailla käytetty menetelmä. Ihanteellisessa tapauksessa (jos esim. matokudosta on riittävästi) rasva-analyysi tehdään samalle näytteelle tai uutteelle, josta testattava aine määritetään, koska rasvat täytyy usein poistaa uutteesta ennen kuin sitä voi käyttää kromatografiseen määritykseen (49). Rasvapitoisuus voidaan mitata myös kontrollieläimistä BAF-arvojen normalisointia varten. Jälkimmäinen vaihtoehto vähentää välineiden kontaminaatiota testikemikaalilla.

▼M4

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

54. Testikemikaalin kertymäkäyrä saadaan esittämällä madoissa tai matojen pinnalla kertymävaiheen aikana oleva testikemikaalin pitoisuus ajan funktiona aritmeettisella asteikolla. Jos käyrä osoittaa tasannevaihetta tai tasapainotilaa (määritelmät ovat lisäyksessä 1), tasapainotilan biokertymiskerroin BAF lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\frac{C_a \text{ tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa (keskiarvo)}}{C_s \text{ tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa (keskiarvo)}}$$

C_a on testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa

C_s on testikemikaalin pitoisuus maassa

55. Jos tasapainotilaa ei saavuteta, BAFss-arvon sijaan määritetään nopeusvakioihin perustuva BAF_K seuraavasti:

— Määritä kertyvyyskerroin (BAF_K) kertymävakion (k_s) ja poistumavakion (k_e) suhteena.

— Kertymä- ja poistumanopeudet on hyvä laskea samaan aikaan (ks. kaava 11 lisäyksessä 2).

— Poistumavakio (k_e) määritetään yleensä poistumakäyrästä, joka kuvaa testiaineen pitoisuutta madoissa poistumavaiheessa. Kertymävakio (k_s) lasketaan tunnetulla k_e-arvolla ja C_a-arvolla, joka saadaan kertymäkäyrästä (ks. lisäys 2). Paras menetelmä BAF_K:n ja nopeusvakioiden k_s ja k_e laskemiseksi on estimoida tietokoneella epälineaariset parametrit. Jos on ilmeistä, ettei poistuma noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, on käytettävä monimutkaisempia malleja.

Testiraportti

56. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— käytettävissä olevat tiedot testikemikaalin välittömästä tai pitkäaikaistoksisuudesta (esim. EC_x, $LC_{x,,}$ NOEC) maalla eläville harvasukasmadoille

— puhtaus, fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, esim. log K_{ow}, vesiliukoisuus

— kemialliset tunnistetiedot, testattavan aineen lähde, mahdollisen liuottimen tunnistetiedot ja pitoisuus

— jos testikemikaali on radioaktiivisesti leimattu, leimattujen atomien tarkka sijainti, ominaisradioaktiivisuus ja radiokemiallinen puhtaus.

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta, lähde, mahdollinen esikäsittely, totuttamistiedot, ikä, koko jne.

▼M4

Testiolosuhteet:

— käytetty testimenetelmä

— käytetty valaistustyyppi ja valon ominaisuudet sekä valojakso(t)

— testisuunnitelman kuvaus (esim. testiastioiden määrä ja koko, maan massa ja maakerroksen korkeus, rinnakkaisnäytteiden määrä, matojen määrä rinnakkaisnäytettä kohden, testipitoisuuksien määrä, kertymä- ja poistumavaiheen kesto, näytteenottotaajuus)

— testiastian materiaalin valintaperusteet

— testattavan aineen valmistelu ja lisäys sekä tietyn menetelmän valintaperusteet

— nimelliset testipitoisuudet, testiastioissa mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat sekä menetelmä, jolla arvot on laskettu

— keinomaan ainesosien lähde tai maa-aineksen alkuperä, jos käytetään luonnollista maata, mahdollisen esikäsittelyn kuvaus, kontrollien tulokset (eloonjääntі, biomassan kehitys, lisääntyminen), maan ominaisuudet (pH, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus, hiukkaskokojakauma eli hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet, WHC_{max}, vesipitoisuus prosentteina testin alussa ja lopussa sekä muut tehdyt mittaukset)

— yksityiskohtaiset tiedot maa- ja matonäytteiden käsittelystä, mukaan lukien tiedot testattavan aineen säilytyksestä, lisäämistavasta, uutosta ja analyysimenetelmistä (sekä tarkkuudesta) matojen ja maan osalta sekä rasvapitoisuudesta (jos mitattu) ja testiaineen saannista.

Tulokset:

— kontrollimatojen ja jokaisessa testiastiassa olevien matojen kuolleisuus sekä mahdolliset havainnot epätavallisesta käyttäytymisestä (esim. maan välttely, lisääntymisen puute änkyrimatojen biokertyvyystestissä)

— maan ja testiorganismien kuiva- ja märkäpainon suhde (hyödyllinen normalisointia varten)

— matojen märkäpainot jokaisella näytteenottokerralla, lierojen märkäpainot testin alussa sekä jokaisella näytteenottokerralla ennen suolen tyhjennystä ja sen jälkeen

— testiorganismien rasvapitoisuus (jos määritetty)

— käyrät, jotka osoittavat testikemikaalin kertymä- ja poistumakinetiikan madoissa, ja aika tasapainotilan saavuttamiseen

— C_a ja C_s (tarvittaessa keskihajonta ja alue) kaikille näytteenottoajankohdille (C_a ilmaistaan muodossa grammaa kilossa koko ruumiin märkä- ja kuivapainoa ja C_s muodossa grammaa kilossa maan märkä- ja kuivapainoa) jos eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) tarvitaan (esim. kahden tai usean testin tulosten vertailuun, kun eläinten rasvapitoisuus poikkeaa toisistaan), C_a voidaan ilmaista myös muodossa grammaa kilossa organismin rasvamäärässä ja C_s muodossa grammaa kilossa maan orgaanista hiiltä (OC)

— BAF (kiloa maata kilossa matoa), maan kertymävakio k_s (grammaa maata kilossa matoa, päivä$^{-1}$), poistumavakio k_e (päivää$^{-1}$) ja BSAF (kiloa maan orgaanista hiiltä kilossa madon rasvamäärässä) voidaan myös ilmoittaa

▼M4

— jos mitattu: maassa ja testieläimissä havaitut lähtökemikaalin, metaboliittien ja sitoutuneiden jäämien prosenttiosuudet (esim. testikemikaalin, jota ei voida uuttaa tavallisilla uuttomenetelmillä, määrä prosentteina)

— tietojen tilastollisessa analysoinnissa käytetyt menetelmät.

Tulosten arviointi

— kohdassa 17 annettujen luotettavuusehtojen täyttyminen

— odottamattomat tai epätavalliset tulokset, kuten testikemikaalin epätäydellinen poistuminen testieläimistä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688–00a.

3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus.* ASTM International, E1676-04: s. 26

4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W&Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.

7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.

8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, s. 671.

11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2–29.

16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, s. 555–576.

17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

19) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta, EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.

20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman&Hall, London, s. 426.

21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: s. 149 Ladattavissa osoitteessa: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf

23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: s. 57

24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, s. 156.

▼M4

29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. Teoksessa: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W.&Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

35) ISO 11268–2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

36) Jaenike J (1982). "E*isenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, s. 137.

44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.

46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼M4

47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48) Tämän liitteen luku C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

49) Tämän liitteen luku C.13. Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa.

50) Tämän liitteen luku C.21. Maaperän mikrobit: typen muuntumistesti.

51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. Teoksessa: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: s. 373

61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W.&Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107–127.

63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M.&Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW&Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Biokertyvyys on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen väliaineessa. Biokertymistä aiheuttaa biokonsentraatio ja biomagnifikaatio (katso seuraavat kohdat).

Biokonsentraatio on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen, joka johtuu ainoastaan kemikaalin kertymisestä ympäröivästä väliaineesta (ruumiin pinnan ja syödyn maan kautta), verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen väliaineessa.

Biomagnifikaatio on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen, joka johtuu pääasiassa kontaminoituneen ravinnon tai saaliin nauttimisesta, verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen ravinnossa tai saaliissa. Biomagnifikaatio voi aiheuttaa testattavan aineen siirtymistä tai kertymistä ravintoverkoissa.

Poistuminen on testikemikaalin poistumista testiorganismikudoksesta aktiivisilla tai passiivisilla prosesseilla riippumatta siitä, onko ympäröivässä väliaineessa testattavaa ainetta vai ei.

Biokertyvyystekijä (BAF) minä tahansa tämän kertyvyystestin kertymävaiheen ajankohtana on testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa tai sen pinnalla (C_a, grammaa kilossa madon kuivapainoa) jaettuna kyseisen kemikaalin pitoisuudella väliaineessa (C_s, grammaa kilossa maan kuivapainoa). BAF ilmoitetaan kiloina maata kilossa matoa.

Biokertyvyystekijä tasapainotilassa (BAF_{ss}) ei muutu merkittävästi pitkän ajanjakson aikana, kun testikemikaalin pitoisuus väliaineessa on vakio tänä aikana (C_s, grammaa kilossa maan kuivapainoa).

Biokertyvyystekijöitä, jotka on laskettu suoraan maan kertymävakion (k_s) ja poistumavakion (k_e) suhteesta (katso jäljempänä), sanotaan kineettisiksi biokertyvyystekijöiksi (BAF_K).

Eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) on testikemikaalin rasvan suhteen normalisoitu pitoisuus testiorganismissa tai sen pinnalla jaettuna orgaanisen hiilen suhteen normalisoidulla pitoisuudella maassa tasapainotilassa. C_a ilmaistaan grammoina kilossa organismin rasvamäärässä, ja C_s grammoina kilossa maan orgaanista ainesta. BSAF ilmaistaan kiloina orgaanista hiiltä kilossa rasvaa.

Tasannevaihe tai **tasapainotila** on altistusvaiheessa samanaikaisesti tapahtuvien kertymä- ja poistumaprosessien välinen tasapainotila. Tasapainotila saavutetaan BAF:ää ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä BAF-määritystä poikkeavat enintään ± 20 prosenttia eikä näiden kolmen näytteenottoajanjakson välillä ole tilastollisesti merkitseviä eroja. Kun testataan kemikaaleja, jotka kertyvät hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta (49).

Orgaaninen hiili-vesi-jakautumiskerroin (K_{oc}) on kemikaalin maan orgaanisen hiilen fraktiossa olevan pitoisuuden ja vedessä tasapainotilassa olevan pitoisuuden välinen suhde.

Oktanoli-vesi-jakautumiskerroin (K_{ow}) on kemikaalin n-oktanoliliukoisuuden ja vesiliukoisuuden suhde tasapainotilassa, josta käytetään myös merkintää P_{ow}. Logaritmia K_{ow} (log K_{ow}) käytetään ilmaisemaan kemikaalin biokertyvyyspotentiaalia vesieliöissä.

▼M4

Kertymä- eli altistumisvaihe on aika, jona testiorganismit altistetaan testattavalle kemikaalille.

Maan kertymävakio (k_s) on numeerinen arvo, joka määrittää kuinka nopeasti testiaineen pitoisuus nousee testiorganismissa tai sen pinnalla, koska testiainetta kertyy maafaasista. k_s ilmaistaan grammoina maata kilossa matoa, d^{-1}.

Poistumavaihe alkaa, kun testiorganismit on siirretty kontaminoituneesta väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole testattavaa ainetta. Poistumavaiheen aikana tutkitaan kyseisen testikemikaalin (netto)poistumaa testiorganismeista.

Poistumavakio (k_e) on numeerinen arvo, joka kuvaa testattavan aineen pitoisuuden alenemisen nopeutta testiorganismissa tai sen pinnalla, kun testiorganismit on siirretty testattavaa ainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta. k_e:n laatu on $päivää^{-1}$).

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M4

Lisäys 2

Kertymä- ja poistumaparametrien laskeminen

Biokertymistestin tärkein tutkittava ominaisuus on biokertyvyystekijä BAF. Mitattu BAF voidaan laskea jakamalla pitoisuus testiorganismissa C_a pitoisuudella maassa C_s tasapainotilassa. Jos tasapainotilaa ei saavuteta kertymävaiheessa, BAF_K lasketaan nopeusvakioista eikä BAFss-arvosta. On kuitenkin ilmoitettava, perustuuko BAF tasapainotilan pitoisuuksiin vai nopeusvakioihin.

Kineettinen biokertyvyystekijä (BAF_K), maan kertymävakio (k_s) ja poistumavakio (k_e) lasketaan yleensä tietokoneella käyttäen epälineaarisia parametrien arviointimenetelmiä kohdassa (68) kuvattujen mallien perusteella. Kun tietokoneelle syötetään sarja peräkkäisiä aikapitoisuustuloksia ja mallikaavat:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 1]}$$

tai

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 2]}$$

jossa

C_a = kemikaalin pitoisuus madoissa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_s = kertymävakio kudoksessa [grammaa maata kilossa matoa, d-1]

C_s = kemikaalin pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_e = poistumavakio [d-1]

t_c = aika kertymävaiheen lopussa

nämä ohjelmat laskevat BAF_K-, k_s- ja k_e-arvot.

Kun taustapitoisuus ei-altistuneissa madoissa esim päivänä 0 poikkeaa merkittävästi nollasta (näin voi käydä esim. metallien kanssa), taustapitoisuus ($C_{a,0}$) on sisällytettävä näihin yhtälöihin seuraavasti:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 3]}$$

ja

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 4]}$$

Jos massaa havaitaan testikemikaalin pitoisuuden merkittävää laskua kertymävaiheen aikana, voidaan käyttää seuraavia malleja, esim. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[yhtälö 5]}$$

▼M4

jossa

C_s = kemikaalin pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_0 = hajoamisen nopeusvakio maassa [d-1]

C_0 = kemikaalin alkuperäinen pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 7]}$$

jossa

C_a = kemikaalin pitoisuus madoissa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_s = kertymävakio kudoksessa [grammaa maata kilossa matoa, d-1]

k_0 = hajoamisen nopeusvakio maassa [d-1]

k_e = poistumavakio [d-1]

t_c = aika kertymävaiheen lopussa.

Kun tasapainotila saavutetaan kertymävaiheessa (eli $t = \infty$), yhtälö 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 1]}$$

voidaan muuttaa seuraavasti:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

tai

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[yhtälö 8]}$$

Tällöin k_s/k_e x C_s lähenee testiaineen pitoisuutta matokudoksissa tasapainotilassa ($C_{a,ss}$).

Eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) voidaan laskea seuraavasti:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[yhtälö 9]}$$

jossa f_{oc} on maan orgaanisen hiilen fraktio ja f_{lip} on matojen rasvan fraktio, joista kumpikin määritetään mieluiten testissä otetuista näytteistä. Ne perustuvat kuivapainoon tai märkäpainoon.

Poistumakinetiikkaa voidaan mallintaa poistumavaiheen tietojen avulla ja soveltamalla seuraavaa malliyhtälöä ja tietokonepohjaisia epälineaarisia parametrien arviointimenetelmiä. Jos ajan suhteen esitetyt datapisteet viittaavat testiaineen pitoisuuden jatkuvaan eksponentiaaliseen laskuun eläimissä, poistumisen ajallista esiintymistä voidaan kuvata yhden lohkon mallilla (yhtälö 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[yhtälö 10]}$$

▼M4

Toisinaan poistumisprosessit vaikuttavat kaksivaiheisilta: C_a laskee nopeasti alkuvaiheissa, mutta poistumisen myöhemmissä vaiheissa testattavat aineet poistuvat hitaammin, esim. (27) (68). Nämä kaksi vaihetta voidaan tulkita olettamalla, että organismissa on kaksi eri lohkoa, joista testattava aine poistuu eri nopeuksilla. Tällöin on tutustuttava asiaa käsittelevään kirjallisuuteen, esim. (38) (39) (40) (78).

Edellä annettuja malliyhtälöitä käyttämällä voidaan laskea myös kineettiset parametrit (k_s ja k_e) yhdellä kertaa soveltamalla ensimmäisen asteen kineettistä mallia samanaikaisesti kaikkiin kertymä- ja poistumavaiheen tietoihin. Tällaisen kertymä- ja poistumavakioiden yhdistetyn laskennan kuvaus on viitteissä (40), (72) ja (69).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[yhtälö 11]}$$

Huomautus: Kun kertymä- ja poistumaparametrit estimoidaan samanaikaisesti yhdistetyistä kertymä- ja poistumatiedoista, yhtälön 11 ”m” on kuvaaja, joka sallii tietokoneohjelman määrittää yhtälön alaehdot niitä vastaavan vaiheen datajoukkoihin ja tehdä arvioinnin oikein (m = 1 kertymävaiheelle, m = 2 poistumavaiheelle).

Siitä huolimatta malliyhtälöiden käytössä on noudatettava varovaisuutta varsinkin, kun testikemikaalin biologisessa hyötyosuudessa tai (bio)hajoamisessa tapahtuu muutoksia testin aikana (ks. esim. (79)).

▼M4

Lisäys 3

ESIMERKKEJÄ BIOKERTYVYYSTESTIEN AIKATAULUISTA

Testi lieroilla

a) Kertymävaiheessa 8 näytteenottopäivää kineettisten tietojen laskentaa varten

Päivä	Toiminnot
– 6	Valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Testikemikaaliliuoksen lisääminen maafraktioon, mahdollisen liuottimen haihdutus, maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, testiolosuhteiden vakauttaminen 4 päivän ajan (3 viikkoa, jos maahan lisätään metallia)
– 3 – – 1	Testiorganismien erottaminen viljelmästä totuttautumista varten, maan ainesosien valmistelu ja kostutus
0	Kosteuden ja maan pH-arvon mittaus, maanäytteiden ottaminen käsitellyistä astioista ja liuotinkontrolleista testikemikaalien pitoisuuden määrittämistä varten, ravintoannoksen lisääminen, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, riittävän matojen alanäytteiden säilyttäminen analyyttisten tausta-arvojen, märkä- ja kuivapainon sekä rasvapitoisuuden määrittämistä varten, kaikkien testiastioiden punnitus maan kosteuden kontrollointia varten, tuloilman kontrollointi, jos käytössä on suljettu testijärjestelmä
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testattavan aineen pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
8–9	Sama kuin päivänä 3
10	Sama kuin päivänä 1
11–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
15–16	Sama kuin päivänä 3
17	Sama kuin päivänä 1
18–20	Sama kuin päivänä 3

▼**M4**

Päivä	Toiminnot
21	Sama kuin päivänä 1, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaaminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, kertymävaiheen loppu, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä poistumavaihetta varten astioihin, joissa on puhdasta maata (ei suolen tyhjennystä), maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Esialtistustoimet (tasapainovaihe) on ajoitettava testikemikaalin ominaisuuksien mukaan.
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

b) Poistumavaihe

Päivä	Toiminnot
– 6	Maan ainesosien valmistelu ja kostutus, valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, inkubaatio testiolosuhteissa 4 päivän ajan
0 (kertymävaiheen loppu)	Lämpötilan ja maan pH-arvon mittaus, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, ravintoannoksen lisääminen, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä astioihin, joissa on puhdasta maata, maa- ja matonäytteet 4–6 tunnin kuluttua testikemikaalin pitoisuuden määrittämistä varten
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testikemikaalin pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
8–9	Sama kuin päivänä 3
10	Sama kuin päivänä 1
11–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
15–16	Sama kuin päivänä 3
17	Sama kuin päivänä 1

▼**M4**

Päivä	Toiminnot
18–20	Sama kuin päivänä 3
21	Sama kuin päivänä 1, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaus, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Maa valmistellaan ennen poistumavaihetta samoin kuin ennen kertymävaihetta
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

Testi änkyrimadoilla

a) Kertymävaiheessa 8 näytteenottopäivää kineettisten tietojen laskentaa varten

Päivä	Toiminnot
– 6	Valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Testikemikaaliliuoksen lisääminen maafraktioon, mahdollisen liuottimen haihdutus, maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, testiolosuhteiden vakauttaminen 4 päivän ajan (3 viikkoa, jos maahan lisätään metallia)
– 3 – – 1	Testiorganismien erottaminen viljelmästä totuttautumista varten, maan ainesosien valmistelu ja kostutus
0	Kosteuden ja maan pH-arvon mittaus, maanäytteiden ottaminen käsitellyistä astioista ja liuotinkontrolleista testikemikaalien pitoisuuden määrittämistä varten, ravintoannoksen lisääminen maahan, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, riittävän matojen alanäytteiden säilyttäminen analyyttisten tausta-arvojen, märkä- ja kuivapainon sekä rasvapitoisuuden määrittämistä varten, kaikkien testiastioiden punnitus maan kosteuden kontrollointia varten, tuloilman kontrollointi, jos käytössä on suljettu testijärjestelmä
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testattavan aineen pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen maahan, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
9	Sama kuin päivänä 1
10	Sama kuin päivänä 3

▼**M4**

Päivä	Toiminnot
11	Sama kuin päivänä 1
12–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen maahan, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaaminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, kertymävaiheen loppu, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä poistumavaihetta varten astioihin, joissa on puhdasta maata (ei suolen tyhjennystä), maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Esialtistustoimet (tasapainovaihe) on ajoitettava testikemikaalin ominaisuuksien mukaan
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

▼M4

Lisäys 4

Keinomaan valmistus- ja säilytyssuosituksia

Koska tietystä lähteestä peräisin olevaa luonnonmaata ei välttämättä ole saatavana vuoden ympäri ja koska luonnonmaan sisältämät organismit ja mikrosaasteet voivat vaikuttaa testiin, tässä testissä on suositeltavaa käyttää keinomaata, joka on kuvattu tämän liitteen luvussa C.8 Myrkyllisyystutkimus madoilla (48). Useat testilajit pystyvät elämään, kasvamaan ja lisääntymään tässä keinomaassa, ja testi- ja viljelyolosuhteiden yhdenmukaisuus on mahdollisimman suuri sekä laboratorion sisällä että laboratorioiden välillä.

Maan ainesosat

Turve:	10 %	Rahkasuoturve OECD:n ohjeen 207 (48) mukaisesti
Kvartsihiekka:	70 %	Teollinen kvartsihiekka (ilmakuivattu), raekoko: yli 50 prosenttia hiukkasista on oltava 50–200 μm, mutta kaikkien hiukkasten on oltava alle ≤ 2 mm
Kaoliniittisavi:	20 %	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %
Kalsiumkarbonaatti:	≤ 1 %	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas

Haluttaessa keinomaan orgaanisen hiilen pitoisuutta voidaan pienentää esimerkiksi laskemalla turpeen määrän 4–5 prosenttiin kuivamaasta ja lisäämällä hiekan määrää vastaavasti. Kun orgaanisen hiilen pitoisuus pienenee, testikemikaalin adsorboituminen maahan (orgaaniseen hiileen) saattaa heikentyä ja testikemikaalin saatavuus madoille nousta (74). On osoitettu, että *Enchytraeus albidus* ja *Eisenia fetida* täyttävät lisääntymiskriteerit, kun luonnonmaan orgaanisen hiilen pitoisuus on matala, esim. 2,7 prosenttia (33), (60). Kokemuksen mukaan sama saadaan aikaan keinomaassa käyttämällä 5 prosenttia turvetta.

Valmistelut

Maan kuivat ainesosat sekoitetaan perusteellisesti (esim. suurella laboratoriosekoittimella). Tämä tehdään noin viikko ennen testin alkua. Sekoitetun kuivamaan ainekset kostutetaan deionisoidulla vedellä vähintään 48 tuntia ennen testattavan aineen lisäämistä, jotta happamuus ehtii vakiintua. pH-määritystä varten käytetään maan ja 1 M KCl -liuoksen sekoitusta suhteessa 1:5. Jos pH-arvo ei ole vaaditulla alueella (6,0 ± 0,5), maahan lisätään riittävä määrä $CaCO_3$:ta tai valmistetaan uusi maaerä.

Keinomaan suurin mahdollinen vedensitomiskyky (WHC) määritetään standardin ISO 11268-2 (35) mukaisesti. Vähintään kaksi vuorokautta ennen testin aloittamista kuiva keinomaa kostutetaan lisäämällä deionisoitua tai synteettistä vettä, kunnes vesipitoisuus on noin puolet lopullisesta. Lopullisen vesipitoisuuden on oltava 40–60 prosenttia suurimmasta mahdollisesta vedensitomiskyvystä (WHCmax). Testin alussa esikostutettu maa jaetaan yhtä moneen erään kuin testissä käytetään pitoisuuksia ja kontrolleja, ja kosteuspitoisuus säädetään 40–60 prosenttiin WHC_{max}-arvosta testattavan aineen liuoksella ja/tai lisäämällä deionisoitua tai synteettistä vettä. Kosteuspitoisuus määritetään testin alussa ja lopussa (lämpötilassa 105 °C). Kosteuspitoisuuden on oltava optimaalinen lajeille. Kosteuspitoisuuden voi tarkistaa myös seuraavasti: kun maata puristetaan varovasti käsin, sormien välissä pitäisi näkyä pieniä vesipisaroita.

▼M4

Säilytys

Keinomaan kuivia ainesosia voidaan säilyttää huoneenlämmössä käyttöön asti. Valmistettua, esikostutettua maata voidaan säilyttää viileässä enintään kolme vuorokautta ennen testiaineen lisäämistä. Veden haihtumista on ehkäistävä. Kun maahan on lisätty testiaine, maa on käytettävä heti, ellei ole tiedossa, että tiettyä maata voidaan säilyttää ilman, että se vaikuttaa testattavan aineen toksisuuteen ja biologiseen hyötyosuuteen. Näytteitä maasta, johon testiainetta on lisätty, voidaan säilyttää kyseisen testiaineen suositelluissa säilytysolosuhteissa analyysiin saakka.

▼M4

Lisäys 5

Maalla elävien harvasukasmatojen lajit, joita suositellaan maan biokertyvyystestejä varten

Lierot

Suositeltu testilaji on *Eisenia fetida* (Savigny 1826), joka kuuluu Lumbricidae-heimoon. Vuodesta 1972 lähtien on erotettu kaksi alalajia *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* (10). Jaeniken (36) mukaan ne ovat aidosti eri lajeja. *Eisenia fetida* on helppo tunnistaa segmenttien kirkkaankeltaisista väleistä, kun taas *Eisenia andrei* on yhtenäisen tummanpunainen. Ne ovat todennäköisesti kotoisin Mustanmeren alueelta. Nykyisin ne ovat levinneet ympäri maailmaa ja etenkin ihmisen muokkaamiin elinympäristöihin, kuten tunkioihin. Kumpaakin lajia voidaan käyttää ekotoksikologisissa ja biokertyvyystesteissä.

Eisenia fetidaa ja *Eisenia andreita* myydään kaupallisesti esim. kalansyötiksi. Niiden elinaika on lyhyt verrattuna muihin *Lumbricidae*-heimon lieroihin, ja ne tulevat sukukypsiksi noin 2–3 kuukauden iässä (huoneenlämmössä). Optimaalinen lämpötila on noin 20–24 °C. Lierot elävät mieluiten kosteassa alustassa, jonka pH on lähes neutraali ja joka sisältää paljon orgaanista ainesta. Koska näitä lajeja on käytetty yleisesti standardoiduissa ekotoksikologisissa testeissä noin 25 vuoden ajan, niiden kasvattaminen on vakiintunutta (48) (77).

Kumpaakin lajia voidaan kasvattaa hyvin erilaisissa eläinjätteissä. ISO:n suosittelema kasvatusalusta (35) on hevosen- tai lehmälantaa ja turvetta suhteessa 50:50. Kasvatusalustan pH-arvon on oltava noin 6–7 (sitä säädellään kalsiumkarbonaatilla). Ionisen johtavuuden on oltava matala (alle 6 mS/cm tai suolapitoisuus alle 0,5 %) eikä kasvatusalustassa saa olla liikaa ammoniakkia tai eläinten virtsaa. Kaupallista puutarhamultaa, joka ei sisällä lisäaineita, OECD:n mukaista keinomaata (48) tai näiden kahden sekoitusta suhteessa 50:50 voidaan myös käyttää. Alustan on oltava kostea mutta ei liian märkä. Kasvatuslaatikon soveltuva koko on 10–50 litraa.

Jotta saadaan vakioikäisiä ja -painoisia matoja, viljelmä on paras aloittaa munakoteloilla. Munakoteloita saadaan lisäämällä aikuisia matoja kasvatuslaatikkoon, jossa on tuoretta substraattia. Käytännön kokemus on osoittanut, että hyvä jälkeläistuotto saavutetaan, kun matojen tiheys on noin 100 aikuista matoa substraattikiloa (märkäpaino) kohden. Aikuiset madot poistetaan 28 vuorokauden kuluttua. Munakoteloista kuoriutuneita lieroja käytetään testaukseen, kun ne ovat sukukypsiä vähintään 2 kuukauden mutta alle 12 kuukauden kuluttua.

Edellä kuvattujen lajien matoja voidaan pitää terveinä, jos ne liikkuvat alustassa mutta eivät yritä lähteä siitä pois ja lisääntyvät jatkuvasti. Hyvin hidas liikkuminen tai keltainen peräpää (*Eisenia fetida* -lajilla) viittaa substraatin ehtymiseen. Tällöin on suositeltavaa lisätä tuoretta substraattia ja/tai vähentää eläinten määrää laatikossa.

Valikoitua lisäviitemateriaalia

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. Teoksessa: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. s. 331–338.

Änkyrimadot

Suositeltava laji on *Enchytraeus albidus*, Henle 1837. *Enchytraeus albidus* on nivelmatojen pääjakson harvasukasmatojen alaluokan *Enchytraeidae*-heimon suurimpia lajeja (jopa 15 mm), ja se on levinnyt ympäri maailmaa, esim. (8). *Enchytraeus albidusta* esiintyy merellisissä, limnisissä ja maaluontotyypeissä lähinnä hajoavassa orgaanisessa aineessa (levä, komposti) ja harvoin niityillä (42). Tämä laaja ekologinen sietokyky ja eräät morfologiset variaatiot viittaavat siihen, että lajista saattaa olla eri rotuja.

Enchytraeus albidusta myydään kaupallisesti kalanruoaksi. On tarkistettava, ettei viljelmä ole kontaminoitunut jollakin, yleensä pienemmällä lajilla (60). Jos kontaminaatiota ilmenee, kaikki madot on pestävä vedellä petrimaljassa. Sen jälkeen aikuiset *Enchytraeus albidus* -madot valitaan (stereomikroskoopilla) uuden viljelmän perustamista varten. Kaikki muut madot hävitetään. Näiden matojen elinikä on lyhyt, sillä kypsyyden saavuttaminen kestää 33 vuorokaudesta (18 °C:n lämpötilassa) 74 vuorokauteen (12 °C:n lämpötilassa). Testiin saa käyttää ainoastaan viljelmiä, joita on säilytetty ongelmitta laboratoriossa vähintään 5 viikkoa (yhden sukupolven).

Muut *Enchytraeus*-suvun lajit ovat myös soveltuvia, ja etenkin *Enchytraeus luxuriosus*. Tämä laji on todellinen maaeläjä, ja se on kuvattu äskettäin (65). Jos käytetään muita *Enchytraeus*-lajeja, ne on tunnistettava selvästi ja lajin valintaperusteet on raportoitava.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) -laji kuuluu samaan ryhmään kuin *Enchytraeus luxuriosus*. Sitä ei ole varmuudella todettu kentällä, vaan lajia on kuvattu vain lieroviljelmissä ja komposteissa (Römbke 2003). Siksi lajin alkuperäisiä ekologisia vaatimuksia ei tunneta. Tuoreet laboratoriotutkimukset erilaisissa maaperissä ovat kuitenkin vahvistaneet, että tällä lajilla on laaja sietokyky maan ominaisuuksille, kuten pH:lle ja koostumukselle (Jänsch *et al.* 2005). Tätä lajia on käytetty viime vuosina usein ekotoksikologisissa tutkimuksissa helpon kasvatuksen ja testauksen vuoksi (esim. Kuperman *et al.* 2003). Madot ovat kuitenkin pieniä, (3–12 mm, keskimäärin 7 mm) (Westheide & Müller 1996), joten niitä on vaikeampi käsitellä kuin *Enchytraeus albidus* -lajia. Kun tätä lajia käytetään *Enchytraeus albiduksen* sijaan, testiastia voi haluttaessa olla pienempi. Lisäksi on otettava huomioon, että tämä laji lisääntyy erittäin nopeasti. Generaatioaika on alle 20 vuorokautta lämpötilassa 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999), ja vielä lyhyempi tätä korkeammassa lämpötilassa.

Enchytraeus albidus -lajin änkyrimatoja (sekä muita *Enchytraeus*-lajeja) voidaan kasvattaa suurissa muovilaatikoissa (esim. 30 × 60 × 10 cm tai 20 × 12 × 8 cm pienikokoisille madoille), joissa on keinomaan ja kaupallisen, kontaminoitumattoman ja lisäaineettoman puutarhamullan seosta. Kompostiainesta on vältettävä, sillä se voi sisältää myrkyllisiä kemikaaleja, kuten raskasmetalleja. Kasvatusmaasta on poistettava eläimistö pakastamalla se kolme kertaa ennen käyttöä. Puhdasta keinomaata voidaan myös käyttää, mutta lisääntymisnopeus voi olla hitaampi kuin sekoitetuissa substraateissa. Substraatin pH-arvon on oltava 6,0 ± 0,5. Viljelmää pidetään inkubaattorissa lämpötilassa 15 ± 2 °C ilman valoa. Yli 23 °C:n lämpötilaa on vältettävä. Keino- tai luonnonmaan on oltava kosteaa, mutta ei märkää. Kun maata painetaan kevyesti kädellä, näkyviin pitäisi tulla vain pieniä vesipisaroita. Hapettomia olosuhteita on aina vältettävä (jos esimerkiksi käytetään kantta, kannessa on oltava tarpeeksi reikiä, jotta ilmanvaihto on riittävää). Kasvatusmaa on ilmastettava sekoittamalla sitä varovasti kerran viikossa.

▼M4

Madot ruokitaan vähintään kerran viikossa ruokahalun mukaisesti kaurahiutaleilla, jotka pannaan koloon maanpinnan alle ja peitetään maalla. Jos astiassa on jäljellä edellisellä ruokintakerralla annettua ruokaa, ruoanmäärää säädetään vastaavasti. Jos jäljellä olevassa ravinnossa kasvaa sientä, vaihda kaurahiutaleet uusiin. Lisääntymistä voi stimuloida antamalla kaurahiutaleiden lisäksi kaupallista vitaminoitua proteiinijauhetta kahden viikon välein. Kolmen kuukauden kuluttua eläimet siirretään vasta valmistettuun viljelmään tai kasvatusalustaan. Kaurahiutaleet, joita säilytetään suljetuissa astioissa, on käsiteltävä autoklaavissa tai kuumennettava ennen käyttöä, jotta infektiot ja jauhopunkit (esim. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) tai petopunkit (esim. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina) voidaan välttää. Ruoka jauhetaan desinfioinnin jälkeen, jotta se on helppo levittää maan pinnalle. Muita mahdollisia ravinnonlähteitä ovat leivontahiiva tai TetraMin®-kalanruoka.

Kasvatusolosuhteet ovat yleensä riittävän hyvät, jos madot eivät yritä poistua substraatista, madot liikkuvat maassa nopeasti, matojen ulkopinta on kiiltävä ja siihen on tarttunut maahiukkasia, madot ovat vaaleita ja näkyvissä on eri ikäisiä matoja. Matoja voidaan pitää terveinä, jos ne lisääntyvät jatkuvasti.

Valikoitua lisäviitemateriaalia

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W ja Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W ja Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.

▼M6

C.31. MAAKASVITESTI: ITÄVYYDEN JA ALKUKASVUN TESTAUS

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 208 (2006). Testimenetelmiä tarkastellaan säännöllisesti uudelleen tieteen kehityksen ja sääntelyyn sovellettavuuden perusteella. Tällä päivitetyllä testimenetelmällä arvioidaan kemikaalien mahdollisia vaikutuksia itävyyteen ja alkukasvuun. Tässä muodossa testi ei kata kroonisia vaikutuksia tai lisääntymiselle aiheutuvia vaikutuksia (eli vaikutuksia siementen ja kukkien muodostukselle tai hedelmien kypsymiselle). Altistusolosuhteet sekä testattavan kemikaalin ominaisuudet on otettava huomioon, jotta käytettävät testimenetelmät ovat asianmukaisia (esimerkiksi metalleja/metalliyhdisteitä testattaessa on otettava huomioon pH-arvon ja siihen liittyvien vastaioneiden vaikutukset) (1). Tämä testimenetelmä ei koske kasveja, jotka altistuvat kemikaalihöyryille. Testimenetelmää voidaan soveltaa yleisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja kasvinsuojeluaineiden (eli biosidien) testaamiseen. Testimenetelmä on kehitetty olemassaolevien menetelmien pohjalta (2), (3), (4), (5), (6), (7). Huomioon on otettu myös muuta kasvien testaamisen kannalta olennaista lähdekirjallisuutta (8), (9), (10). Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

2. Testillä arvioidaan maaperässä (tai muussa sopivassa kasvualustana toimivassa maa-aineksessa) olevan testikemikaalin aiheuttaman altistuksen vaikutuksia korkeampien kasvien itävyyteen ja varhaiseen kasvuun. Siemenet tuodaan kosketuksiin testikemikaalilla käsitellyn maa-aineksen kanssa ja vaikutuksia arvioidaan yleensä 14–21 vuorokauden kuluttua siitä, kun kontrolliryhmän siemenistä on itänyt 50 prosenttia. Mitatut loppupisteet ovat itävyyden silmämääräinen arviointi, versojen kuivapaino (vaihtoehtoisesti versojen tuorepaino) ja joissakin tapauksissa versojen korkeus sekä näkyvien haittavaikutusten arviointi kasvin eri osissa. Mittauksia ja havaintoja verrataan käsittelemättömistä kontrollikasveista tehtyihin.

3. Odotetun altistusreitin mukaan testikemikaali joko viedään maaperän (tai mahdollisesti kasvualustana toimivan keinomaan) sisään tai sitä levitetään maan pinnalle sen mukaan, kumpi edustaa todenmukaisemmin mahdollista altistumisreittiä kemikaalille. Maaperän sisään vieminen tehdään käsittelemällä ritsosfääriin kuulumatonta maa-ainesta. Kemikaalin lisäämisen jälkeen maa-aines siirretään ruukkuihin, minkä jälkeen tutkittavan kasvilajin siemenet kylvetään maa-ainekseen. Pintalevitys tehdään ruukuissa olevalle maa-ainekselle, johon siemenet on jo kylvetty. Testiyksiköt (kontrollit ja käsitellyt maa-ainekset sekä siemenet) sijoitetaan tämän jälkeen sopiviin, kasvien itämistä/kasvua tukeviin olosuhteisiin.

4. Testi voidaan tehdä halutun tarkoituksen mukaan annosvastekäyrän määrittämiseksi tai raja-annostestinä käyttämällä vain yhtä pitoisuutta/tasoa. Jos yhdellä pitoisuudella/tasolla tehdyn testin tulokset ylittävät tietyn myrkyllisyystason (esimerkiksi kun havaitaan yli x prosentin vaikutuksia), tehdään pitoisuusalueen määritystesti, jonka avulla määritellään myrkyllisyyden ylä- ja alarajat, minkä jälkeen laaditaan annosvastekäyrä toistamalla testi usealla pitoisuudella/tasolla. Sopivalla tilastollisella analyysilla saadaan vaikuttava pitoisuus (effective concentration) EC_x tai vaikuttava käyttömäärä (effective application rate) ER_x (esimerkiksi EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) yhdelle tai useammalle herkimmälle tutkittavalle parametrille. Testissä voidaan lisäksi laskea pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) sekä pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

5. Seuraavien tietojen avulla voidaan tunnistaa kemikaalin odotettavissa oleva altistusreitti ja helpottaa koejärjestelyn suunnittelua: rakennekaava,

▼M6

puhtaus, vesiliukoisuus, liukoisuus orgaanisiin liuottimiin, 1-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin, maaperän sorptiokäyttäytyminen, höyrynpaine, kemiallinen stabiilisuus vedessä ja valossa sekä biohajoavuus.

TESTIN VALIDITEETTI

6. Jotta testi olisi luotettava, kontrollin on täytettävä seuraavat kriteerit:

— itävyys on vähintään 70 prosenttia;

— taimissa ei ole näkyviä fytotoksisia vaikutuksia (esimerkiksi kloroosia, nekroosia, kuihtumista, lehtien ja versojen epämuodostumia) ja kasveissa ilmenee vain kyseiselle lajille tavanomaista kasvussa ja morfologiassa tapahtuvaa vaihtelua;

— itäneiden kontrollitaimien keskimääräinen eloonjääneisyys on vähintään 90 prosenttia koko tutkimuksen ajan;

— yksittäisen lajin ympäristöolosuhteet ovat identtiset ja kasvualustassa on yhtä paljon samasta lähteestä peräisin olevaa maa-ainesta, tukiainetta tai substraattia.

VERTAILUKEMIKAALI

7. Vertailukemikaalin säännöllisin väliajoin tapahtuvalla testaamisella voidaan todeta, että testin toimivuus, tiettyjen testikasvien vaste tai testiolosuhteet eivät ole merkittävästi muuttuneet ajan myötä. Vaihtoehtoisesti testijärjestelmän toimivuutta tietyissä laboratoriossa voidaan arvioida mittaamalla kontrollien historiallista biomassaa tai kasvua, mikä toimii myös laboratorion sisäisenä laadunvalvontatoimenpiteenä.

MENETELMÄN KUVAUS

Luonnollinen maaperä – Keinotekoinen substraatti

8. Kasveja voidaan kasvattaa ruukuissa, joissa käytetään hiekkapitoista hiesua, savista hiekkaa tai hiekkapitoista savimultaa, joka sisältää enintään 1,5 prosenttia orgaanista hiiltä (noin kolme prosenttia orgaanista ainesta). Kaupallisesti myytävää kukkamultaa tai synteettistä maaperäseosta voidaan myös käyttää, kunhan se sisältää enintään 1,5 prosenttia orgaanista hiiltä. Savimaata ei käytetä, jos tiedossa on, että testikemikaalin affiniteetti saveen on suuri. Peltomaa homogenisoidaan ja karkeat hiukkaset poistetaan seulomalla 2 mm:n raekokoon. Valmiista lopullisesta maaperästä ilmoitetaan tyyppi ja rakenne, orgaanisen hiilen pitoisuus prosentteina, pH-arvo sekä suolapitoisuus sähkönjohtavuutena. Maaperä luokitellaan tavanmukaisen luokittelujärjestelmän mukaan (11). Maaperä voidaan pastöroida tai lämpökäsitellä maaperän patogeenien vaikutuksen vähentämiseksi.

9. Luonnollinen maaperä saattaa vaikeuttaa tulosten tulkintaa ja lisätä vaihtelua fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä mikrobipopulaatioiden vaihtelevuuden vuoksi. Nämä muuttujat puolestaan muuttavat vedenpidätyskykyä, kemikaalien sitomiskykyä, tuulettumista sekä ravinne- ja hivenainepitoisuutta. Näiden fysikaalisten ominaisuuksien vaihtelun lisäksi vaihtelua on myös kemiallisissa ominaisuuksissa, kuten pH-arvossa ja hapetus-pelkistyspotentiaalissa, mikä saattaa vaikuttaa testikemikaalin biologiseen hyötyosuuteen (12), (13), (14).

10. Keinotekoisia substraatteja ei yleensä käytetä kasvinsuojeluaineiden testaamisessa, mutta niitä voidaan käyttää yleisten kemikaalien testaamisessa tai silloin, kun halutaan pitää luonnollisen maaperän käytöstä aiheutuva vaihtelu mahdollisimman pienenä ja lisätä testitulosten vertailukelpoisuutta. Käytettyjen substraattien on oltava inerttiä materiaalia, joiden vuorovaikutus testikemikaalin, kantoaineena toimivan liuottimen tai molempien kanssa on mahdollisimman pieni. Happopesty kvartsihiekka, mineraalivilla ja lasihelmet (halkaisijaltaan esimerkiksi 0,35–0,85 mm) on todettu riittävän inerteiksi materiaaleiksi, jotka absorboivat testikemikaalia mahdollisimman vähän (15), millä varmistetaan, että kemikaalia on mahdollisimman paljon

▼M6

taimen saatavana juuriston kautta. Käyttötarkoitukseen soveltumattomia substraatteja ovat vermikuliitti, perliitti ja muut erittäin imukykyiset materiaalit. Kasvin kasvuaan varten tarvitsemia ravinteita on oltava saatavilla, jotta kasvit eivät kärsi ravinteiden puutostiloista. Ravinteiden saantia on mahdollisuuksien mukaan arvioitava kontrollikasvien kemiallisella analyysillä tai silmämääräisellä arvioinnilla.

Testilajien valintakriteerit

11. Valittavien lajien olisi oltava keskenään riittävän erilaisia esimerkiksi levinneisyyden, yleisyyden, lajikohtaisten elinkaaren ominaisuuksien, luontaisen levinneisyysalueen sekä kasvikunnan taksonomisen monimuotoisuuden näkökulmasta, jotta vasteissa olisi vaihtelua (8), (10), (16), (17), (18), (19), (20). Valinnassa olisi otettava huomioon mahdollisten testilajien seuraavat ominaisuudet:

— lajilla on yhdenmukaisia siemeniä, joita on helposti saatavilla tavanomaisista, luotettavista siemenlähteistä ja joiden itävyys on johdonmukaista, luotettavaa ja tasaista, ja alkukasvu on yhdenmukaista;

— kasvi soveltuu laboratoriokokeisiin ja antaa luotettavia ja toistettavia tuloksia samassa testilaitoksessa sekä eri testilaitosten kesken;

— testattavan lajin herkkyys vastaa johdonmukaisesti kemikaalille alttiina olevassa ympäristössä tavattujen lajien vastetta;

— lajeja on käytetty aiemmissa myrkyllisyyskokeissa ja niiden käyttö esimerkiksi torjunta-aineiden biologisissa testeissä, raskasmetallien seulonnassa, suolapitoisuus- tai mineraalirasituskokeissa tai allelopatiatutkimuksissa osoittaa herkkyyttä monille erilaisille stressitekijöille;

— lajit sopivat testimenetelmän edellyttämiin kasvuolosuhteisiin;

— lajit täyttävät testin validiteettikriteerit.

Eräitä eniten käytettyjä testilajeja on lueteltu lisäyksessä 2 ja mahdollisia ravintokasveihin kuulumattomia lajeja lisäyksessä 3.

12. Testattavien lajien määrä riippuu sovellettavista sääntelyvaatimuksista, minkä vuoksi määrään ei oteta kantaa tämän testimenetelmän yhteydessä.

Testikemikaalin lisääminen

13. Kemikaalia lisätään sopivaan kantaja-aineeseen (esimerkiksi vesi, asetoni, etanoli, polyeteeniglykoli, arabikumi tai hiekka). Testattavaksi sopivat myös seokset (kaupallisesti saatavat tuotteet tai valmisteet), jotka sisältävät aktiivisia ainesosia ja erilaisia apuaineita.

Maa-aineksen / keinotekoisen substraatin sisään vieminen

14. Vesiliukoiset tai veteen suspendoituneet kemikaalit voidaan lisätä veteen, minkä jälkeen liuos sekoitetaan maa-ainekseen sopivalla sekoituslaitteella. Tämäntyyppinen testaaminen voi olla tarpeen, jos altistuminen kemikaalille tapahtuu maaperän tai maaperän huokosveden kautta ja tutkittavana seikkana on imeytyminen juuriin. Testikemikaalia lisäämällä ei pidä ylittää maa-aineksen vedenpidätyskykyä. Lisätyn veden määrän on oltava sama kaikille testipitoisuuksille, mutta sitä on rajoitettava, jotta maaperän sidosaineet eivät paakkuunnu.

▼M6

15. Heikosti veteen liukenevat kemikaalit liuotetaan sopivaan haihtuvaan liuottimeen (esimerkiksi asetoniin tai etanoliin) ja sekoitetaan hiekkaan. Liuotin voidaan tämän jälkeen poistaa hiekasta ilmavirralla, kun hiekkaa samalla sekoitetaan jatkuvasti. Käsitelty hiekka sekoitetaan testissä käytettävään maa-ainekseen. Toiseen kontrolliin lisätään vain hiekkaa ja liuotinta. Kaikkiin käsittelytasoihin sekä toiseen kontrolliin lisätään yhtä paljon hiekkaa, johon liuotin on sekoitettu ja josta se on poistettu. Kiinteät, liukenemattomat testikemikaalit sekoitetaan kuivaan maa-ainekseen sopivalla sekoituslaitteella. Tämän jälkeen maa-aines lisätään ruukkuihin ja siemenet kylvetään välittömästi.

16. Jos maa-aineksen sijasta käytetään keinotekoista substraattia, vesiliukoiset kemikaalit voidaan liuottaa ravinneliuokseen juuri ennen testin aloittamista. Kemikaalit, jotka eivät liukene veteen, mutta jotka voidaan suspendoida veteen kantoaineena toimivan liuottimen avulla, lisätään kantoaineen kanssa ravinneliuokseen. Veteen liukenemattomat kemikaalit, joille ei ole olemassa myrkytöntä vesiliukoista kantoainetta, liuotetaan sopivaan haihtuvaan liuottimeen. Liuos sekoitetaan hiekkaan tai lasihelmiin, sijoitetaan pyörivään tyhjiölaitteeseen ja haihdutetaan, jolloin hiekka tai helmet saavat tasaisen kemikaalipäällysteen. Punnittu määrä helmiä otetaan erilleen samaa orgaanista liuotinta käyttäen ja kemikaalin määrä analysoidaan ennen kylvöastioiden täyttämistä.

Pintalevitys

17. Kasvinsuojeluaineille testikemikaalin lisäysmenetelmänä käytetään usein maa-aineksen pinnan ruiskuttamista testiliuoksella. Kaikkien testissä käytettävien välineiden, mukaan lukien testikemikaalin valmistus- ja annosteluvälineet, on oltava malliltaan ja kapasiteetiltaan sellaisia, että näitä välineitä hyödyntävät testit voidaan tehdä täsmällisesti ja peittävyys on toistettavissa. Peittävyyden on oltava sama kaikilla maa-ainespinnoilla. Kemikaalien mahdollista adsorboitumista välineisiin tai reagoimista niiden kanssa (esimerkiksi käytettäessä muoviputkia ja lipofiilisiä kemikaaleja tai teräsosia ja alkuaineita) olisi vältettävä huolellisesti. Testikemikaalia ruiskutetaan maa-aineksen pinnalle simuloiden tavanomaisia levitystapoja ruiskusäiliötä käyttämällä. Ruiskutettavan määrän on yleensä oltava tavanomaisen maatalouskäytännön tasolla, ja määrät (esimerkiksi veden määrä) kirjataan muistiin. Suutin valitaan siten, että peittävyys on sama kautta koko maa-aineksen pinnan. Liuottimia ja kantoaineita käytettäessä perustetaan toinen kontrollikasvien ryhmä, jolle annetaan vain liuotinta/kantoainetta. Tämä ei kuitenkaan ole tarpeen silloin, kun testataan kasvinsuojeluaineita valmisteina.

Testikemikaalin pitoisuuden/tason toteaminen

18. Käytetyt pitoisuudet/tasot on vahvistettava tarkoitukseen sopivalla analyyttisellä todentamismenetelmällä. Kun käytetään liukoisia kemikaaleja, kaikki testipitoisuudet/-tasot voidaan todentaa analysoimalla pitoisuudeltaan suurin testissä käytettävä liuos sekä dokumentoimalla sen laimentaminen ja käyttämällä kemikaalin lisäämisessä kalibroituja välineitä (esimerkiksi kalibroituja analyysilaseja sekä kalibroituja ruiskutusvälineitä). Liukenemattomia kemikaaleja käytettäessä seosmateriaalin todentaminen tehdään ilmoittamalla maa-ainekseen lisätyn testikemikaalin paino. Mahdollista homogeenisuuden osoittamista varten voidaan tarvita maa-aineksen analyysi.

MENETTELY

Testijärjestely

19. Saman kasvilajin siemenet kylvetään ruukkuihin. Ruukkua kohti kylvettävien siementen lukumäärä riippuu lajista, ruukun koosta ja testin kestosta. Yhdessä ruukussa olevien kasvien määrän olisi tarjottava riittävät kasvuolosuhteet siten, ettei ruukku käy liian ahtaaksi testin kuluessa. Kasvien enimmäistiheys on noin 3–10 siementä 100 cm^2:ä kohti siementen koon mukaan. Viidentoista senttimetrin ruukkuun suositellaan esimerkiksi yhtä tai kahta maissin, soijapavun, tomaatin, kurkun tai sokerijuurikkaan tainta,

▼M6

kolmea rapsin tai herneen tainta tai 5–10:tä pientä siementä, kuten sipulin tai vehnän siementä. Siementen ja rinnakkaisnäyteruukkujen lukumäärän (yksi rinnakkaisnäyte tarkoittaa yhtä ruukkua, eikä samassa ruukussa olevia kasveja siis lasketa rinnakkaisnäytteiksi) olisi oltava riittävä optimaalista tilastollista analyysia varten (21). On syytä huomata, että vaihtelu on suurempaa testilajeilla, joista kylvetään muutama suuri siemen ruukkua kohti (rinnakkaisnäyte), kuin lajeilla, joita voidaan kylvää suurempi määrä pieniä siemeniä ruukkua kohti. Vaihtelua saadaan vähennettyä kylvämällä jokaiseen ruukkuun yhtä monta siementä.

20. Kontrolliryhmien avulla varmistetaan, että havaitut vaikutukset ovat yhteydessä vain testikemikaalille tapahtuvaan altistukseen tai johtuvat siitä. Asianmukainen kontrolliryhmä on joka suhteessa identtinen testiryhmän kanssa testikemikaalille altistusta lukuun ottamatta. Kaikkien samassa testissä käytettävien testikasvien, mukaan lukien kontrollit, on oltava peräisin samasta lähteestä. Tulosten vääristymisen välttämiseksi testi- ja kontrolliruukut on määriteltävä satunnaisesti.

21. Hyönteismyrkyllä tai sienitautien torjunta-aineella käsiteltyjen siementen (eli peitattujen siementen) käyttöä on vältettävä. Eräiden maiden sääntelyviranomaiset kuitenkin sallivat tiettyjen muiden kuin systeemisten kosketusvaikutteisten sienitautien torjunta-aineiden (esimerkiksi kaptaanin ja tiraamin) käytön (22). Jos on syytä epäillä siementen välityksellä kulkeutuvia patogeenejä, siemenet voidaan upottaa lyhyeksi aikaa 5-prosenttiseen hypokloriittiliuokseen, minkä jälkeen ne huuhdellaan huolellisesti juoksevassa vedessä ja kuivataan. Jälkikäsittely muilla kasvinsuojeluaineilla on kielletty.

Testiolosuhteet

22. Testiolosuhteiden on oltava mahdollisimman lähellä testattavien lajien ja lajikkeiden normaalisti edellyttämiä kasvuolosuhteita (esimerkkejä testiolosuhteista on lisäyksessä 4). Itäviä kasveja olisi hoidettava hyvän puutarhanhoidon käytäntöjen mukaisesti ympäristöolosuhteiltaan säädeltävissä kasvatuskammioissa, fytotroneissa tai kasvihuoneissa. Kasvatustiloja käytettäessä näihin käytäntöihin kuuluu yleensä ainakin seuraavien valvonta ja riittävän säännöllinen kirjaaminen (esimerkiksi päivittäin): lämpötila, kosteus, hiilidioksidipitoisuus, valo (voimakkuus, aallonpituus, fotosynteesille suotuisa aallonpituusalue), valoisa aika sekä kastelutapa. Näin varmistetaan kasvien hyvä kasvu, jota voidaan arvioida valittuja lajeja edustavien kontrollikasvien avulla. Kasvihuoneiden lämpötilaa säädellään tuuletus-, lämmitys- ja/tai jäähdytysjärjestelmän avulla. Kasvihuoneessa tapahtuvaa testaamista varten suositellaan yleisesti seuraavanlaisia olosuhteita:

— lämpötila: 22 °C ± 10 °C;

— kosteus: 70 % ± 25 %;

— valoisa aika: vähintään 16 tuntia valoa;

— valovoima: 350 ± 50 μE/m_2/s. Lisävalaistusta saatetaan tarvita, jos valovoima laskee alle 200 μE/m^2/s:iin ja aallonpituus alle 400–700 nm:iin, paitsi eräillä lajeilla, jotka tarvitsevat vähemmän valoa.

Ympäristöolosuhteita valvotaan ja ne kirjataan muistiin tutkimuksen ajan. Kasvatusruukkujen on oltava lasitettuja tai muuta kuin huokoista muovia,

▼M6

ja ruukun alle tulee lautanen. Ruukkujen sijaintia voidaan muuttaa määräajoin, jotta kasvien kasvussa ilmenevä vaihtelu jää mahdollisimman pieneksi (sillä kasvatustiloissa vallitsevissa testiolosuhteissa on eroja). Ruukkujen on oltava niin suuria, että normaali kasvu on mahdollista.

23. Kasvien elinvoiman ylläpitämiseksi maa-ainekseen voidaan tarvittaessa lisätä ravinteita. Lisäravinteiden tarpeesta ja ajoituksesta päätetään kontrollikasveja tarkkailemalla. Suositeltavaa on kastella testiruukut pohjan kautta (esimerkiksi lasikuituisen kastelulangan avulla). Aluksi ruukkuja voidaan kuitenkin kastella päältä, jotta siementen itäminen nopeutuu. Jos testikemikaalia on levitetty maa-aineksen pintaan, kasteluvesi helpottaa kemikaalin tunkeutumista maa-ainekseen.

24. Valittujen kasvuolosuhteiden olisi oltava testattavalle lajille ja tutkittavalle testikemikaalille sopivat. Kontrollikasvit ja käsitellyt kasvit pidetään samoissa ympäristöolosuhteissa, mutta eri tavoin käsiteltyjen kasvien välinen ristialtistus sekä kontrollikasvien altistuminen testikemikaalille (esimerkiksi haihtuvia kemikaaleja käytettäessä) on estettävä riittävin toimenpitein.

Testaaminen yhdellä pitoisuudella/tasolla

25. Yhdellä pitoisuudella tai tasolla testaamiseen (altistuskoe/raja-annostesti) sopivan kemikaalin pitoisuuden/tason määrittämisessä on otettava huomioon useita tekijöitä. Yleisiä kemikaaleja testattaessa näitä ovat esimerkiksi kemikaalin fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet. Kasvinsuojeluaineita testattaessa on otettava huomioon testikemikaalin fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet ja käyttötapa, suurin pitoisuus tai käyttötaso, käyttökertojen määrä kasvukautta kohti ja/tai testikemikaalin pysyvyys. Kun halutaan selvittää, onko yleisellä kemikaalilla fytotoksisia ominaisuuksia, saattaa olla tarpeen tehdä testi enimmäistasolla 1 000 mg yhdessä kilogrammassa kuivaa maa-ainesta.

Pitoisuusalueen määritystesti

26. Tarvittaessa voidaan tehdä pitoisuusalueen määritystesti, joka auttaa selvittämään lopullisessa annosvastetutkimuksessa testattavat pitoisuudet/tasot. Pitoisuusalueen määritystestissä käytetään kaukana toisistaan olevia pitoisuuksia (esimerkiksi 0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg yhdessä kilogrammassa kuivaa maa-ainesta). Kasvinsuojeluaineiden pitoisuudet/tasot voivat perustua suositeltuun tai suurimpaan pitoisuuteen tai käyttötasoon ja olla esimerkiksi 1/100, 1/10 ja 1/1 suositellusta tai suurimmasta pitoisuudesta tai käyttötasosta.

Testaaminen useammalla pitoisuudella/tasolla

27. Testillä, jossa käytetään useita pitoisuuksia/tasoja, todetaan sääntelyviranomaisten edellyttämällä tavalla annosvastesuhde ja määritetään EC_x- tai ER_x-arvo itävyydelle, biomassalle ja/tai silmämääräisesti havaittaville vaikutuksille verrattuna kontrolleihin, joita ei ole altistettu testikemikaalille.

28. Pitoisuuksien tai tasojen lukumäärän ja välimatkojen on oltava riittäviä luotettavan annosvastesuhteen määrittämiseen ja regressioyhtälön muodostamiseen sekä EC_x- ja ER_x-arvojen arviointiin. Valittujen pitoisuuksien/tasojen on katettava määritettävät EC_x- tai ER_x-arvot. Jos esimerkiksi halutaan saada selville EC_{50}-arvo, on suotavaa tehdä testi tasoilla, jotka tuottavat 20–80 prosentin vaikutuksen. Tuloksen saamiseksi suositellaan käytettävän vähintään viittä geometrisessa sarjassa olevaa pitoisuutta/tasoa, joiden etäisyyden määrittävä kerroin on enintään kolme, sekä käsittelemätöntä kontrollia. Rinnakkaisnäytteiden määrän kaikissa käsittely- ja kontrolliryhmissä on oltava vähintään neljä, ja siemeniä on oltava ainakin 20 kappaletta. Tietyille kasveille, joiden itävyys on heikko tai kasvutavassa esiintyy

▼M6

paljon vaihtelua, voidaan tarvita enemmän rinnakkaisnäytteitä, jotta testin tilastollinen voima paranee. Rinnakkaisnäytteiden määrää voidaan vähentää, jos testipitoisuuksia/tasoja on enemmän. NOEC-arvon arvioinnissa riittävä tilastollinen voima saattaa edellyttää useampia rinnakkaisnäytteitä (23).

Havainnot

29. Tarkkailujakson aikana eli 14–21 päivän kuluessa siitä, kun 50 prosenttia kontrollikasveista (tarvittaessa myös liuotinkontrolleista) on itänyt, kasveja tarkkaillaan säännöllisesti (vähintään viikoittain, mutta mieluiten päivittäin) itämisen, silmämääräisesti havaittavan fytotoksisuuden sekä kuolleisuuden havaitsemiseksi. Testin lopussa kirjataan muistiin mitattu itävyysprosentti, elossa olevien kasvien biomassa sekä kasvin eri osissa näkyvät haittavaikutukset, joita ovat esimerkiksi poikkeamat itäneiden taimien ulkonäössä, kloroosi, värimuutokset, kuolleisuus sekä vaikutukset kasvin kehitykseen. Lopullinen biomassa voidaan mitata elossa olevien kasvien versojen lopullisesta keskimääräisestä kuivapainosta keräämällä versot maan pintaa myöten ja kuivaamalla ne vakiopainoon 60 asteen lämpötilassa. Vaihtoehtoisesti lopullinen biomassa voidaan mitata versojen tuorepainosta. Toinen päätepiste on esimerkiksi versojen korkeus, jos sääntelyviranomaiset tätä edellyttävät. Havaittavien toksisten vasteiden arvioinnissa käytetään yhtenäistä silmämääräisten vaurioiden pisteytysjärjestelmää. Esimerkkejä kvalitatiivisten ja kvantitatiivisten silmämääräisten luokitusten tekemisestä on lähdeteoksissa (23), (24).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tilastoanalyysi

Yhden pitoisuuden/tason testi

30. Kutakin kasvilajia koskevat tiedot analysoidaan sopivalla tilastollisella menetelmällä (21). Kasvilajista ilmoitetaan vaikutuksen taso testipitoisuudella/-tasolla tai se, että tiettyä vaikutusta ei tapahtunut testipitoisuudella/-tasolla (esimerkiksi < *x* prosentin vaikutus havaittiin *y*-pitoisuudella tai tasolla).

Usean pitoisuuden/tason testi

31. Annosvastesuhde määritetään regressioyhtälöllä. Tässä voidaan käyttää erilaisia malleja: esimerkiksi EC_x:n tai ER_x:n (esim. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) sekä ER_x:n itävyyden luottamusvälien arviointiin dikotomisena tietona sopivat esimerkiksi logitti-, probitti- tai Weibull-menetelmät, Spearmanin ja Kärberin menetelmä tai viritetty Spearmanin ja Kärberin menetelmä. Taimien kasvun (painon ja pituuden) jatkuvina loppupisteinä EC_x:ää tai ER_x:ää ja sen luottamusvälejä voidaan arvioida sopivalla regressioanalyysilla (esimerkiksi Bruce-Versteegin epälineaarinen regressioanalyysi (25)). R^2:n pitäisi herkimmille lajeille olla mahdollisuuksien mukaan 0,7 tai enemmän ja käytettyjen testipitoisuuksien/-tasojen käsittää 20 %:n ja 80 %:n vaikutukset. NOEC-arvoa arvioitaessa kiinnitetään huomiota ennen kaikkea testin voimaan, ja testien valintaperusteena on tiedon hajonta (21), (26).

Testiraportti

32. Testiraportista käyvät ilmi tutkimusten tulokset, minkä lisäksi siinä kuvataan yksityiskohtaisesti testiolosuhteet, pohditaan tuloksia huolellisesti, analysoidaan tiedot ja tehdään johtopäätöksiä analyysin pohjalta. Tulokset esitetään myös taulukkomuotoisena yhteenvetona ja tiivistelmänä. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

▼**M6**

Testikemikaali:

— kemikaalin tunnistetiedot, testatun kemikaalin testin kannalta olennaiset ominaisuudet (esimerkiksi log P_{ow}, vesiliukoisuus ja höyrynpaine sekä tietoa kulkeutumisesta ja käyttäytymisestä ympäristössä, jos näitä on saatavilla);

— kuvaus testiliuoksen valmistuksesta sekä testipitoisuuksien vahvistamisesta 18 kohdassa mainitulla tavalla.

Testilajit:

— testiorganismin tiedot: laji/lajike, kasvisuku, tieteellinen nimi ja yleisnimi, siementen lähde ja historia mahdollisimman tarkasti (siis esimerkiksi toimittajan nimi, prosentuaalinen itävyys, siementen kokoluokka, eränumero, siementen vuosiluku tai kasvukausi, jolloin ne on kerätty, itävyysluokituksen päiväys ja elinkelpoisuus);

— testattujen yksi- ja kaksisirkkaisten lajien lukumäärä;

— perustelut lajien valinnalle;

— kuvaus siementen varastoinnista, käsittelystä ja hoidosta.

Testiolosuhteet:

— testauslaitos (esimerkiksi kasvatuskaappi, fytotroni tai kasvihuone);

— testijärjestelmän kuvaus (esimerkiksi ruukkujen mitat ja materiaali sekä maa-aineksen määrä);

— maa-aineksen ominaisuudet (maa-aineksen rakenne tai tyyppi: maa-aineshiukkasten jakautuminen ja luokitus, fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, mukaan lukien orgaanisen aineksen osuus, orgaanisen hiilen osuus ja pH-arvo);

— maa-aineksen tai substraatin (esimerkiksi maa-aineksen, keinomaan, hiekan tai muun) valmistelutoimet ennen testiä;

— ravinneliuoksen kuvaus, jos sellaista on käytetty;

— testikemikaalin käyttö: applikointimenetelmän kuvaus, käytettyjen välineiden kuvaus, altistustasot ja -määrät, mukaan lukien kemikaalien todentaminen, kalibrointimenetelmän kuvaus sekä kuvaus ympäristöolosuhteista applikoinnin aikana;

— kasvuolosuhteet: valon voimakkuus (esimerkiksi fotosynteesille suotuisa aallonpituusalue (PAR)), valoisa aika, enimmäis- ja vähimmäislämpötilat, kasteluaikataulu ja -menetelmä, lannoittaminen;

— yhteen ruukkuun kylvettyjen siementen lukumäärä, kasvien lukumäärä annosta kohti, rinnakkaisnäytteiden (ruukkujen) määrä altistustasoa kohti;

— kontrollien tyyppi ja lukumäärä (negatiiviset ja/tai positiiviset kontrollit, mahdollinen liuotinkontrolli);

— testin kesto.

Tulokset:

— taulukko kaikista loppupisteistä kunkin rinnakkaisnäytteen osalta, testipitoisuus/-taso ja laji;

— itäneiden siementen lukumäärä ja prosenttiosuus kontrolleihin verrattuna;

— biomassaa koskevat mittaukset: kasvien versojen kuivapaino tai tuorepaino prosenttiosuutena kontrolleista;

▼M6

— kasvien versojen pituus prosenttiosuutena kontrolleista, jos mitattu;

— silmämääräisten vaurioiden prosenttiosuus sekä kvalitatiivinen ja kvantitatiivinen kuvaus testikemikaalin aiheuttamista silmämääräisistä vaurioista (kloroosi, nekroosi, kuihtuminen, lehtien ja versojen epämuodostumat tai tieto siitä, että mitään vaikutuksia ei ollut) kontrollikasveihin verrattuna;

— kuvaus silmämääräisten vaurioiden arvioinnissa käytetystä asteikosta, jos silmämääräistä arviointia käytetään;

— yksittäisen tason tutkimuksista ilmoitetaan vaurioiden prosenttiosuus;

— EC_x- tai ER_x-arvot (esimerkiksi EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) sekä niiden luottamusvälit. Regressioanalyysia käytettäessä ilmoitetaan regressioyhtälön keskivirhe sekä yksittäisten parametrien (esimerkiksi kaltevuuden tai vakiotermin) estimoinnin keskivirhe;

— NOEC- ja LOEC-arvot, jos ne on laskettu;

— kuvaus tilastollisista menetelmistä ja käytetyistä olettamuksista;

— edellä mainittujen tietojen sekä testattujen lajien annosvastesuhteen esitys graafisessa muodossa.

Lisäksi ilmoitetaan poikkeukset tässä testimenetelmässä kuvatuista menettelyistä ja kaikki testin aikana ilmenneet epätavallisuudet.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189–193.

(2) International Organisation of Standards (ISO). (1993). ISO 11269-1. Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 1: Method for the Measurement of Inhibition of Root Growth.

(3) International Organisation of Standards (ISO). (1995). ISO 11269-2. Soil Quality - Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora – Part 2: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background – Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms – A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzensc-hutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. Teoksessa: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, s. 163–206.

(13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571–575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247–250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assess-ment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161–1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349–369.

(18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255–271.

(19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155–271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxi-col. Chem. 19 (10): 2532–2541.

(21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Sta-tistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1–63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386–389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. Teoksessa: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science So-ciety, Auburn, 15–23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Model-ling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485–1492.

(26) Tämän liitteen luku C.33. Lisääntymistesti lieroilla (*Eisenia fetida/Eisenia andrei)*.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät

Tehoaine tai aktiivinen ainesosa: Aine, joka on suunniteltu tuottamaan tietyn biologisen vaikutuksen (esimerkiksi hyönteisten rajoitttaminen, kasvitautien hallinta, rikkakasvien hallinta käsittelyalueella). Kutsutaan myös teknistä laatua olevaksi tehoaineeksi tai aktiiviseksi aineeksi.

Kemikaali: aine tai seos.

Kasvinsuojeluaine tai torjunta-aine: aine, jonka tiettyä biologista aktiivisuutta käytetään tarkoituksellisesti suojelemaan kasveja tuholaisilta (esimerkiksi sienitaudeilta, hyönteisiltä ja kilpailijakasveilta).

EC_x, x prosenttia vaikutuspitoisuudesta tai ER_x, x prosenttia vaikutustasosta: pitoisuus tai taso, joka saa aikaan x prosentin suuruisen epätoivottavan muutoksen testin loppupisteessä kontrolliin verrattuna (esimerkiksi 25 tai 50 prosentin vähenemä itävyydessä, versojen painossa tai jäljelle jääneiden kasvien määrässä taikka samansuuruinen silmämääräisten vaurioiden lisääntyminen on EC_{25}/ER_{25} tai EC_{50}/ER_{50}).

Itäminen: itutupen tai sirkkalehtien ilmestyminen maanpinnalle.

Valmiste: Kaupallisesti valmistettu tuote, joka sisältää tehoainetta (vaikuttavaa ainesosaa). Kutsutaan myös lopulliseksi valmisteeksi [1] tai tyypilliseksi loppukäyttötuotteeksi.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla vaikutus havaitaan. Tässä testissä LOEC-arvoa vastaavalla pitoisuudella on tilastollisesti merkittävä vaikutus ($p < 0,05$) tietyn altistusajan kuluessa kontrolliin verrattuna ja se on suurempi kuin NOEC-arvo.

Muut kuin kohdekasvit: Kasvit, jotka eivät ole kohteena olevalla alueella. Kasvinsuojeluaineiden yhteydessä tällä tarkoitetaan yleensä käsittelyalueen ulkopuolella olevia kasveja.

NOEC (No Observed Effect Concentration, pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia): Testikemikaalin suurin pitoisuus, josta ei ole havaittavaa vaikutusta. Tässä testissä NOEC-arvoa vastaavalla pitoisuudella ei ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta ($p < 0,05$) tietyn altistusajan kuluessa kontrolliin verrattuna.

Fytotoksisuus: haitalliset poikkeamat (mitatut ja silmämääräisesti arvioidut) kasvien normaalista ulkonäöstä ja kasvusta tietyn kemikaalin vuoksi.

Rinnakkaisnäyte: Kokeellinen yksikkö, joka edustaa kontrolliryhmää ja/tai käsittelyryhmää. Tässä tutkimuksessa rinnakkaisnäyte on yksi ruukku.

Silmämääräinen arviointi: silmämääräisten vaurioiden arviointi kasvin asennosta, elinvoimasta, epämuodostumista, kloroosista, nekroosista ja yleisestä ulkonäöstä tehtyjen havaintojen perusteella kontrolliin verrattuna.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

[1] Lopullinen valmiste: tehoainetta (vaikuttavaa ainesosaa) sisältävä kaupallisesti myytävä valmiste.

▼**M6**

Lisäys 2

Luettelo kasvikokeissa historiallisesti käytetyistä lajeista

Heimo	Laji	Yleisnimet
KAKSISIRKKAISET		
Sarjakukkaiskasvit	*Daucus carota*	Porkkana
Mykerökukkaiskasvit	*Helianthus annuus*	Auringonkukka
Mykerökukkaiskasvit	*Lactuca sativa*	Salaatti
Ristikukkaiskasvit	*Sinapis alba*	Keltasinappi
Ristikukkaiskasvit	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Kiinankaali
Ristikukkaiskasvit	*Brassica napus*	Rapsi
Ristikukkaiskasvit	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Keräkaali
Ristikukkaiskasvit	*Brassica rapa*	Nauris
Ristikukkaiskasvit	*Lepidium sativum*	Vihanneskrassi
Ristikukkaiskasvit	*Raphanus sativus*	Retiisi
Savikkakasvit	*Beta vulgaris*	Sokerijuurikas
Kurkkukasvit	*Cucumis sativus*	Kurkku
Hernekasvit	*Glycine max (G. soja)*	Soija
Hernekasvit	*Phaseolus aureus*	Mungopapu
Hernekasvit	*Phaseolus vulgaris*	Tarhapapu
Hernekasvit	*Pisum sativum*	Herne
Hernekasvit	*Trigonella foenum-graecum*	Sarviapila
Hernekasvit	*Lotus corniculatus*	Keltamaite
Hernekasvit	*Trifolium pratense*	Puna-apila
Hernekasvit	*Trifolium incarnatum*	Rehuvirna
Pellavakasvit	*Linum usitatissimum*	Pellava
Tatarkasvit	*Fagopyrum esculentum*	Tattari
Koisokasvit	*Solanum lycopersicon*	Tomaatti

▼**M6**

Heimo	Laji	Yleisnimet
YKSISIRKKAISET		
Liljakasvit	*Allium cepa*	Sipuli
Heinäkasvit	*Avena sativa*	Kaura
Heinäkasvit	*Hordeum vulgare*	Ohra
Heinäkasvit	*Lolium perenne*	Englanninraiheinä
Heinäkasvit	*Oryza sativa*	Riisi
Heinäkasvit	*Secale cereale*	Ruis
Heinäkasvit	*Sorghum bicolor*	Jyvädurra
Heinäkasvit	*Triticum aestivum*	Vehnä
Heinäkasvit	*Zea mays*	Maissi

▼M6

Lisäys 3

Luettelo mahdollisista ravintokasveihin kuulumattomista lajeista

OECD:n mahdolliset lajit kasvien myrkyllisyyskokeita varten

Huomautus: Seuraavassa taulukossa on tietoa 52:sta ravintokasveihin kuulumattomasta lajista (kutakin kohtaa koskevat kirjallisuusviitteet ilmoitetaan sulkeissa). Mainitut itävyysprosentit on saatu julkaistusta kirjallisuudesta, ja ne on tarkoitettu vain yleisohjeeksi. Yksittäiset kokemukset voivat vaihdella esimerkiksi siementen alkuperän ja muiden tekijöiden mukaan.

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika ([1]) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika ([2])	Kylvösyvyys (mm) ([3])	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) ([4])	Erikoiskäsittelyt ([5])	Myrkyllisyyskoe ([6])	Siementen toimittajat ([7])	Muut kirjallisuusviitteet ([8])
SARJAKUKKAISKASVIT *Torilis japónica* (Punakatko)	Y, K, kulutukselle alttiit alueet, pensasaidat, laidunmaat (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	V = P (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	kylmästratifiointi (7, 14, 18, 19), saattavat vaatia kypsymistä (19), pimeys estää itämisen (1, 19), ei erikoiskäsittelyitä (5)	JÄLKEEN (5)		
MYKERÖKUKKAISKASVIT *Bellis perennis* (Tuhatkauno)	P niityt, nurmet, viljelysmaat	0,09–0,17 (4, 19)	V = P (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	säteily ei vaikuta itävyyteen (18, 19), ei erikoiskäsittelyitä (4, 14)	JÄLKEEN (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (Ruiskaunokki)	Y pellot, pientareet, avoimet kasvupaikat (16)	4,1–4,9 (4, 14)	V = P (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	ei erikoiskäsittelyitä (2, 4)	JÄLKEEN (2, 4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (Mustakaunokki)	P pellot, pientareet, avoimet kasvupaikat (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	saattavat vaatia kypsymistä (18, 19), pimeys estää itämisen (19), ei erikoiskäsittelyitä (5, 14, 26)	JÄLKEEN (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (Isohirvenjuuri)	P kosteat, kulutukselle alttiit paikat (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		ei erikoiskäsittelyitä (4)	JÄLKEEN (4)	A, F	

▼M6

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika ([1]) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika ([2])	Kylvösyvyys (mm) ([3])	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) ([4])	Erikoiskäsittelyt ([5])	Myrkyllisyyskoe ([6])	Siementen toimittajat ([7])	Muut kirjallisuusviitteet ([8])
Leontodon hispidus (Kesämaitiainen)	P pellot, pientareet, kulutukselle alttiit alueet (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	pimeys estää itämisen (17, 18, 19), ei erikoiskäsittelyitä (5, 23)	JÄLKEEN (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (Kesäpäivänhattu)	K, P, kulutukselle alttiit alueet (16)	0,3 (4, 14)	V = P (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	ei erikoiskäsittelyitä (4, 14, 33)	JÄLKEEN (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (Kanadanpiisku)	P laidunmaat, avoimet paikat (16)	0,06–0,08 (4, 14)	V = P (11)	0 (4)	14–21 (11)	sekoitetaan yhtä suureen määrään hiekkaa ja liotetaan gibberelliinihapossa (pitoisuus 500 ppm) 24 h ajan (11), ei erikoiskäsittelyitä (4)	JÄLKEEN (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (Sappiruoho)	Y pellot, avoimet kasvupaikat (16)	25–61 (14, 29)		0 (1) 5 (29)		pimeys saattaa estää itämisen (1), liotetaan lämpimässä vedessä 12 h ajan (29)	ENNEN JA JÄLKEEN (31)	A	
Xanthium spinosum (Piikkisappiruoho)	Y avoimet kasvupaikat (16)	200 (14)	V = P (14) V > P (6)	10 (6)		karheuttaminen (14), ei erikoiskäsittelyitä (6)	ENNEN JA JÄLKEEN (6)	A	
Xanthium strumarium (Karheasappiruoho)	Y pellot, avoimet kasvupaikat (16)	67,4 (14)	V = P (14)	10–20 (6, 21)		ei erikoiskäsittelyitä (6, 14, 21)	ENNEN JA JÄLKEEN (6, 21, 28, 31)	A	
RISTIKUKKAISKASVIT *Cardamine pratensis* (Luhtalitukka)	P pellot, pientareet, nurmet (16, 19)	0,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	pimeys estää itämisen (18, 19), ei erikoiskäsittelyitä (5, 14, 22)	JÄLKEEN (5, 22)	F	

▼M6

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika ([1]) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika ([2])	Kylvösyvyys (mm) ([3])	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) ([4])	Erikoiskäsittelyt ([5])	Myrkyllisyyskoe ([6])	Siementen toimittajat ([7])	Muut kirjallisuusviitteet ([8])
KOHOKKIKASVIT *Lychnis flos-cuculi* (Käenkukka)	P (16)	0,21 (14)	V = P (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	saattavat vaatia kypsymistä (18), ei erikoiskäsittelyitä (5, 14, 15, 22–26)	JÄLKEEN (5, 15, 22–26)	F	
SAVIKKAKASVIT *Chenopodium album* (Jauhosavikka)	Y pellonreunat, kulutukselle alttiit alueet (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	V = P (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	käsittelyt eroavat siementen värin mukaan (19), lepotilassa kuivavarastoinnin aikana (19), pimeys estää itämisen (1, 18, 19), kylmästratifiointi (18), ei erikoiskäsittelyitä (14, 34)	ENNEN JA JÄLKEEN (28, 31, 34)	A	32
KLUSIAKASVIT *Hypericum perforatum* (Mäkikuisma)	P pellot, viljelysmaat, avoimet kasvupaikat (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	V = P (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	pimeys estää itämisen (1, 18, 19) ei erikoiskäsittelyitä (5, 14, 15, 25, 27)	JÄLKEEN (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
KIERTOKASVIT *Ipomoea hederacea* (Liuskaelämänlanka)	Y pientareet, avoimet kasvupaikat, viljapellot (16)	28,2 (14)	V > P (6, 10)	10-20. (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	säteily ei vaikuta itävyyteen (1) ei erikoiskäsittelyitä (6, 21)	ENNEN JA JÄLKEEN (6, 12, 21, 28)	A	
SARAKASVIT *Cyperus rotundus* (–)	P viljelysmaat, laidunmaat, pientareet (16, 30)	0,2 (14)	V = P (14)	0 (1) 10–20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	pimeys estää itämisen (1) ei erikoiskäsittelyitä (6, 10, 14)	ENNEN JA JÄLKEEN (6, 28, 31)	K	7
HERNEKASVIT *Lotus corniculatus* Keltamaite	P niityt, pientareet, avoimet kasvupaikat (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	karheuttaminen (14, 19) säteily ei vaikuta itävyyteen (18, 19), ei erikoiskäsittelyitä (23, 25)	JÄLKEEN (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika (1) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika (2)	Kylvösyvyys (mm) (3)	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) (4)	Erikoiskäsittelyt (5)	Myrkyllisyyskoe (6)	Siementen toimittajat (7)	Muut kirjallisuusviitteet (8)
Senna obtusifolia (Soijasenna)	Y tuoreet metsät (16)	23–28 (9)	V = P (14) V > P (9)	10–20 (6, 9)		siemeniä liotetaan vedessä 24 h (9) karheuttaminen (14), siementen elinkelpoisuus riippuu väristä (1), ei erikoiskäsittelyitä (6)	JÄLKEEN (6, 9)	A	
Sesbania exaltata (–)	Y vesijättömaat (16)	11–13 (9, 14)	V > P (9)	10–20 (9, 21)		siemeniä liotetaan vedessä 24 h (9) säteily ei vaikuta itävyyteen (1), ei erikoiskäsittelyitä (21)	ENNEN JA JÄLKEEN (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (Puna-apila)	P pellot, pientareet, viljelysmaat (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	karheuttaminen (14, 18) saattavat vaatia kypsymistä (19), säteily ei vaikuta itävyyteen (1, 19), ei erikoiskäsittelyitä (5)	JÄLKEEN (5)	A, E, F	
HUULIKUKKAISKASVIT *Leonurus cardiaca* (Nukula)	P avoimet paikat (16)	0,75–1,0 (4, 14)	V = P (14)	0 (4)		ei erikoiskäsittelyitä (4, 14)	JÄLKEEN (4)	F	
Mentha spicata (Viherminttu)	P kosteikot (16)	2,21 (4)		0 (4)		ei erikoiskäsittelyitä (4)	JÄLKEEN (4)	F	
Nepeta cataria (Aitokissanminttu)	P kulutukselle alttiit alueet (16)	0,54 (4, 14)	V = P (14)	0 (4)		ei erikoiskäsittelyitä (2, 4, 14)	JÄLKEEN (2, 4)	F	

▼M6

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika ([1]) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika ([2])	Kylvösyvyys (mm) ([3])	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) ([4])	Erikoiskäsittelyt ([5])	Myrkyllisyyskoe ([6])	Siementen toimittajat ([7])	Muut kirjallisuusviitteet ([8])
Prunella vulgaris (Niittyhumala)	P peltomaat, niityt, kulutukselle alttiit paikat (16, 19)	0,58–1,2 (4, 14, 19)	V = P (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	pimeys estää itämisen (18, 19) suuret siemenet itävät paremmin (1), ei erikoiskäsittelyitä (4, 14, 22)	JÄLKEEN (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (Rohtopähkämö)	P niityt, pellonpientareet (19)	14–18 (14, 19)	V = P (14)		7 (50 %) (19)	ei erikoiskäsittelyitä (5, 14, 22)	JÄLKEEN (5, 22)	F	
MALVAKASVIT *Abutilón theophrasti* (–)	Y pellot, avoimet kasvupaikat (16)	8,8 (14)	V = P (14)	10-20. (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	karheuttaminen (14) ei erikoiskäsittelyitä (5, 10, 21)	ENNEN JA JÄLKEEN (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (Otasiida)	Y pellot, pientareet (16, 19)	3,8 (14)	V = P (14)	10–20 (6, 21)		karheuttaminen (14) säteily ei vaikuta itävyyteen (1), ei erikoiskäsittelyitä (6, 21)	ENNEN JA JÄLKEEN (6, 21, 28, 31)	A, F	
UNIKKOKASVIT *Papaver rhoeas* (Silkkiunikko)	Y pellot, viljelysmaat, kulutukselle alttiit paikat (16, 19)	0,1–0,3 (4, 14, 19, 29)	V = P (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	kylmästratifiointi ja karheuttaminen (1, 19, 32) ei erikoiskäsittelyitä (4, 14, 29)	JÄLKEEN (4)	A, D, E, F, G	
HEINÄKASVIT *Agrostis tenuis* (Nurmirölli)	nurmikot, laidunmaat (16)	0,07 (14)	V > P (HO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	pimeys estää itämisen (1, 17–19), ei erikoiskäsittelyitä (10)	JÄLKEEN (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (Rikkapuntarpää)	Y pellot, avoimet kasvupaikat (16)	0,9–1,6 (29, 34)	V = P (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	karheuttaminen (14), KNO_3-käsittely 101 mg/l (14), lämpöstratifiointi (1), pimeys estää itämisen (1), ei erikoiskäsittelyitä (34)	ENNEN JA JÄLKEEN (28, 34)	A	32

▼M6

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika ([1]) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika ([2])	Kylvösyvyys (mm) ([3])	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) ([4])	Erikoiskäsittelyt ([5])	Myrkyllisyyskoe ([6])	Siementen toimittajat ([7])	Muut kirjallisuusviitteet ([8])
Avena fatua (Hukkakaura)	Y viljelysmaat, avoimet kasvupaikat (16)	7–37,5 (14, 30)	V = P (14) V > P (6)	10–20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	karheuttaminen (7, 32), pimeys estää itämisen (1) kylmästratifiointi (1, 18), ei erikoiskäsittelyitä (6, 10, 14)	ENNEN JA JÄLKEEN (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (Kattokattara)	Y pellot, pientareet, viljelysmaat (16)	0,45–2,28 (14, 29)	V = P (14)	3 (29)		kypsymiskausi (1, 7, 32), valo estää itämisen (1), ei erikoiskäsittelyitä (14)	ENNEN JA JÄLKEEN (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (Otasukapää)	P pellot, pientareet, avoimet kasvupaikat (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	V = P (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	säteily ei vaikuta itävyyteen (19), ei erikoiskäsittelyitä (14, 29)	JÄLKEEN (5)	A	
Digitaria sanguinalis (Rikkaverihirssi)	Y pellot, nurmet, avoimet kasvupaikat (16)	0,52–0,6 (14, 30)	V = P (14)	10–20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	karheuttaminen, kylmästratifiointi ja kypsyminen (1, 7, 14, 32), KNO_3-käsittely 101 mg/l (14), pimeys estää itämisen (1), ei erikoiskäsittelyitä (21)	ENNEN JA JÄLKEEN (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (Rikkakananhirssi)	Y (16)	1,5 (14)	V = P (14) V > P (3)	10–20 (7, 21)		karheuttaminen (7, 23), säteily ei vaikuta itävyyteen (1), ei erikoiskäsittelyitä (3, 14, 21)	ENNEN JA JÄLKEEN (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (Kanadanvehnä)	P rannat, kulutukselle alttiit paikat (16)	4–5 (14, 30)	V = P (11)	1 (11)	14–28 (11)	ei erikoiskäsittelyitä (2, 11)	JÄLKEEN (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (Nurminata)	P pellot, kosteikot (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	V = P (14) V > P (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	ei erikoiskäsittelyitä (10, 19)	JÄLKEEN (10)	A	7

▼M6

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika ([1]) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika ([2])	Kylvösyvyys (mm) ([3])	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) ([4])	Erikoiskäsittelyt ([5])	Myrkyllisyyskoe ([6])	Siementen toimittajat ([7])	Muut kirjallisuusviitteet ([8])
Hordeum pusillum (–)	Y laidunmaat, pientareet, avoimet kasvupaikat (16)	3,28 (14)				lämpöstratifiointi (1), säteily ei vaikuta itävyyteen (1)	ENNEN (31)		7
Phieum pratense (Timotei)	P laidunmaat, viljelysmaat, kulutukselle alttiit paikat (16, 19)	0,45 (14, 19)	V > P (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	pimeys estää itämisen (19), säteily ei vaikuta itävyyteen (17), ei erikoiskäsittelyitä (10, 14, 17, 19)	JÄLKEEN (10)	A, E	
TATARKASVIT *Polygonum convolvulus* (Kiertotatar)	Y avoimet kasvupaikat, pientareet (16)	5–8 (4, 14, 29)	V = P (20)	0–2 (4, 29)		kylmästratifiointi 4–8 viikon ajan (1, 2, 4, 20, 29), säteily ei vaikuta itävyyteen (1)	ENNEN JA JÄLKEEN (1, 2, 20, 28, 31)	A	32
Polygonum lapathifolium (Ukontatar)	Y tuore maaperä (16)	1,8–2,5 (14)	V > P (6)		5 (94 %) (18)	säteily ei vaikuta itävyyteen (1), pimeys estää itämisen (18), kylmästratifiointi (1), ei erikoiskäsittelyitä (5)	ENNEN JA JÄLKEEN (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (–)	Y pellot, avoimet kasvupaikat (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		kylmästratifiointi 4 viikon ajan 0–5 °C:ssa (1, 29), pimeys estää itämisen (1)	ENNEN (31)	A, E	
Polygonum periscaria (Keiholehti)	Y kulutukselle alttiit alueet, viljelysmaat (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	V > P (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	karheuttaminen, kylmästratifiointi, GA-käsittely (14), kylmästratifiointi, kypsyminen (17–19), pimeys estää itämisen (19), ei erikoiskäsittelyitä (13)	JÄLKEEN (13)	A	32

▼M6

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika ([1]) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika ([2])	Kylvösyvyys (mm) ([3])	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) ([4])	Erikoiskäsittelyt ([5])	Myrkyllisyyskoe ([6])	Siementen toimittajat ([7])	Muut kirjallisuusviitteet ([8])
Rumex crispus (Poimuhierakka)	P viljelysmaat, pientareet, avoimet alueet (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	V = P (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	pimeys estää itämisen (18, 19), saattavat vaatia kypsymistä (18), ei erikoiskäsittelyitä (4, 14, 33)	JÄLKEEN (4, 33)	A, E	32
ESIKKOKASVIT *Anagallis arvensis* (Peltopunka)	Y peltomaat, avoimet alueet, kulutukselle alttiit paikat (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	V = P (14)		1 (50 %) (19)	kylmästratifiointi, GA-käsittely (1, 14, 18, 19, 32), itäminen edellyttää valoa (1), ei erikoiskäsittelyitä (2, 4)	JÄLKEEN (2, 4)	A, F	
LEINIKKIKASVIT *Ranunculus acris* (Niittyleinikki)	P viljelysmaat, pientareet, avoimet alueet (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	V = P (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	ei erikoiskäsittelyitä (5, 14, 22, 24–26)	JÄLKEEN (5, 22, 24–26)		32
RUUSUKASVIT *Geum urbanum* (Kyläkellukka)	P pensasaidat, kosteikot (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	pimeys estää itämisen (18, 19), lämpöstratifiointi (1), ei erikoiskäsittelyitä (5, 14, 22, 25, 26)	JÄLKEEN (5, 22, 25, 26)	A	
MATARAKASVIT *Galium aparine* (Kierumatara)	Y peltomaat, kosteikot, kulutukselle alttiit paikat (16, 19)	7–9 (14, 19)	V = P (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	kylmästratifiointi (1, 18, 19), säteily ei vaikuta itävyyteen (18, 19), valo estää itämisen (1), ei erikoiskäsittelyitä (6, 14)	ENNEN JA JÄLKEEN (6, 28)	A	32

▼M6

HEIMO Lajin tieteellinen nimi (suomenkielinen yleisnimi)	Elinaika (1) ja kasvupaikka	Siemenpaino (mg)	Itämistä tai kasvua varten tarvittava valoisa aika (2)	Kylvösyvyys (mm) (3)	Itämiseen kuluva aika (vuorokausina) (4)	Erikoiskäsittelyt (5)	Myrkyllisyyskoe (6)	Siementen toimittajat (7)	Muut kirjallisuusviitteet (8)
Galium mollugo (Saksanmatara)	P aidanvierustat, avoimet paikat (8)	7 (29)	V = P (14)	2 (29)		ei erikoiskäsittelyitä (5, 14, 22, 24, 26, 29)	JÄLKEEN (5, 22, 24, 26)	A	
NAAMAKUKKAISKASVIT *Digitalis purpurea* (Rohtosormustinkukka)	K, P pensasaidat, avoimet paikat (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	V = P (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	pimeys estää itämisen (1, 17–19), ei erikoiskäsittelyitä (4, 22–26)	JÄLKEEN (4, 22–26)	D, G, F	
Veronica persica (Persiantädyke)	Y peltomaat, avoimet alueet, kulutukselle alttiit paikat (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	V = P (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	pimeys estää itämisen (18, 19), kylmästratifiointi (18), ei erikoiskäsittelyitä (14)	ENNEN JA JÄLKEEN (28)	A	32

(1) Y = yksivuotiset, K = kaksivuotiset, P = perennat.
(2) Kirjallisuusviitteissä 11, 14 ja 33 mainitaan valon (V) ja pimeyden (P) suhde, jonka siementen itäminen vaatii. Kirjallisuusviitteissä 3, 6, 9, 10, 13, 20 kerrotaan kasvuolosuhteista kasvihuoneissa.
(3) ”0 mm” tarkoittaa, että siemenet kylvetään pintakylvönä tai että ne tarvitsevat valoa itääkseen.
(4) Ilmoitetut numerot tarkoittavat vuorokausia, joiden kuluessa tietty prosenttiosuus siemenistä iti mainitun kirjallisuusviitteen mukaan, esimerkiksi kolme vuorokautta (50 % itävyys) (viite 19).
(5) Kypsymisajan ja/tai stratifiointiajan kestoa ei ole kaikissa tapauksissa tiedossa. Kylmäkäsittelyä koskevia vaatimuksia lukuun ottamatta lämpötilaolosuhteita ei ole mainittu, sillä kasvihuoneessa tapahtuvassa testaamisessa lämpötilaa voi säätää vain tietyissä rajoissa. Useimmat siemenet itävät kasvihuoneissa esiintyvissä normaaleissa lämpötilavaihteluissa.
(6) Tarkoittaa, että lajia on käytetty rikkakasvien torjunta-aineilla joko ennen itämistä (ENNEN) ja/tai itämisen jälkeen (JÄLKEEN) tehtävissä kokeissa, joissa tutkitaan myrkyllisyyttä kasveille.
(7) Esimerkkejä kaupallisista siementen toimittajista.
(8) Tarkoittaa kahta vaihtoehtoista käytettyä lähdeteosta.

▼**M6**

Mainitut siementen toimittajat

Toimittajan tunniste	Toimittajan tiedot
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA +1 (727) 344-4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla – Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA +1 (519) 586 – 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA +1 (303) 431-7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA +1 (800) 873-3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA +1 (800) 274-7333 www.thompson-morgan.com

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271–285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349–369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669–677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. Teoksessa: Plants for toxicity assessment: 2_{nd} volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. s. 197–208.

▼**M6**

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481–486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC – Weeds. s. 151–156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Henkilökohtainen keskustelu. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769–776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189–1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21–28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555–558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017–1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34:453–459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227–232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71–86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223–235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25–42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283–293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369–388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. s. 1021–1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58:1161–1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA

(31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Henkilökohtainen keskustelu.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711–718.

▼**M6**

Lisäys 4

Esimerkkejä eräille ravintokasvilajeille sopivista kasvuolosuhteista

Seuraavat olosuhteet on todettu sopiviksi kymmenelle ravintokasvilajille, ja niitä voidaan käyttää ohjeena myös eräille toisille lajeille kasvatuskaapeissa tehtävissä testeissä:

Hiilidioksidipitoisuus: 350 ± 50 ppm;

Suhteellinen kosteus: 70 ± 5 % valoisana aikana ja 90 ± 5 % pimeänä aikana;

Lämpötila: 25 ± 3 °C päivällä, 20 ± 3 °C yöllä;

Valojaksot: 16 h valoa / 8 h pimeyttä, kun oletetaan, että keskimääräinen aallonpituus on 400–700 nm;

Valo: luminanssi 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$ kuvun huipulta mitattuna.

Ravintokasvilajit ovat:

— tomaatti (*Solanum lycopersicon*);

— kurkku (*Cucumis sativus*);

— salaatti (*Lactuca sativa*);

— soijapapu (*Glycine max*);

— kaali (*Brassica oleracea* var. *capitata*);

— porkkana (*Daucus carota*);

— kaura (*Avena sativa*);

— englanninraiheinä (*Lolium perenne*);

— maissi (*Zea mays*);

— sipuli (*Allium cepa*).

▼M6

C.32. LISÄÄNTYMISTESTI ÄNKYRIMADOILLA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 220 (2004). Menetelmä on tarkoitettu käytettäväksi arvioitaessa maaperässä olevien kemikaalien vaikutuksia änkyrimadon (*Enchytraeus albidus* Henle 1873) lisääntymiskykyyn. Menetelmä perustuu pääasiallisesti Saksan Umweltbundesamtin kehittämään (1), kansainvälisessä yhteistutkimuksessa käytettyyn menetelmään (2). Huomioon on otettu myös muita menetelmiä, joilla kemikaalien myrkyllisyyttä änkyrimadoille ja lieroille on testattu (3), (4), (5), (6), (7), (8).

ALUSTAVAT HUOMIOT

2. Maaperässä elävät Enchytraeus-suvun änkyrimadot ovat ekologisesti merkittäviä lajeja ympäristömyrkyllisyyden testaukseen. Änkyrimatoja tavataan usein maa-aineksessa, jossa on myös lieroja, mutta silti niitä saattaa olla runsaasti sellaisessakin maaperässä, jossa lieroja ei ole. Änkyrimatoja voidaan käyttää laboratoriokokeissa, osittaisissa kenttätutkimuksissa ja kokonaan kentällä tehtävissä tutkimuksissa. Käytännön näkökulmasta monet Enchytraeus-suvun lajit ovat helppoja käsitellä ja kasvattaa, ja niiden generaatioaika on huomattavasti lyhyempi kuin lieroilla. Änkyrimadoilla tehtävän lisääntymistestin kesto onkin vain 4–6 viikkoa, kun lieroilla (Eisenia fetida) se on 8 viikkoa.

3. Perustietoa änkyrimatojen ekologiasta ja ekotoksikologiasta maaympäristössä on lähteissä (9), (10), (11), (12).

TESTIN PERIAATE

4. Täysikasvuiset änkyrimadot altistetaan keinomaahan sekoitetun testikemikaalin eri pitoisuuksille. Testin kulku voidaan jakaa kahteen vaiheeseen: (a) pitoisuusalueen määritystesti (jos tietoa ei ole saatavilla riittävästi), jossa pääasiallinen tutkittava ominaisuus on kuolleisuus kahden viikon altistuksen jälkeen, sekä (b) varsinainen lisääntymistesti, jossa arvioidaan emoeläinten tuottamien poikasten kokonaismäärä ja emoeläinten eloonjääminen. Varsinaisen testin kesto on kuusi viikkoa. Ensimmäisen kolmen viikon jälkeen täysikasvuiset madot otetaan talteen ja niiden morfologiset muutokset kirjataan ylös. Seuraavan kolmen viikon jälkeen lasketaan täysikasvuisten tuottamista munakoteloista kuoriutuneiden jälkeläisten lukumäärä. Testikemikaalille altistuneiden eläinten lisääntymiskykyä verrataan kontrollieläinten vastaavaan tulokseen, jotta voidaan määrittää i) pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (no observed effect concentration, NOEC) ja/tai ii) EC_x (esimerkiksi EC_{10} ja EC_{50}) käyttämällä regressiomallia, jonka avulla arvioidaan pitoisuus, joka vähentää lisääntymiskykyä x prosenttia. Testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella (esimerkiksi EC_{10}, EC_{50}), jotta EC_x saadaan interpoloimalla eikä ekstrapoloimalla.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

5. Testikemikaalista pitäisi olla käytettävissä seuraavat tiedot: vesiliukoisuus, log K_{ow}, maa-vesi-jakaantumiskerroin (ks. esimerkiksi tämän liitteen luku C.18 tai C.19) sekä höyrynpaine. Lisätiedot testikemikaalin kulkeutumisesta maaperässä, kuten fotolyysi- ja hydrolyysinopeudet, ovat myös suotavia.

6. Tätä testimenetelmää voidaan käyttää vesiliukoisten tai veteen liukenemattomien kemikaalien yhteydessä. Testikemikaalia käytetään kummassakin tapauksessa kuitenkin eri tavalla. Testimenetelmää ei voida soveltaa haihtuviin kemikaaleihin, eli sellaisiin, joiden osalta Henryn vakio tai ilma-vesi-jakaantumiskerroin on suurempi kuin yksi, tai sellaisiin kemikaaleihin, joiden höyrynpaine on suurempi kuin 0,0133 Pa 25 °C:ssa.

▼M6

TESTIN VALIDITEETTI

7. Jotta testi olisi luotettava, kontrollien on täytettävä seuraavat kriteerit:

— täysikasvuisten kuolleisuus pitoisuusalueen määrityskokeen lopussa ja lisääntymistestin ensimmäisen kolmen viikon jälkeen saa olla enintään 20 prosenttia

— jos testin alussa jokaisessa astiassa on esimerkiksi 10 täysikasvuista, testin lopussa on oltava tuotettuna vähintään 25 poikasta astiaa kohti

— poikasten keskimäärän variaatiokerroin saa olla enintään 50 prosenttia lisääntymistestin lopussa.

Jos testi ei täytä näitä luotettavuuskriteerejä, se on keskeytettävä, ellei testin jatkamiselle ole perusteluita. Perustelut on kirjattava testiraporttiin.

VERTAILUKEMIKAALI

8. Vertailukemikaali joko testataan säännöllisin väliajoin tai se otetaan mukaan jokaiseen testiin, jotta voidaan todeta, että testiorganismien vaste ei ole muuttunut merkittävästi ajan kuluessa. Sopiva vertailukemikaali on karbendatsiimi, jonka on osoitettu vaikuttavan änkyrimatojen eloonjäämiseen ja lisääntymiseen (13), (14). Myös muita kemikaaleja, joiden myrkyllisyystiedot tunnetaan hyvin, voidaan käyttää. Yhteistutkimuksessa käytettiin karbendatsiimivalmistetta, joka tunnetaan kauppanimellä Derosal™. Sen tuottaja on AgrEvo Company (Frankfurt, Saksa), ja se sisältää tehoainetta 360 g/l (32,18 %) (2). Yhteistutkimuksessa todettu lisääntymistä koskeva EC_{50}-arvo oli välillä 1,2 ± 0,8 mg tehoainetta yhtä kuivamassakiloa kohti (2). Jos testisarjaan sisältyy positiivinen myrkyllinen standardi, käytetään yhtä pitoisuutta, jolloin rinnakkaisnäytteitä on oltava yhtä monta kuin kontrolleja. Karbendatsiimille suositeltava pitoisuus on 1,2 mg tehoainetta yhtä kuivamassakiloa kohti (testattuna nestemäisenä valmisteena).

TESTIN KUVAUS

Välineet

9. Testiastioiden on oltava lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Sopivia ovat lasipurkit, joiden tilavuus on esimerkiksi 0,20–0,25 litraa ja halkaisija ≈ 6 cm. Astioissa on oltava läpinäkyvät kannet (esimerkiksi lasia tai polyetyleeniä), jotka on suunniteltu vähentämään veden haihtumista, mutta jotka päästävät kaasun vaihtumaan maaperän ja ympäröivän ilmakehän välillä. Kansien on oltava läpinäkyviä valonläpäisevyyden vuoksi.

10. Testissä tarvitaan myös vakiolaboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

— kuivauskaappi

— stereomikroskooppi

— pH-mittari ja fotometri

— sopivia tarkkoja vaakoja

— asianmukaiset lämpötilan valvontalaitteet

— asianmukaiset ilmankosteuden valvontalaitteet (eivät välttämättömiä, jos altistusastiat on peitetty kansilla)

— inkubaattori tai pieni tila, jossa on ilmastointilaite

— pinsettejä, koukkuja tai silmukoita

— laakea vati.

Keinomaan valmistus

11. Tässä testissä käytetään keinomaata (5), (7), jonka lopullinen koostumus on seuraava (kuivapainojen perusteella, kun ainekset on kuivattu vakiopainoon 105 °C:ssa):

▼M6

— 10 prosenttia rahkaturvetta, joka on ilmakuivattu ja jauhettu hienoksi (hiukkaskoko 2 ± 1 mm on hyväksyttävä); suositeltavaa on tarkistaa tuoreesta turve-erästä valmistetun maa-aineksen soveltuvuus matojen kasvatukseen ennen sen käyttämistä kokeessa

— 20 prosenttia kaoliinisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 prosenttia)

— noin 0,3–1,0 prosenttia kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$, jauhemainen, analyyttinen laatu), jotta maan pH-arvoksi saadaan 6,0 ± 0,5; lisättävän kalsiumkarbonaatin määrään saattaa vaikuttaa etenkin turpeen laatu/tyyppi

— noin 70 prosenttia ilmakuivattua teollisuushiekkaa (tarvittavan $CaCO_3$-määrän mukaan), ensisijaisesti hienoa hiekkaa, jonka hiukkasista yli puolet on kooltaan 50–200 mikronia.

On suositeltavaa todeta keinomaan soveltuvuus matojen kasvatukseen ja testin hyväksyttävyyskriteerien täyttyminen ennen kuin maata käytetään varsinaisessa testissä. Erityisen suositeltavaa on tehdä tällainen tarkistus sen varmistamiseksi, että testin onnistuminen ei vaarannu, jos keinomaan orgaanisen hiilen pitoisuutta vähennetään. Tämä tehdään esimerkiksi vähentämällä turvepitoisuutta 4–5 prosenttiin ja lisäämällä vastaavasti hiekan määrää. Kun orgaanisen hiilen pitoisuus pienenee, testikemikaalin adsorboituminen maahan (orgaaniseen hiileen) saattaa heikentyä ja testikemikaalin saatavuus madoille nousta. On osoitettu, että *Enchytraeus albidus* täyttää lisääntymiskriteerit, kun luonnonmaan orgaanisen hiilen pitoisuus on edellä mainittua matalampi, esimerkiksi 2,7 prosenttia (15). Kokemuksen, joka tosin on rajallinen, mukaan sama saadaan aikaan keinomaassa käyttämällä 5 prosenttia turvetta.

Huomautus: Kun luonnollista maaperää käytetään myöhemmissä testeissä (esimerkiksi korkeamman tason testeissä), on maa-aineksen soveltuvuus ja testin hyväksyttävyyskriteerien täyttyminen osoitettava jälleen.

12. Maan kuivat ainesosat sekoitetaan perusteellisesti (esimerkiksi suurella laboratoriosekoittimella). Tämä tehdään vähintään viikko ennen testin alkua. Sekoitettu maa-aines varastoidaan kahden vuorokauden ajaksi, jotta sen happamuus tasapainottuu/vakautuu. pH-arvon määrittämisessä käytetään seosta, jossa on yksi osa maa-ainesta ja viisi osaa 1 M:n kaliumkloridiliuosta (KCl) tai 0,01 M:n kalsiumkloridiliuosta ($CaCl_2$) (ks. (16) ja lisäys 3). Jos maa-aines on vaadittua vaihteluväliä happamampaa (ks. 11 kohta), happamuutta voidaan säätää lisäämällä tarvittava määrä $CaCO_3$:a. Jos maa-aines on liian emäksistä, happamuutta voidaan säätää lisäämällä 11 kohdassa mainittua seosta, mutta jättämällä pois $CaCO_3$.

13. Keinomaan enimmäisvedenpidätyskyky (WHC) määritetään lisäyksessä 2 kuvattujen menetelmien mukaisesti. Yhdestä kahteen vuorokautta ennen testin aloittamista kuiva keinomaa esikostutetaan lisäämällä deionisoitua vettä noin puoleen lopullisesta vesipitoisuudesta eli 40–60 prosenttiin enimmäisvedenpidätyskyvystä. Testin alussa esikostutettu maa-aines jaetaan osioihin, jotka vastaavat testissä käytettävien testipitoisuuksien (ja tarvittaessa vertailukemikaalien) sekä kontrollien lukumäärää. Kosteuspitoisuus säädetään 40–60 prosenttiin enimmäisvedenpidätyskyvystä lisäämällä testikemikaalia liuoksena ja/tai lisäämällä tislattua tai deionisoitua vettä (ks. 19–21 kohdat).

▼M6

Kosteuspitoisuus todetaan testin alussa ja lopussa (kuivaamalla vakiopainoon 105 asteen lämpötilassa), ja sen on oltava matojen eloonjäämisen kannalta ihanteellisella alueella. Maa-aineksen kosteuspitoisuus voidaan tarkistaa likimääräisesti puristamalla maa-ainesta varovasti kädessä. Sormien välistä pitäisi tihkua pieniä vesipisaroita, jos kosteuspitoisuus on oikea.

Koe-eläinten valinta ja valmistelu

14. Suositeltava testilaji on *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (änkyrimato), joka kuuluu heimoon *Enchytraeidae* (lahko *Oligochaeta*, pääjakso *Annelida*). *E. albidus* on eräs suurimpia änkyrimatolajeja, ja tavattujen yksilöiden pituus on ollut jopa 35 mm (17), (18). *E. albidus* on levinnyt kaikkialle maailmaan, ja sitä tavataan merellisistä, makean veden ja kuivan maan luontotyypeistä useimmiten lahoavasta orgaanisesta aineksesta (merilevästä, kompostimullasta) ja joskus harvoin myös niityiltä (9). Sen laaja ekologinen toleranssi sekä eräät morfologiset vaihtelut saattavat osoittaa, että lajista on olemassa eri alalajeja.

15. *E. albidus* -lajin yksilöitä myydään kalanruoaksi. On tarkistettava, ettei viljelmä ole kontaminoitunut jollakin, yleensä pienemmällä lajilla (1), (19). Jos kontaminaatiota ilmenee, kaikki madot on pestävä vedellä petrimaljassa. Tämän jälkeen *E. albidus* -lajin suurikokoiset täysikasvuiset yksilöt erotetaan uuden viljelmän aloittamista varten, ja kaikki muut yksilöt heitetään pois. *E. albidus* -lajia voidaan kasvattaa helposti monenlaisissa orgaanisissa materiaaleissa (ks. lisäys 4). *E. albidus* -lajin elinkaari on lyhyt, sillä täysikasvuisuus saavutetaan 33 vuorokauden (lämpötilassa 18 °C) ja 74 vuorokauden (lämpötilassa 12 °C) välillä (1). Testissä käytetään ainoastaan viljelmiä, joita on pidetty laboratoriossa ongelmitta vähintään viiden viikon (yhden sukupolven) ajan.

16. Sopivia ovat myös muut *Enchytraeus*-suvun lajit, esimerkiksi *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 tai *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (ks. lisäys 5). Jos käytetään muita *Enchytraeus*-lajeja, ne on tunnistettava selvästi ja lajin valintaperusteet on raportoitava.

17. Testissä käytettävät eläimet ovat täysikasvuisia matoja. Niillä on oltava munia (valkoisia pisteitä) clitellumin alueella, ja niiden on oltava suunnilleen samankokoisia (noin 1 cm pitkiä). Kasvatusviljelmää ei tarvitse synkronisoida.

18. Jos änkyrimatoja ei kasvateta samassa maa-ainestyypissä ja olosuhteissa (ruokinta mukaan luettuna), joissa varsinainen testi tehdään, matoja on totutettava uuteen ympäristöön vähintään 24 tunnin, mutta enintään kolmen vuorokauden ajan. Totutettavaksi otetaan ensin suurempi määrä täysikasvuisia kuin testin tekemiseen tarvitaan, jotta vahingoittuneet tai muuten soveltumattomat yksilöt voidaan tarvittaessa hylätä. Totutusjakson lopussa testiin valitaan vain munia sisältäviä matoja, joiden käytöksessä ei ilmene mitään epätavallista (ne eivät esimerkiksi pyri pois maa-aineksesta). Madot otetaan varovasti erilleen terävillä pinseteillä, koukuilla tai silmukoilla ja laitetaan petrimaljaan, jossa on vähän raikasta vettä. Tarkoitukseen sopivinta on tämän liitteen luvussa C.20 Lisääntymistesti vesikirpulla (*Daphnia magna*) esitetty synteettinen vesi, sillä deionisoitu tai demineralisoitu vesi tai hanavesi saattaa olla madoille haitallista. Madot tutkitaan stereomikroskoopin alla, ja munia sisältämättömät yksilöt hävitetään. Viljelmiin mahdollisesti joutuneet punkit tai hyppyhäntäiset on poistettava huolellisesti ja hävitettävä. Terveet madot, joita ei käytetä testiin, palautetaan kantaviljelmään.

▼M6

Testipitoisuuksien valmistelu

Vesiliukoinen testikemikaali

19. Testikemikaalista ja deionisoidusta vedestä valmistetaan sellainen määrä liuosta, joka riittää yhden testipitoisuuden kaikkiin neljään rinnakkaisnäytteeseen. Suositeltavaa on käyttää vettä riittävästi, jotta saavutetaan tarvittava kosteuspitoisuus, eli 40–60 prosenttia enimmäisvedenpidätyskyvystä (ks. 13 kohta). Kukin testikemikaaliliuos sekoitetaan perinpohjaisesti yhteen erään esikostutettua maata, ennen kuin se laitetaan testiastiaan.

Veteen liukenematon testikemikaali

20. Jos käytettävä kemikaali ei ole vesiliukoista, mutta liukenee orgaaniseen liuottimeen, se voidaan liuottaa pienimpään mahdolliseen määrään sopivaa kantoainetta (esimerkiksi asetonia). Ainoastaan haihtuvia liuottimia saa käyttää. Kantoaine sekoitetaan pieneen määrään (esimerkiksi 2,5 g) hienoa kvartsihiekkaa tai ruiskutetaan sen päälle. Kantoaine poistetaan haihduttamalla hiekkaa vetokaapissa vähintään tunnin ajan. Kvartsihiekan ja testikemikaalin seos lisätään esikostutettuun maahan ja sekoitetaan huolellisesti sopivaan määrään deionisoitua vettä, jotta saadaan tarvittava kosteuspitoisuus. Lopullinen seos siirretään testiastioihin.

21. Jos kemikaali liukenee heikosti veteen ja orgaanisiin liuottimiin, haluttu testipitoisuus saadaan sekoittamalla testikemikaaliin 2,5 grammaa vastaava määrä hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa testiastiaa kohden. Kvartsihiekan ja testikemikaalin seos lisätään esikostutettuun maahan ja sekoitetaan huolellisesti sopivaan määrään deionisoitua vettä, jotta saadaan tarvittava kosteuspitoisuus. Lopullinen seos jaetaan testiastioihin. Menettely toistetaan jokaisen testipitoisuuden yhteydessä, ja myös asianmukainen kontrolli valmistellaan.

22. Testattavan kemikaalin pitoisuus saa normaalisti olla enintään 1 000 mg/kg maa-aineksen kuivaan massaan nähden. Toisinaan testin tarkoitus voi kuitenkin edellyttää suuremmilla pitoisuuksilla testaamista.

TESTIEN SUORITTAMINEN

Testi- ja kontrolliryhmät

23. Jokaisesta testipitoisuudesta laitetaan testiastiaan 20 gramman kuivapainoa vastaava määrä testattavaa maa-ainesta (ks. 19–21 kohdat). Lisäksi valmistellaan kontrollit, joihin ei lisätä testikemikaalia. Jokaiseen astiaan lisätään ruokaa 29 kohdassa kuvatulla tavalla. Kuhunkin testiastiaan sijoitetaan satunnaisesti kymmenen matoa. Madot siirretään varovasti testiastiaan ja asetetaan maa-aineksen pinnalle käyttäen esimerkiksi teräväkärkisiä pinsettejä, koukkuja tai silmukoita. Testipitoisuuksien rinnakkaisnäytteiden ja kontrollien lukumäärä määräytyy käytettävän testijärjestelyn mukaan (ks. 34 kohta). Testiastiat sijoitetaan testi-inkubaattoriin satunnaisesti, ja astioiden paikkoja muutetaan satunnaisesti viikoittain.

24. Jos testikemikaalin applikoinnissa käytetään kantoainetta, koesarjojen lisäksi tulee tehdä yksi kontrollisarja, joka sisältää pelkästään kvartsihiekkaa, johon liuotinta on sekoitettu tai ruiskutettu. Liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuuden olisi oltava sama kuin testikemikaalia sisältävissä testiastioissa. Lisäksi tehdään yksi ylimääräisen annoksen kvartsihiekkaa (2,5 g astiaa kohti) sisältävä kontrollisarja niille kemikaaleille, jotka on annosteltava 21 kohdassa kuvattujen menettelyjen mukaisesti.

▼M6

Testiolosuhteet

25. Testauslämpötila on 20 °C ± 2 °C. Matoja estetään poistumasta maa-aineksesta toteuttamalla testi valoisaa ja pimeää aikaa säätelemällä (mieluiten 16 tuntia valoisaa ja 8 tuntia pimeää). Testiastioiden alueella tulisi olla 400–800 luksin valaistus.

26. Maa-aineksen kosteuden tarkistamiseksi astiat punnitaan testin alussa ja sen jälkeen kerran viikossa. Jos astian paino on pienentynyt, astiaan lisätään riittävästi deionisoitua vettä. Veden häviämistä voidaan vähentää säilyttämällä testi-inkubaattorin ilmankosteus korkeana (> 80 prosenttia).

27. Kosteuspitoisuus ja pH-arvo on mitattava sekä pitoisuusalueen määritystestin että varsinaisen testin alussa ja lopussa. Mittaukset on tehtävä kontrolleista ja käsitellyistä maa-ainesnäytteistä (kaikki pitoisuudet), jotka on valmistettu samalla tavalla kuin koeviljelmät ja joita on ylläpidetty samoin, mutta joissa ei ole matoja. Näihin maa-ainesnäytteisiin lisätään ruokaa vain testin alussa mikrobien toiminnan helpottamiseksi. Ruokaa lisätään yhtä paljon kuin testiviljelmiin. Testin aikana näihin astioihin ei ole tarpeen enää lisätä ruokaa.

Ruokinta

28. Käytettävä ruoka on sellaista, jota änkyrimatopopulaatio voi käyttää ravinnokseen. Ruokintaan sopivaksi on todettu kaurahiutaleet, jotka suositellaan käsiteltäväksi autoklaavissa ennen käyttöä mikrobikontaminaation estämiseksi; myös kuumentamista voidaan käyttää.

29. Ensimmäinen ruokinta tapahtuu sekoittamalla 50 mg jauhettuja kaurahiutaleita kussakin astiassa olevaan maa-ainekseen ennen matojen lisäämistä. Tämän jälkeen ruokaa annetaan viikoittain päivään 21 saakka. Päivänä 28 ruokintaa ei tehdä, sillä täysikasvuiset yksilöt on tässä vaiheessa poistettu, ja poikaset tarvitsevat tämän ajankohdan jälkeen melko vähän lisäruokaa. Testin aikana ruokinta tapahtuu sijoittamalla 25 mg jauhettuja kaurahiutaleita maa-aineksen pinnalle niin varovasti, että madot eivät vahingoitu. Sienten kasvun estämiseksi kaurahiutaleet peitetään pienellä määrällä maa-ainesta. Jos kaikkea ruokaa ei syödä, annosta pienennetään.

Testijärjestely pitoisuusalueen määritystestiä varten

30. Tarvittaessa pitoisuusalueen määritystesti toteutetaan esimerkiksi siten, että siinä on viisi testikemikaalipitoisuutta (0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg/kg maa-aineksen kuivapainoon nähden). Jokaisesta käsittelystä riittää yksi rinnakkaisnäyte ja kontrolli.

31. Pitoisuusalueen määritystestin kesto on kaksi viikkoa. Testin lopussa arvioidaan matojen kuolleisuus. Mato kirjataan kuolleeksi, jos se ei reagoi etupäähän annettuun mekaaniseen ärsytykseen. Kuolleisuuden lisäksi voidaan kerätä muita tietoja, joista saattaa olla apua varsinaisessa testissä käytettävien pitoisuusalueiden valinnassa. Siksi on syytä kirjata muistiin muutokset täysikasvuisten yksilöiden käyttäytymisessä (esimerkiksi kyvyttömyys kaivautua maa-ainekseen tai makaaminen liikkumatta testiastian lasiseinämää vasten) ja morfologiassa (esimerkiksi avohaavat) sekä mahdollisten poikasten esiintyminen. Viimeksi mainittu voidaan todeta lisäyksessä 6 kuvattua värjäysmenetelmää käyttämällä.

32. LC_{50}-arvo voidaan todeta likimääräisesti laskemalla kuolleisuusdatan geometrinen keskiarvo. Kun pitoisuuden vaihteluväliä valitaan varsinaista testiä varten, lisääntymiselle aiheutuvat vaikutukset arvioidaan enintään 10-kertaisesti LC_{50}-arvoa pienemmiksi. Tämä suhde on kuitenkin empiirinen, eikä välttämättä päde yksittäistapauksissa. Muista pitoisuusalueen määritystestissä

▼M6

tehdyistä havainnoista, kuten poikasten esiintymisestä, voi olla apua varsinaisessa testissä käytettävän testikemikaalin pitoisuusalueen tarkemmassa määrittämisessä.

33. LC_{50}-arvon tarkkaa määrittämistä varten suositellaan, että testissä käytetään vähintään neljää rinnakkaisnäytettä jokaisesta testikemikaalin pitoisuudesta sekä riittävää määrää eri pitoisuuksia, jotta kyseisillä pitoisuuksilla saadaan aikaan vähintään neljä tilastollisesti merkittävää, toisistaan poikkeavaa keskimääräistä vastetta. Jos käytössä on kontrolleja, käytetään vastaavaa määrää pitoisuuksia ja rinnakkaisnäytteitä.

Testijärjestely varsinaista lisääntymistestiä varten

34. Yhteistutkimuksen johdosta tehtyjen suositusten perusteella esitetään kolmea mahdollista testijärjestelyä (2):

— NOEC-arvoa määritettäessä testataan vähintään viisi pitoisuutta geometrisessa sarjassa. Jokaista testipitoisuutta kohti suositellaan neljää rinnakkaisnäytettä ja kahdeksaa kontrollia. Pitoisuudet on porrastettava kertoimella, joka saa olla enintään 1,8.

— EC_x-arvoa määritettäessä (esimerkiksi EC_{10}, EC_{50}) testataan vähintään viisi pitoisuutta, ja pitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta EC_x saadaan interpoloimalla eikä ekstrapoloimalla. Jokaista testipitoisuutta kohti suositellaan vähintään neljää rinnakkaisnäytettä ja neljää kontrollirinnakkaisnäytettä. Porrastuskerroin voi vaihdella ja olla enintään 1,8 odotetulla vaikutusalueella sekä yli 1,8 tätä suuremmilla ja pienemmillä pitoisuuksilla.

— Yhdistetty lähestymistapa mahdollistaa sekä NOEC-arvon että EC_x-arvon määrittämisen. Tällöin käytetään kahdeksaa käsittelypitoisuutta geometrisessa sarjassa. Jokaista käsittelyä kohti suositellaan neljää rinnakkaisnäytettä ja kahdeksaa kontrollia. Pitoisuudet on porrastettava kertoimella, joka saa olla enintään 1,8.

35. Käytettävien täysikasvuisten matojen määrä astiaa kohti on 10 (ks. 23 kohta). Ruokaa lisätään testiastioihin testin alussa ja tämän jälkeen kerran viikossa (ks. 29 kohta). Viimeisen kerran ruokaa lisätään päivänä 21. Päivänä 21 maa-ainesnäytteet tutkitaan varovasti käsin ja elävät täysikasvuiset madot todetaan ja lasketaan. Samalla kirjataan muistiin muutokset niiden käyttäytymisessä (esimerkiksi kyvyttömyys kaivautua maa-ainekseen tai makaaminen liikkumatta testiastian lasiseinämää vasten) ja morfologiassa (esimerkiksi avohaavat). Tämän jälkeen kaikki täysikasvuiset poistetaan testiastioista ja testimaa-aineksesta. Jos testimaa-ainekseen on tuotettu munakoteloita, kotelot sisältävää maa-ainesta inkuboidaan vielä kolme viikkoa samoissa testiolosuhteissa, mutta ruokinta tehdään vain päivänä 35 (jolloin kuhunkin astiaan annostellaan 25 mg jauhettuja kaurahiutaleita).

36. Kuuden viikon kuluttua vastakuoriutuneet madot lasketaan. Suositeltava menetelmä on rose bengal -värjäykseen (ks. lisäys 6) perustuva, mutta myös muut märkäerottamiseen (ei lämpöerottamiseen) perustuvat tekniikat ja kelluttaminen (ks. lisäys 6) on todettu sopiviksi (4), (10), (11), (20). Rose bengal -värjäystä suositellaan siksi, että suspendoituneiden savihiukkasten aikaansaama sameus voi haitata märkäerottamista maa-ainessubstraatista.

Raja-annostesti

37. Jos pitoisuusalueen määritystestissä ei havaita vaikutuksia suurimmalla pitoisuudella (esimerkiksi 1 000 mg/kg), lisääntymistesti voidaan toteuttaa raja-annostestinä testipitoisuudella 1 000 mg/kg, millä voidaan osoittaa, että NOEC-arvo lisääntymiselle on tätä pitoisuutta suurempi.

▼M6

Testin yhteenveto ja aikataulu

38. Testin vaiheet voidaan tiivistää seuraavasti:

Aika	Pitoisuusalueen määritystesti	Varsinainen testi
Päivä –7 tai aiemmin	— Keinomaan valmistus (kuivien ainesosien sekoitus)	— Keinomaan valmistus (kuivien ainesosien sekoitus)
Päivä –5	— Keinomaan pH-arvon tarkistaminen — Maan enimmäisvedenpidätyskyvyn mittaus	— Keinomaan pH-arvon tarkistaminen — Maan enimmäisvedenpidätyskyvyn mittaus
Päivät –5… –3	— Matojen lajittelu totuttelua varten	— Matojen lajittelu totuttelua varten
Päivät –3… 0	— Matojen annetaan tottua vähintään 24 tunnin ajan	— Matojen annetaan tottua vähintään 24 tunnin ajan
Päivä –1	— Keinomaan esikostuttaminen ja jakaminen eriin	— Keinomaan esikostuttaminen ja jakaminen eriin
Päivä 0	— Kantaliuosten valmistaminen — Testikemikaalin applikointi — Testisubstraatin punnitseminen testiastioihin — Ruoan annostelu — Matojen siirtäminen astiaan — Maa-aineksen pH-arvon ja kosteuspitoisuuden mittaaminen	— Kantaliuosten valmistaminen — Testikemikaalin applikointi — Testisubstraatin punnitseminen testiastioihin — Ruoan annostelu — Matojen siirtäminen astiaan — Maa-aineksen pH-arvon ja kosteuspitoisuuden mittaaminen
Päivä 7	— Maa-aineksen kosteuspitoisuuden tarkistaminen	— Maa-aineksen kosteuspitoisuuden tarkistaminen — Ruokinta
Päivä 14	— Täysikasvuisten yksilöiden kuolleisuuden toteaminen — Poikasten lukumäärän arviointi — Maa-aineksen pH-arvon ja kosteuspitoisuuden mittaaminen	— Maa-aineksen kosteuspitoisuuden tarkistaminen — Ruokinta
Päivä 21		— Täysikasvuisten käyttäytymisen tarkkaileminen — Täyskasvuisten poistaminen — Täysikasvuisten yksilöiden kuolleisuuden toteaminen — Maa-aineksen kosteuspitoisuuden tarkistaminen — Ruokinta
Päivä 28		— Maa-aineksen kosteuspitoisuuden tarkistaminen — Ei ruokintaa
Päivä 35		— Maa-aineksen kosteuspitoisuuden tarkistaminen — Ruokinta
Päivä 42		— Poikasten laskenta — Maa-aineksen pH-arvon ja kosteuspitoisuuden mittaaminen

▼M6

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

39. Lisäyksessä 7 olevaa yhteenvetoa lukuun ottamatta tähän testimenetelmään ei kuulu tarkoin määriteltyä tilastollista menetelmää testitulosten analysointia varten.

40. Pitoisuusalueen määritystestin keskeinen tutkittava ominaisuus on kuolleisuus. Muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi kyvyttömyys kaivautua maa-ainekseen tai makaaminen liikkumatta testiastian lasiseinämää vasten) ja morfologiassa (esimerkiksi avohaavat) sekä mahdollisten poikasten esiintyminen on kuitenkin myös syytä kirjata muistiin. LC_{50}-arvo määritetään normaalisti tilastollista koestusta (21) tai logistista regressiota käyttämällä. Tapauksissa, joihin tämä analyysimenetelmä ei sovellu (esimerkiksi silloin, kun osittaista kuolleisuutta havaitaan alle kolmessa pitoisuudessa), voidaan kuitenkin käyttää muita menetelmiä. Näitä ovat esimerkiksi liukuva keskiarvo (22), viritetty Spearmanin ja Kärberin menetelmä (23) tai yksinkertainen interpolointi (esimerkiksi LC_0:n ja LC_{100}:n geometrinen keskiarvo laskettuna LC_0:n neliöjuuresta kerrottuna LC_{100}:lla).

41. Varsinaisessa testissä tutkittava ominaisuus on hedelmällisyys eli tuotettujen poikasten lukumäärä. Pitoisuusalueen määritystestin tavoin kaikki muut merkit kemikaalin vaarallisuudesta on kuitenkin kirjattava loppuraporttiin. Tilastollinen analyysi edellyttää, että lisääntymisestä lasketaan aritmeettinen keskiarvo ja keskihajonta kutakin käsittelyä ja kontrollia kohti.

42. Varianssianalyysiä tehtäessä keskihajonta s ja vapausaste df voidaan korvata yhdistetyllä varianssianalyysistä saadulla varianssiestimaatilla ja sen vapausasteilla sillä ehdolla, että varianssi ei ole riippuvainen pitoisuudesta. Tässä tapauksessa käytetään kontrollin ja käsittelyiden yksinkertaisia variansseja. Kaupalliset tilasto-ohjelmistot laskevat nämä arvot yleensä käyttämällä astiakohtaisia tuloksia rinnakkaisnäytteinä. Jos negatiivisista kontrolleista ja liuotinkontrolleista saadun datan yhdistäminen vaikuttaa järkevämmältä kuin testaaminen johonkin niistä verraten, ne on testattava, jotta voidaan todeta, etteivät ne eroa toisistaan merkittävästi (sopivista testeistä ks. 45 kohta ja lisäys 7).

43. Muut tilastolliset testit ja interferenssi riippuvat siitä, ovatko rinnakkaisnäytteiden arvot normaalijakaumalla ja varianssiin nähden homogeenisia.

NOEC-estimointi

44. Huomiota kiinnitetään ennen kaikkea testien voimaan. Kun halutaan arvioida, noudattaako data suurin piirtein normaalijakaumaa, hyödynnetään esimerkiksi aiemmista yhteistutkimuksista saatua tietoa tai muuta historiallista tietoa. Kriittisempi on varianssin homogeenisuus (homoskedastisuus). Kokemuksen perusteella varianssi usein kasvaa keskiarvon noustessa, ja tässä tilanteessa datan muuntaminen saattaa johtaa homoskedastisuuteen. Muunnosten täytyy kuitenkin perustua historiallisesta tiedosta saatuun kokemukseen tutkittavana olevan datan asemasta. Jos data on homogeenista, tehdään useita t-testejä, esimerkiksi Watsonin-Williamsin testi ($\alpha = 0{,}05$, yksisuuntainen) (24), (25) tai joissakin tapauksissa Dunnettin testi (26), (27). On syytä huomata, että jos rinnakkaisnäytteitä ei ole yhtä paljon, taulukon t-arvoja on korjattava Dunnettin ja Williamsin esittämillä tavoilla. Suuren variaation vuoksi vasteet eivät aina kasva tai pienene säännönmukaisesti ja monotonisuudesta poiketaan voimakkaasti, jolloin Dunnettin testi sopii tarkoitukseen paremmin. Jos homoskedastisuudessa on poikkeamia, voi olla tarpeen tutkia tarkemmin mahdollisia vaikutuksia variansseihin, jotta saadaan selville, voiko t-testejä käyttää testien voimasta tinkimättä (28). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää moninkertaista U-testiä, esimerkiksi Bonferroni-U-testiä Holmin mukaan (29). Jos datassa ilmenee heteroskedastisuutta, mutta se vastaa muutoin taustalla olevaa monotonista annosvastetta,

▼M6

voidaan käyttää myös muuta parametritonta testiä, esimerkiksi Jonckheere-Terprstran testiä (30), (31) tai Shirleyn testiä (32), (33). Viimeksi mainitut ovat yleensä suositeltavampia kuin t-testit, joissa varianssit ovat heterogeenisiä. (Ks. myös lisäyksen 7 kaavio.)

45. Jos raja-arvotesti on tehty ja parametritestimenetelmien edellytykset (yleensä homogeenisuus) täyttyvät, voidaan käyttää parittaista Studentin t-testiä tai muussa tapauksessa Mann-Whitneyn U-testimenetelmää (29).

EC_x-pitoisuuden arviointi

46. Kaikkia EC_x-arvoja laskettaessa käsittelykohtaisia keskiarvoja käytetään regressioanalyysissa (lineaarisessa tai epälineaarisessa) sen jälkeen, kun on muodostettu sopiva annosvastefunktio. Kun matojen kasvu on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida sopivalla regressioanalyysillä (35). Sopivia funktioita dikotomisia tietoja varten (kuolleisuus/eloonjääminen ja tuotettujen jälkeläisten määrä) ovat tavanomaiset S-funktio, logistinen funktio tai Weibullin funktio, jotka sisältävät 2–4 parametria, joista osalla voidaan mallintaa myös hormeettisia vasteita. Jos annosvastefunktio on sovitettu lineaarisella regressioanalyysilla, merkitsevä r^2 (determinaatiokerroin) ja/tai kaltevuus on etsittävä regressioanalyysilla, minkä jälkeen EC_x arvioidaan käyttämällä kontrollikeskiarvon x prosenttia vastaavaa arvoa regressioanalyysilla muodostetussa yhtälössä. Seuraavaksi 95 prosentin luottamusvälit lasketaan Fiellerin mukaan (teoksessa Finney (21)) tai jollakin muulla sopivalla, nykyaikaisella menetelmällä.

47. Vaihtoehtoisesti vaste voidaan mallintaa prosentti- tai muuna osuutena malliparametrista, joka tulkitaan kontrollin keskimääräiseksi vasteeksi. Tällöin normaali (logistinen, Weibullin) s-käyrä voidaan sovittaa helposti tuloksiin hyödyntämällä probitti-regressiomenetelmää (21). Painotusfunktiota on mukautettava metrisiin vasteisiin Christensenin esimerkin mukaan (36). Jos hormeesia on havaittu, probittianalyysin sijasta on käytettävä neliparametrista logistista tai Weibullin funktiota, joka sovitetaan epälineaarisella regressiomenetelmällä (36). Jos dataan ei saada sovitettua sopivaa annosvastefunktiota, voidaan ECx:n ja sen luottamusvälien estimoinnissa käyttää jotain muuta menetelmää, kuten Thompsonin liukuvaa keskiarvoa (22) tai viritettyä Spearman ja Kärberin menetelmää (23).

TESTIRAPORTTI

48. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (esimerkiksi vesiliukoisuus, höyrynpaine)

— testikemikaalin IUPAC-nimikkeistön mukaiset tunnistetiedot, CAS-numero, erä, rakennekaava ja puhtaus

— näytteen viimeinen käyttöpäivä.

Testilajit:

— käytetyt koe-eläimet: lajit, tieteellinen nimi, organismien lähde ja kasvatusolosuhteet.

Testiolosuhteet:

— keinomaan ainesosat ja valmistustapa

▼M6

— testikemikaalin applikointitapa

— kuvaus testiolosuhteista, mukaan lukien lämpötila, kosteuspitoisuus ja pH-arvo

— täydellinen kuvaus testijärjestelystä ja käytetyistä menettelyistä.

Testitulokset:

— täysikasvuisten matojen kuolleisuus kahden viikon kuluttua sekä poikasten määrä pitoisuusalueen määritystestin lopussa

— täysikasvuisten matojen kuolleisuus kolmen viikon altistumisen jälkeen sekä täydelliset tiedot poikasista varsinaisen testin lopussa

— kaikki testiorganismeissa havaitut fyysiset tai patologiset oireet sekä käyttäytymisen muutokset

— LC_{50}-arvo, NOEC-arvo ja/tai EC_x (esimerkiksi EC_{50}, EC_{10}) lisääntymisen osalta, jos jotain näistä voidaan soveltaa luottamusvälien puitteissa, sekä käyrä sen laskennassa käytetystä sovitetusta mallista kaikki tiedot ja havainnot, jotka helpottavat tulosten tulkintaa.

Lisäksi ilmoitetaan poikkeukset tässä testimenetelmässä kuvatuista menettelyistä ja kaikki testin aikana ilmenneet epätavallisuudet.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 s.

(3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results. Teoksessa: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. s. 497–508. Elsevier, Amsterdam.

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 s.

(5) Tämän liitteen luku C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

(6) International Organisation for Standardization (ISO) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.

(7) International Organisation for Standardization (ISO) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). Teoksessa: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73–94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217–232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246–249.

(11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2–29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79–96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. Teoksessa: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.

(16) International Organisation for Standardization (ISO) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1–13.

(18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1–160.

(19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300–305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19–76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714–719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103–117.

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096–1121.

(27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482–491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355–361.

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65–70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327–333.

(32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144–151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183–186.

(34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213–221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC_{50} and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25–32.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä sovelletaan seuraavia määritelmiä:

Kemikaali: Aine tai seos.

EC_x (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia): Pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Tässä testissä kaikki vaikuttavat pitoisuudet ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti.

LC_0 (ei tappava pitoisuus) Testikemikaalin pitoisuus, joka ei aiheuta lainkaan altistuneiden testiorganismien kuolleisuutta tietyn ajanjakson aikana. Tässä testissä LC_0 ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti.

LC_{50} (mediaani tappava pitoisuus): Testikemikaalin pitoisuus, joka aiheuttaa 50 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa tietyn ajanjakson aikana. Tässä testissä LC_{50} ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti.

LC_{100} (täysin tappava pitoisuus): Testikemikaalin pitoisuus, joka aiheuttaa 100 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa tietyn ajanjakson aikana. Tässä testissä LC_{100} ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla on tilastollisesti merkittävä vaikutus ($p < 0,05$). Tässä testissä LOEC ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti. Kaikilla LOEC-pitoisuuden ylittävillä testipitoisuuksilla vaikutuksen olisi normaalisti oltava kontrollista tilastollisesti poikkeava. Kaikki poikkeamat edellä mainitusta LOEC-pitoisuuden määrittämisessä on perusteltava testiraportissa.

NOEC (pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia): LOEC-arvoa välittömästi seuraava testikemikaalin korkein pitoisuus, josta ei ole havaittavaa vaikutusta. Tässä testissä NOEC-arvoa vastaavalla pitoisuudella ei ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta ($p < 0,05$) tietyn altistusajan kuluessa kontrolliin verrattuna.

Lisääntymiskyky: testijakson kuluessa tuotettujen poikasten keskimäärä täysikasvuisten matojen määrään verrattuna.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M6

Lisäys 2

Enimmäisvedenpidätyskyvyn määrittäminen

Keinomaan vedenpidätyskyvyn määrittäminen

Seuraava standardin ISO DIS 11268-2 liitteessä C kuvattu menetelmä on todettu tarkoituksenmukaiseksi.

Kerää tietty määrä (esimerkiksi viisi grammaa) testimaa-ainessubstraattia sopivalla välineellä (kierrekairalla tms.). Aseta kierrekairaputken pohjalle pala suodatinpaperia, täytä vedellä ja laita putki sitten telineessä vesiastiaan. Putki upotetaan veteen vähitellen, kunnes vedenpinta on maanäytteen yläpuolella. Sen jälkeen näytettä pidetään vedessä noin kolme tuntia. Kaikkea maa-aineksen kapillaareihin imeytynyttä vettä ei pystytä pidättämään, minkä vuoksi maanäytettä valutetaan kahden tunnin ajan asettamalla putki hyvin märkään kerrokseen hienojakoista kvartsihiekkaa, joka on laitettu suljettuun astiaan (kuivumisen estämiseksi). Sen jälkeen näyte punnitaan ja kuivataan pysyvään massaan 105 °C:ssa. Vedenpidätyskyky (WHC) lasketaan seuraavasti:

$$\text{WHC (prosenttiosuus kuivamassasta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

jossa:

S = vesikyllästetty substraatti + putken massa + suodatinpaperin massa

T = taara (putken massa + suodatinpaperin massa)

D = substraatin kuivamassa.

VIITTEET:

International Organisation for Standardization (ISO) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Lisäys 3

Maan pH:n määrittäminen

Seuraava menetelmä, jolla määritetään maanäytteen pH-arvo, perustuu maan laatua koskevassa standardissa ISO 10390: Soil Quality – Determination of pH olevaan kuvaukseen.

Tietyn määrän maata annetaan kuivua huoneenlämmössä vähintään 12 tunnin ajan. Sen jälkeen maasta valmistetaan suspensio (joka sisältää vähintään viisi grammaa maata), jonka tilavuus on viisinkertainen joko analyyttista laatua olevaan 1 M:n kaliumkloridiliuoksen (KCl) tilavuuteen tai analyyttista laatua olevaan 0,01 M:n kalsiumkloridiliuokseen ($CaCl_2$) nähden. Sen jälkeen suspensiota ravistetaan perinpohjaisesti viisi minuuttia. Ravistelun jälkeen sen annetaan asettua vähintään 2, mutta enintään 24 tuntia. Nestefaasin pH-arvo mitataan pH-mittarilla, joka kalibroidaan ennen jokaista mittausta käyttämällä asianmukaisia puskuriliuoksia (esimerkiksi pH 4,0 ja 7,0).

VIITTEET:

International Organisation for Standardization (ISO) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Lisäys 4

***Enchytraeus*-lajien kasvatusolosuhteet**

Enchytraeus albidus -lajin änkyrimatoja (samoin kuin muita *Enchytraeus*-lajeja) voidaan kasvattaa suurissa muovilaatikoissa (koko esimerkiksi 30 × 60 × 10 cm), jotka on täytetty keinomaalla sekä luontaisella, kontaminoitumattomalla puutarhamullalla suhteessa 1:1. Kompostiainesta on vältettävä, sillä se voi sisältää myrkyllisiä kemikaaleja, kuten raskasmetalleja. Muut eläimet poistetaan maa-aineksesta ennen käyttöä esimerkiksi pakastamalla. Myös pelkkää keinomaata voi käyttää substraattina, mutta lisääntymiskyky saattaa tällöin jäädä pienemmäksi kuin maa-ainesseosta käytettäessä. Kasvatuksessa käytetyn substraatin pH-arvon on oltava 6,0 ± 0,5.

Viljelmää pidetään pimeässä 15–20 °C ± 2 °C:n lämpötilassa. Yli 23 °C:n lämpötiloja on syytä välttää. Maa-aines pidetään kosteana, muttei märkänä. Maa-aineksen kosteus on oikea, kun maata puristettaessa sormien välistä tihkuu pieniä vesipisaroita. Olosuhteiden muuttumista hapettomaksi on vältettävä huolehtimalla, että viljelmän peittämisestä huolimatta kaasut vaihtuvat riittävästi ympäröivän ilmakehän kanssa. Maata on muokattava varovasti viikoittain tuulettumisen edistämiseksi.

Madoille voidaan antaa ravinnoksi kaurahiutaleita. Kaurahiutaleita on säilytettävä suljetuissa astioissa ja ne on käsiteltävä autoklaavissa tai kuumennettava ennen käyttöä, jotta infektiot ja jauhopunkit (esim. *Glyzyphagus sp*., *Astigmata*, *Acarina*) tai petopunkit (esim. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*) voidaan välttää. Kuumennuksen jälkeen ruoka jauhetaan siten, että sitä on helppo ripotella maa-aineksen pinnalle. Kaurahiutaleiden lisäksi voidaan toisinaan antaa vitamiineja, maitoa ja kalanmaksaöljyä. Muita sopivia ravinnonlähteitä ovat leivontahiiva sekä Tetramin-kalanruoka.

Ruokinta tapahtuu noin kahdesti viikossa. Riittävä määrä kaurahiutaleita ripotellaan maa-aineksen pinnalle tai sekoitetaan varovasti substraattiin samalla, kun maata muokataan tuulettumisen edistämiseksi. Annetun ruoan määrä riippuu substraatissa olevien matojen lukumäärästä. Ohjeeksi voidaan antaa, että jos kaikki ruoka syödään vuorokauden kuluessa ruokinnasta, ruoan määrää on tarpeen lisätä. Jos ruokaa toisaalta on edelleen jäljellä pinnalla seuraavalla ruokintakerralla viikkoa myöhemmin, ruoan määrää vähennetään. Jos ruokaan on tullut sienikasvustoa, se poistetaan ja tilalle annetaan uutta ruokaa. Kolmen kuukauden kuluttua madot siirretään vastavalmistettuun substraattiin.

Kasvatusolosuhteet ovat tyydyttävät, jos a) madot eivät pyri pois maa-ainessubstraatista, b) madot liikkuvat nopeasti maan sisällä c) matojen ulkopinta on kiiltävä, eikä siinä näy tarttuneita maa-aineshiukkasia, d) madot ovat väriltään suurin piirtein valkoisia, e) matoviljelmissä on eri-ikäisiä matoja ja f) madot lisääntyvät jatkuvasti.

▼M6

Lisäys 5

Testin suorittaminen muita *Enchytraeus*-lajeja käyttämällä

Lajin valinta

Testissä voidaan käyttää myös muita lajeja kuin *E. albidusta*, mutta testimenettelyä ja hyväksyttävyyskriteerejä on mukautettava vastaavasti. Monia *Enchytraeus*-lajeja on helposti saatavilla ja ne sopivat kasvatettaviksi laboratoriossa, joten tärkein kriteeri jonkin muun kuin *E. albidus* -lajin valinnalle on ekologinen merkitys sekä lisäksi vertailukelpoinen herkkyys. Lajin vaihtamiselle saattaa olla myös muotosyitä. Esimerkiksi niissä maissa, joissa *E. albidus* -lajia ei tavata eikä sitä voi karanteenisäädösten vuoksi tai muista syistä tuoda maahan, on käytettävä muita *Enchytraeus*-lajeja.

Esimerkkejä sopivista vaihtoehtoisista lajeista

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): Viime aikoina tätä lajia on käytetty runsaasti ympäristömyrkyllisyyden tutkimuksessa, koska sen kasvattaminen ja testaaminen on helppoa. Laji on kuitenkin pienikokoinen, mikä tekee käsittelystä vaikeampaa kuin *E. albius* -lajin (etenkin värjäysmenetelmän käyttöä edeltävissä vaiheissa). *E. crypticus* -lajia ei ole varmuudella tavattu kenttäolosuhteissa, sillä se on kuvattu vain lieroviljelmistä löytyneiden yksilöiden perusteella. Sen ekologisia vaatimuksia ei siis tunneta.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Nimi kattaa luultavasti ryhmän läheisesti toisilleen sukua olevia lajeja, joita on morfologisesti vaikea erottaa toisistaan. Sen käyttöä testeissä ei suositella, ellei testissä käytettyjä yksilöitä kyetä tunnistamaan samaan lajiin kuuluviksi. *E. buchholzi* -lajia tavataan yleensä niityiltä sekä kulutukselle alttiina olevilta alueilta, esimerkiksi pientareilta.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Laji tunnettiin aiemmin nimellä *E.”minutus”*, mutta se on hiljattain kuvattu. Lajin löysi ensimmäisenä hampurilainen U. Graefe Sankt Peter-Ordingin kaupungin läheiseltä niityltä Saksan Schleswig-Holsteinista. *E. luxuriosus* on kooltaan noin puolet *E. albidus* -lajista, mutta suurikokoisempi kuin muut tässä mainitut lajit, mikä saattaa tehdä siitä hyvän vaihtoehdon *E. albidus* -lajille.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Tätä lajia on toistaiseksi tavattu Saksan ja Espanjan kivennäispitoisista maannoksista, joissa se on yleinen, muttei yleensä kovin runsaslukuinen. Heimon muihin pienikokoisiin lajeihin verrattuna sen tunnistaminen on yleensä suhteellisen helppoa. Sen käyttäytymistä laboratoriotesteissä tai herkkyyttä kemikaaleille ei tunneta lainkaan. Laji on kuitenkin todettu helpoksi kasvattaa (E. Belotti, henkilökohtainen keskustelu).

Kasvatusolosuhteet

Kaikkia edellä mainittuja *Enchytraeus*-lajeja voidaan kasvattaa samoissa substraateissa kuin *E. albidus* -lajia. Muiden lajien pienempi koko tarkoittaa, että kasvatusastiat voivat olla pienempiä, ja vaikka ruoka voi olla samaa, annoskokoa on syytä pienentää. Näiden lajien elinkaari on lyhyempi kuin E. albidus -lajilla, minkä vuoksi ruokaa on annettava useammin.

Testiolosuhteet

Testiolosuhteet ovat yleensä samat kuin *E. albidus* -lajilla lukuun ottamatta seuraavia seikkoja:

— testiastia voi olla pienempi (mutta sen ei ole pakko olla)

— lisääntymistestin kesto voi olla lyhyempi, esimerkiksi neljä viikkoa kuuden sijasta (mutta sen ei ole pakko olla); pitoisuusalueen määritystestin kestoa ei kuitenkaan pidä muuttaa

— matojen jälkeläiset ovat pienikokoisia, minkä vuoksi laskennassa on erittäin suositeltavaa käyttää värjäysmenetelmää

— hyväksyttävyyskriteeri, joka koskee poikasten määrää testiastiassa kontrollissa, muutetaan arvoksi 50.

▼**M6**

VIITTEET

(1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93–100.

▼M6

Lisäys 6

Talteenottomenetelmien tarkka kuvaus

Rose bengal -värjäys

Tämä menetelmä on alun perin kehitetty limnologiaa varten (1), ja sen käyttöä änkyrimadonpoikasten laskennassa änkyrimadoilla tehtävässä lisääntymistestissä esitti ensimmäisenä W. de Coen Ghentin yliopistosta Belgiasta. Modifioidun version, jossa rose bengal -väriaine sekoitetaan formaldehydiin etanolin sijasta, kehitti itsenäisesti RIVM Bilthoven (2), (3).

Varsinaisen testin lopussa eli noin kuuden viikon jälkeen testiastioissa oleva maa-aines siirretään matalaan säiliöön. Tarkoitukseen sopii hyvin laakea muovivati tai valokuvien kehittämiseen tarkoitettu vati, jossa on uritettu pohja, sillä urat estävät matojen liikkumista havaintoalueella. Poikaset kiinnitetään etanolilla (noin 5 ml rinnakkaisnäytettä kohti). Tämän jälkeen astiat täytetään vedellä niin, että pohjalla on 1–2 cm:n kerros. Veteen lisätään muutama tippa (200–300 µl) rose bengal -väriainetta (1-prosenttinen liuos etanolissa tai vaihtoehtoisesti 0,5-prosenttinen eosiini), minkä jälkeen komponentit sekoitetaan toisiinsa huolellisesti. Kun 12 tuntia on kulunut, madot ovat värjäytyneet punertaviksi ja makaavat substraatin pinnalla, josta ne on helppo laskea. Vaihtoehtoisesti substraatin ja alkoholin seos voidaan pestä seulassa (silmäkoko 0,250 mm) ennen matojen laskemista. Tällöin kaoliniitti, turve ja osa hiekasta huuhtoutuu pois, jolloin punertaviksi värjäytyneet madot on helpompi erottaa ja laskea. Laskemista helpottaa myös valaisimella varustettu suurennuslasi (linssin koko vähintään 100 × 75 mm ja suurennuskerroin 2–3).

Värjäysmenetelmää käytettäessä laskeminen vie vain muutaman minuutin astiaa kohti, ja ohjearvona voidaan todeta, että yhdeltä henkilöltä kaikkien yhdessä testissä käytettyjen astioiden arviointi vie yleensä enintään kaksi päivää.

Märkäerottaminen

Märkäerottaminen aloitetaan heti testin päätyttyä. Kaikkien testiastioiden maa-ainekset siirretään muovisiin siivilöihin, joiden silmäkoko on noin 1 mm. Tämän jälkeen siivilät asetetaan muovivateihin niin, että siivilät eivät kosketa vadin pohjaa. Vadit täytetään varovasti vedellä siten, että siivilöissä olevat näytteet jäävät kokonaan veden pinnan alapuolelle. Maa-aineksessa olevista madoista saadaan talteen yli 90 prosenttia, jos talteenotto kestää kolme vuorokautta 20 ± 2 °C:n lämpötilassa. Talteenottamisen lopuksi siivilät poistetaan ja vesi (pientä määrää lukuun ottamatta) dekantoidaan. Vatien pohjalla olevan sedimentin liikuttamista on varottava. Tämän jälkeen muovivateja ravistetaan kevyesti, jotta sedimentti suspendoituu vesikerrokseen. Vesi siirretään petrimaljaan ja maa-ainespartikkelien laskeuduttua änkyrimadot voidaan etsiä, poistaa ja laskea stereomikroskoopin ja pehmustettujen teräspihtien avulla.

Kelluttaminen

Kelluttamiseen perustuva menetelmä on kuvattu R. Kupermanin huomautuksessa (4). Kun testiastian sisältö on kiinnitetty etanolilla, maa-aineksen joukkoon kaadetaan runsaasti Ludox AM-30:tä (kolloidista silikaa, 30 painoprosentin suspensio vedessä) siten, että nesteen pinta on 10–15 mm maanpintaa ylempänä. Kun maa-ainesta ja kellutusainetta on sekoitettu perusteellisesti 2–3 minuuttia, pinnalla kelluvat madonpoikaset voidaan laskea helposti.

VIITTEET

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300–305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 s.

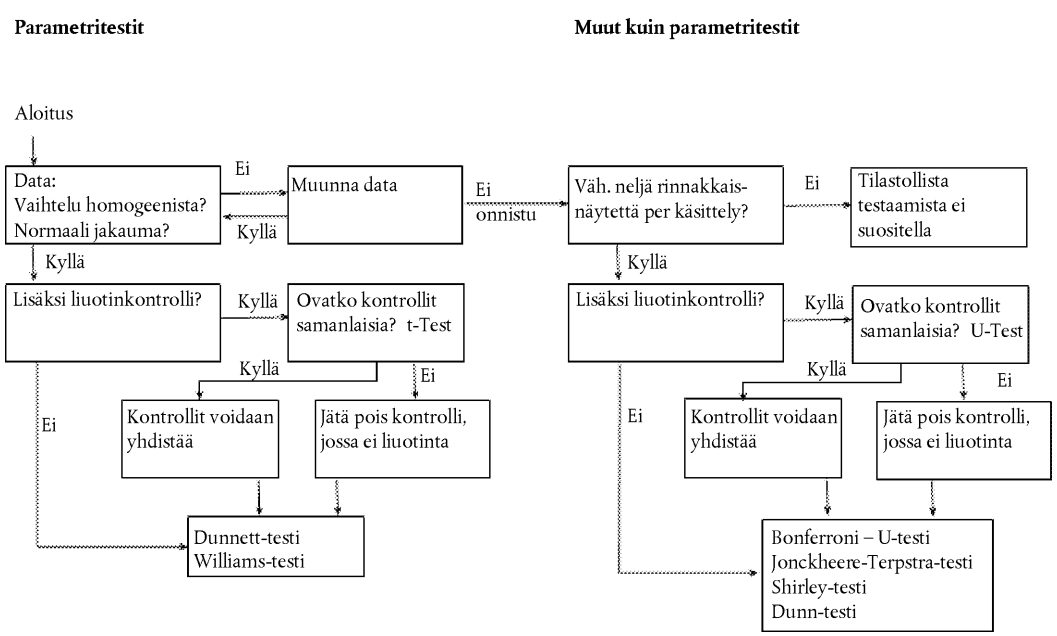
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108–121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, s. 157.

▼**M6**

Lisäys 7

Yhteenveto datan tilastollisesta arvioinnista (NOEC-arvon määrittäminen)



▼M6

C.33. LISÄÄNTYMISTESTI LIEROILLA (*EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI)*

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 222 (2004). Menetelmä on tarkoitettu käytettäväksi arvioitaessa maaperässä olevien kemikaalien vaikutuksia lierolajien Eisenia fetida (Savigny 1826) tai Eisenia andrei (Andre 1963) lisääntymiskykyyn sekä muihin subletaaleihin seikkoihin. Testiä on käytetty kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (3). Välitöntä myrkyllisyyttä lieroille testataan eri menetelmällä (4). Lieroilla tehtäviä välittömiä ja kroonisia vaikutuksia mittaavia testejä käsitellään useissa muissa kansainvälisissä ja kansallisissa ohjeissa (5), (6), (7), (8).

2. *Eisenia fetida / Eisenia andrei* -lajit katsotaan edustaviksi maaperän eläimistön ja etenkin lierojen joukossa. Lierojen ekologiasta ja niiden käytöstä ympäristömyrkyllisyyden tutkimuksessa on saatavilla taustatietoa (7), (9), (10), (11), (12).

TESTIN PERIAATE

3. Täysikasvuiset lierot altistetaan testikemikaalin eri pitoisuuksille joko sekoitettuna maa-ainekseen tai, jos kyseessä on torjunta-aine, lisättynä maahan tai maa-aineksen pinnalle menetelmällä, joka vastaa kemikaalin tavanomaista käyttöä. Applikointimentelmä määrittyy testin tarkoituksen mukaan. Testipitoisuuksien vaihteluväli valitaan siten, että se kattaa todennäköisesti sekä subletaaleja että tappavia vaikutuksia kahdeksan viikon aikana aiheuttavat pitoisuudet. Täysikasvuisten lierojen kuolleisuus ja niiden kasvulle aiheutuneet vaikutukset todetaan neljän viikon altistumisen jälkeen. Tämän jälkeen aikuiset poistetaan maa-aineksesta, ja vaikutukset lisääntymiselle arvioidaan neljä viikkoa myöhemmin laskemalla maa-aineksessa olevat poikaset. Testikemikaalille altistuneiden lierojen lisääntymiskykyä verrataan kontrollieläinten vastaavaan tulokseen, jotta voidaan määrittää i) pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (no observed effect concentration, NOEC) ja/tai ii) EC_x (esimerkiksi EC_{10} ja EC_{50}) käyttämällä regressiomallia, jonka avulla arvioidaan pitoisuus, joka vähentää lisääntymiskykyä x prosenttia. Testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella (esimerkiksi EC_{10}, EC_{50}), jotta EC_x saadaan interpoloimalla eikä ekstrapoloimalla (määritelmistä ks. lisäys 1).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

4. Sopivien testimenetelmien suunnittelun helpottamiseksi testikemikaalista pitäisi olla käytettävissä seuraavat tiedot:

   — vesiliukoisuus

   — log K_{ow}

   — höyrynpaine

   — sekä mahdollisuuksien mukaan tietoa kemikaalin kulkeutumisesta ja käyttäytymisestä ympäristössä (esimerkiksi fotolyysi- ja hydrolyysinopeus, jos ne ovat applikointitapojen kannalta merkityksellisiä).

5. Testimenetelmää voidaan käyttää kaikille kemikaaleille niiden vesiliukoisuudesta riippumatta. Testimenetelmää ei voida soveltaa haihtuviin kemikaaleihin. Näiksi määritellään tässä kemikaalit, joiden osalta Henryn vakio tai ilma-vesi-jakaantumiskerroin on suurempi kuin yksi, tai kemikaalit, joiden höyrynpaine on suurempi kuin 0,0133 Pa 25 °C:ssa.

6. Tässä testimenetelmässä ei oteta huomioon testikemikaalin mahdollista hajoamista testin kuluessa. Tästä syystä ei voida olettaa, että altistuspitoisuudet pysyvät alkuperäisellä tasolla koko testin ajan. Siksi suositeltavaa on tehdä testikemikaalille kemiallinen analyysi testin alussa ja lopussa.

▼M6

VERTAILUKEMIKAALI

7. Vertailukemikaalin NOEC-arvo ja/tai EC_x-arvo on määritettävä, jotta voidaan osoittaa, että laboratorion testiolosuhteet ovat asianmukaiset, sekä todeta, että testiorganismien vasteessa ei tapahdu ajan kuluessa tilastollisesti merkittävää muutosta. Vertailukemikaali on suotavaa testata vähintään kerran vuodessa tai, jos testausta tehdään harvemmin, rinnakkain määritettäessä testikemikaalin myrkyllisyyttä. Sopivia vertailukemikaaleja, joiden on osoitettu vaikuttavan lisääntymiseen, ovat karbendatsiimi tai benomyyli. Merkittäviä vaikutuksia tulisi esiintyä seuraavilla pitoisuuksilla: a) 1–5 mg tehoainetta yhtä kuivamassakiloa kohti tai b) 250–500 g/ha tai 25–50 mg/m^2. Jos testisarjaan sisältyy positiivinen myrkyllinen standardi, käytetään yhtä pitoisuutta, jolloin rinnakkaisnäytteitä on oltava yhtä monta kuin kontrolleja.

TESTIN VALIDITEETTI

8. Jotta testitulosta voidaan pitää luotettavana, seuraavien kriteerien on täytyttävä kontrolleissa:

— jokaisessa 10 täysikasvuista yksilöä sisältävässä rinnakkaisnäytteessä on tuotettu ≥ 30 jälkeläistä testin loppuun mennessä

— lisääntymisen variaatiokerroin on ≤ 30 prosenttia

— aikuisten kuolleisuus testin ensimmäisen neljän viikon aikana on ≤ 10 prosenttia.

Jos testi ei täytä näitä luotettavuuskriteerejä, se on keskeytettävä, ellei testin jatkamiselle ole perusteluita. Perustelut on kirjattava raporttiin.

TESTIN KUVAUS

Välineet

9. Käytettävien testisäiliöiden on oltava lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia, ja niiden tilavuus on noin 1–2 litraa. Säiliöiden poikkipinta-alan on oltava noin 200 cm_2, jotta kostean substraatin syvyydeksi tulee noin 5–6 cm, kun kuivaa substraattia lisätään 500–600 g. Säiliön kannen on päästettävä kaasut vaihtumaan substraatin ja ilmakehän välillä sekä päästettävä valoa lävitseen (tällainen on esimerkiksi rei'itetty läpinäkyvä kansi) samalla kun se estää lieroja pääsemästä ulos. Jos testisubstraattia käytetään huomattavasti enemmän kuin 500–600 g testisäiliötä kohti, lierojen määrää lisätään samassa suhteessa.

10. Testissä tarvitaan myös vakiolaboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

— kuivauskaappi

— stereomikroskooppi

— pH-mittari ja fotometri

— sopivia tarkkoja vaakoja

— asianmukaiset lämpötilan valvontalaitteet

— asianmukaiset ilmankosteuden valvontalaitteet (eivät välttämättömiä, jos altistusastiat on peitetty kansilla)

— inkubaattori tai pieni tila, jossa on ilmastointilaite

— pinsettejä, koukkuja tai silmukoita

— vesihaude.

▼M6

Keinomaan valmistus

11. Tässä testissä käytetään keinomaata (5), (7), jonka lopullinen koostumus on seuraava (kuivapainojen perusteella, kun ainekset on kuivattu vakiopainoon 105 °C:ssa):

— 10 prosenttia rahkaturvetta (pH-arvo mahdollisimman tarkasti välillä 5,5–6,0, ei kasvien jäänteitä näkyvissä, hienoksi jauhettuna ja kuivattuna mitattuun kosteuspitoisuuteen)

— 20 prosenttia (kuivapaino) kaoliinisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 prosenttia)

— 0,3–1,0 prosenttia kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$, hienoksia jauhettuna, analyysilaatuista), jotta pH-arvoksi testin alussa saadaan 6,0 ±0,5.

— noin 70 prosenttia ilmakuivattua teollisuushiekkaa (tarvittavan $CaCO_3$-määrän mukaan), ensisijaisesti hienoa hiekkaa, jonka hiukkasista yli puolet on kooltaan 50–200 mikronia.

Huomautus 1: Tarvittavaan $CaCO_3$:n määrään vaikuttavat maa-ainessubstraatin ainesosat, ja se on määritettävä tekemällä mittauksia maa-aineksen osanäytteistä juuri ennen testiä. pH-arvo mitataan näytteestä, joka on sekoitettu joko 1 M:n kaliumkloridiliuokseen (KCl) tai 0,01 M:n kalsiumkloridiliuokseen ($CaCl_2$) (13).

Huomautus 2: Keinomaan orgaanisen hiilen pitoisuutta voidaan pienentää esimerkiksi vähentämällä turvepitoisuus 4–5 prosenttiin ja lisäämällä hiekkapitoisuutta vastaavasti. Kun orgaanisen hiilen pitoisuus pienenee, testikemikaalin adsorboituminen maahan (orgaaniseen hiileen) saattaa heikentyä ja testikemikaalin saatavuus lieroille nousta. On osoitettu, että Eisenia fetida täyttää lisääntymiskriteerit, kun luonnonmaan orgaanisen hiilen pitoisuus on matala, esim. 2,7 prosenttia (14). Kokemuksen mukaan sama saadaan aikaan keinomaassa käyttämällä 5 prosenttia turvetta. Ennen kuin tällaista maa-ainesta käytetään varsinaisessa testissä, ei siis ole välttämätöntä osoittaa, että testi täyttää validiteettikriteerit keinomaata käytettäessä, ellei turpeen määrää vähennetä yllä mainittua enemmän.

Huomautus 3: Kun luonnollista maaperää käytetään myöhemmissä testeissä (esimerkiksi korkeamman tason testeissä), on maa-aineksen soveltuvuus ja testin hyväksyttävyyskriteerien täyttyminen osoitettava jälleen.

12. Maan kuivat ainesosat sekoitetaan perusteellisesti (esimerkiksi suurella laboratoriosekoittimella) hyvin ilmastoidussa tilassa. Ennen testin aloittamista kuiva keinomaa esikostutetaan lisäämällä deionisoitua vettä noin puoleen lopullisesta vesipitoisuudesta eli 40–60 prosenttiin enimmäisvedenpidätyskyvystä (mikä vastaa 50 ± 10 prosenttia kuivan massan kosteudesta). Näin saadaan substraatti, jossa ei ole seisovaa vettä, eikä siitä kädessä puristettaessa tihku vettä. Keinomaan enimmäisvedenpidätyskyky (WHC) määritetään lisäyksessä 2, standardissa ISO 11274 (15) tai vastaavassa EU-standardissa kuvattujen menetelmien mukaisesti.

13. Jos testikemikaalia levitetään maa-aineksen pinnalle tai sekoitetaan maa-ainekseen ilman vettä, veden lopullinen määrä voidaan sekoittaa keinomaahan sen valmistuksen aikana. Jos testikemikaali sekoitetaan maa-ainekseen veden joukossa, loppuvesi voidaan lisätä yhtä aikaa testikemikaalin kanssa (ks. 19 kohta).

14. Maaperän kosteuspitoisuus määritetään testin alussa ja lopussa standardin ISO 11465 (16) tai vastaavan EU-standardin mukaisesti ja maa-aineksen pH-arvo lisäyksen 3, standardin ISO 10390 (13) tai vastaavan EU-standardin

▼M6

mukaisesti. Nämä määritykset tehdään kontrollimaa-ainesnäytteestä sekä jokaista testipitoisuutta sisältävistä maa-ainesnäytteistä. Maa-aineksen pH-arvoa ei saa säätää happamia tai emäksisiä kemikaaleja testattaessa. Kosteuspitoisuutta on seurattava koko testin ajan punnitsemalla säiliöt säännöllisesti (ks. 26 ja 30 kohta).

Koe-eläinten valinta ja valmistelu

15. Testissä käytettävä laji on *Eisenia fetida* tai *Eisenia andrei* (1), (2). Testin aloittamiseen tarvitaan täysikasvuisia lieroja, jotka ovat iältään kahdesta kuukaudesta yhteen vuoteen ja joilla on clitellum. Lierot valitaan synkronoidusta viljelmästä, jonka ikärakenne on suhteellisen homogeeninen (lisäys 4). Testiryhmän yksilöiden ikäero saa olla enintään neljä viikkoa.

16. Valittuja lieroja totutetaan testissä käytettävään keinomaasubstraattiin vähintään yhden päivän ajan. Tänä aikana lieroille annetaan samaa ruokaa, jota käytetään testissä (ks. 31–33 kohdat).

17. Testin alussa kymmenen lieron ryhmät punnitaan yksitellen ja ryhmät sijoitetaan satunnaisesti testisäiliöihin. Lierot pestään ennen punnitusta (deionisoidulla vedellä) ja liika vesi poistetaan asettamalla madot hetkeksi aikaa suodatinpaperin päälle. Yksittäisten lierojen märkäpainon on oltava 250–600 mg.

Testipitoisuuksien valmistelu

18. Testikemikaalin applikoinnissa voidaan käyttää kahta eri menetelmää: testikemikaalin sekoittaminen maa-ainekseen (ks. 19–21 kohdat) tai applikointi maa-aineksen pinnalle (ks. 22–24 kohdat). Soveltuvan menetelmän valinta määräytyy testin tarkoituksen mukaan. Yleensä testikemikaalin sekoittaminen maahan on suositeltavaa. Mahdollisesti on kuitenkin syytä käyttää tavanomaisen maatalouskäytännön mukaisia applikointimenetelmiä (esimerkiksi nestemäisen valmisteen suihkuttaminen tai tiettyjen torjunta-ainevalmisteiden, kuten rakeiden tai siementen peittausaineen käyttäminen). Liuottimien, joilla helpotetaan maa-aineksen käsittelyä testikemikaalilla, valintaperusteena on vähäinen myrkyllisyys lieroille. Testijärjestelyyn sisällytetään sopiva liuotinkontrolli (ks. 27 kohta).

Testikemikaalin sekoittaminen maa-ainekseen

Vesiliukoinen testikemikaali

19. Testikemikaalista ja deionisoidusta vedestä valmistetaan välittömästi ennen testin aloittamista liuos, joka riittää yhden testipitoisuuden kaikkiin rinnakkaisnäytteisiin. Testiliuoksen valmistuksessa voidaan tarvita tukiliuotinta. Käytännöllisintä on valmistaa liuosta niin paljon, että sen avulla saadaan aikaan lopullinen kosteuspitoisuus (40–60 prosenttia enimmäisvedenpidätyskyvystä). Liuos sekoitetaan huolellisesti maa-ainessubstraattiin ennen sen siirtämistä testisäiliöön.

Veteen liukenematon testikemikaali

20. Testikemikaali liuotetaan pieneen määrään sopivaa orgaanista liuotinta (esimerkiksi asetonia) ja liuos sekoitetaan pieneen määrään hienoa kvartsihiekkaa tai ruiskutetaan sen päälle. Liuotin poistetaan tämän jälkeen haihduttamalla hiekkaa vetokaapissa vähintään muutaman minuutin ajan. Seuraavaksi käsitelty hiekka sekoitetaan huolellisesti esikostutetun keinomaan joukkoon. Tämän jälkeen lisätään (tarvittava määrä) deionisoitua vettä ja sekoitetaan se keinomaan joukkoon siten, että lopulliseksi kosteuspitoisuudeksi saadaan 40–60 prosenttia enimmäisvedenpidätyskyvystä. Nyt maa-aines on valmis siirrettäväksi testisäiliöihin. On syytä pitää mielessä, että jotkin liuottimet voivat olla myrkyllisiä lieroille.

▼M6

Veteen ja orgaanisiin liuottimiin liukenematon testikemikaali

21. Aluksi valmistetaan seos, jossa on 10 g teollisuuskäyttöön tarkoitettua, hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa sekä testipitoisuuden aikaansaamiseksi tarvittava määrä testikemikaalia. Seuraavaksi seos sekoitetaan huolellisesti esikostutetun keinomaan joukkoon. Tämän jälkeen lisätään tarvittava määrä deionisoitua vettä ja sekoitetaan se keinomaan joukkoon siten, että lopulliseksi kosteuspitoisuudeksi saadaan 40–60 prosenttia enimmäisvedenpidätyskyvystä. Nyt maa-aines on valmis siirrettäväksi testisäiliöihin.

Testikemikaalin applikointi maan pintakerrokseen

22. Maa-aines käsitellään vasta sitten, kun lierot on lisätty. Testisäiliöt täytetään ensin kostutetulla maa-ainessubstraatilla, minkä jälkeen punnitut lierot asetetaan pinnalle. Terveet lierot kaivautuvat normaalisti välittömästi substraattiin, minkä vuoksi kaikki pinnalla vielä 15 minuutin kuluttua olevat lierot määritellään vahingoittuneiksi, jolloin ne on vaihdettava. Jos lieroja on vaihdettava, uudet ja pois vaihdettavat lierot punnitaan, jotta lierojen altistusryhmän yhteenlaskettu elävä paino sekä lieroja sisältävän säiliön kokonaispaino testin alussa on tiedossa.

23. Tämän jälkeen lisätään testikemikaali. Testikemikaalia ei pidä lisätä maa-ainekseen ensimmäisen puolen tunnin kuluttua siitä, kun lieroja on lisätty (tai jos lieroja on vielä maa-aineksen pinnalla), jotta vältetään suora altistus testikemikaalille ihokontaktin kautta. Jos testikemikaali on torjunta-aine, voi olla tarpeen applikoida se maan pintakerrokseen suihkuttamalla. Testikemikaali tulee applikoida maan pinnalle mahdollisimman tasaisesti käyttämällä sopivaa laboratoriossa käytettävää suihkutuslaitetta. Näin simuloidaan torjunta-aineen suihkuttamista pellolla. Ennen applikointia testisäiliön kansi poistetaan ja sen tilalle asetetaan reunasuoja, joka suojaa suihkeelta astian sivuseiniä. Reunasuojana voi olla testisäiliö, josta pohja on poistettu. Applikointi tulisi tehdä olosuhteissa, joissa lämpötila vaihtelee 20 ± 2 °C. Vesiliuokset, emulsiot tai dispersiot tulee applikoida veden annostusnopeudella, joka on 600–800 µl/m^2. Nopeus on varmistettava käyttämällä asianmukaista kalibrointitekniikkaa. Tietyt valmisteet, kuten rakeet tai siementen peittausaineet, applikoidaan samalla tavalla kuin maataloudessa.

24. Testisäiliöt jätetään ilman kantta tunnin ajaksi, jotta applikoinnin yhteydessä vapautunut haihtuva liuotin ehtii haihtua. Tänä aikana on pidettävä huolta, ettei yksikään liero pääse poistumaan testiastioista.

MENETTELY

Testi- ja kontrolliryhmät

25. Suositeltava määrä on 10 lieroa per 500–600 g keinomaan kuivamassaa (eli 50–60 maa-ainesta lieroa kohti). Jos maa-ainesta käytetään enemmän esimerkiksi testattaessa torjunta-aineita, jotka applikoidaan siementen peittausaineena tai muulla erityisellä tavalla, maa-aineksen määränä lieroa kohti pidetään edelleen 50–60 g lisäämällä lierojen määrää. Jokaista kontrolli- ja käsittelysäiliötä varten varataan kymmenen lieroa. Lierot pestään vedellä ja pyyhitään kuiviksi, minkä jälkeen ne sijoitetaan hetkeksi aikaa imupaperille, jotta ylimääräinen vesi poistuu.

26. Lieroja testisäiliöihin jaettaessa on pyrittävä välttämään systemaattisia virheitä, minkä vuoksi testipopulaation tasalaatuisuus todetaan punnitsemalla yksitellen 20 lieroa, jotka on valittu satunnaisesti samasta populaatiosta, josta testilierot valitaan. Kun tasalaatuisuus on todettu, lieroerät valitaan, punnitaan ja siirretään testisäiliöihin satunnaistetulla menettelyllä. Testilierojen lisäämisen jälkeen kaikki testisäiliöt punnitaan, jotta saadaan määritettyä

▼M6

alkupaino, jota voidaan käyttää maa-aineksen kosteuspitoisuuden seuraamisessa koko testin ajan 30 kohdassa kuvatulla tavalla. Tämän jälkeen testisäiliöt peitetään, kuten 9 kohdassa on kuvattu, ja sijoitetaan testikammioon.

27. Jokaista testikemikaalin 18–24 kohdassa kuvattua applikointimenetelmää varten valmistetaan sopiva kontrollinäyte. Kontrollien valmistuksessa noudatetaan sopivia kuvattuja menetelmiä, mutta testikemikaalia ei lisätä. Kontrolleihin lisätään siis tarvittaessa orgaanisia liuottimia, kvartsihiekkaa tai muuta kantoainetta samana pitoisuutena tai saman verran kuin käsittelyihin. Jos testikemikaalin lisäämisessä käytetään liuotinta tai muuta kantoainetta, on lisäksi valmistettava kontrolli, jossa ei käytetä kantoainetta tai testikemikaalia. Kontrollin testaamisella varmistetaan, että kantoaineella ei ole vaikutusta tulokseen.

Testiolosuhteet

28. Testauslämpötila on 20 °C ± 2 °C. Testi toteutetaan valoisaa ja pimeää aikaa säätelemällä (mieluiten 16 tuntia valoisaa ja 8 tuntia pimeää). Testiastioiden alueella tulisi olla 400–800 luksin valaistus.

29. Testisäiliöitä ei ilmasteta testin aikana, mutta testiastioiden kansien on päästettävä kaasut vaihtumaan samalla, kun ne estävät kosteuden haihtumista (ks. 9 kohta).

30. Testisäiliöissä olevan maa-ainessubstraatin vesipitoisuutta pidetään yllä koko testin ajan punnitsemalla testisäiliöt säännöllisesti uudelleen (ilman kansia). Hävikki korvataan tarpeen mukaan deionisoidulla vedellä. Vesipitoisuus ei saa vaihdella enempää kuin 10 prosenttia testin alussa mitatusta.

Ruokinta

31. Sopivaksi ruoaksi katsotaan kaikki sellainen, jolla lierojen painon on todettu pysyvän vähintään samana. Kokemus on osoittanut, että sopivaa ravintoa ovat kaurahiutaleet tai lehmän- tai hevosenlanta. On syytä tarkistaa, että naudat tai hevoset, joista lanta on peräisin, eivät saa lääkitystä tai niitä ei hoideta kemikaaleilla, kuten kasvunedistäjillä, nematisideilla tai muilla eläinlääkinnällisillä valmisteilla, jotka saattavat vaikuttaa lieroihin haitallisesti testin aikana. Suositeltavaa on itse kerätty lehmänlanta, sillä kokemus on osoittanut, että kaupallisesti saatavilla olevalla, puutarhalannoitteena käytettävällä lehmänlannalla voi olla lieroille haitallisia vaikutuksia. Lanta ilmakuivataan, jauhetaan hienoksi ja pastöroidaan ennen käyttöä.

32. Uutta ruokaerää annetaan aina ensin testiin osallistumattomille lieroille ennen kuin sitä käytetään testissä, jotta erän laadun voidaan todeta olevan sopiva. Kasvun ja munakoteloiden tuotannon ei pidä vähentyä verrattuna lieroihin, joiden substraatissa ei ole uutta ruokaerää (olosuhteet vastaavat testimenetelmän C.8 kohdassa 4 kuvattuja olosuhteita).

33. Ensimmäinen ruokintakerta on yksi vuorokausi sen jälkeen, kun madot on tuotu säiliöön ja testikemikaalia lisätty maa-ainekseen. Noin viisi grammaa ruokaa levitetään kussakin säiliössä olevan maa-aineksen pinnalle ja kostutetaan deionisoidulla vedellä (noin 5–6 ml säiliötä kohti). Tämän jälkeen ruokaa annetaan kerran viikossa neljä viikkoa kestävän testin aikana. Jos

▼M6

ruokaa jää syömättä, annosta pienennetään niin, että ruokaan ei tule sienikasvustoja tai hometta. Täysikasvuiset yksilöt poistetaan maa-aineksesta testin päivänä 28. Tämän jälkeen jokaiseen testisäiliöön lisätään vielä viisi grammaa ruokaa. Neljän jäljellä olevan testiviikon aikana ruokintaa ei enää jatketa.

Testipitoisuuksien valinta

34. Sopivien testipitoisuuksien valinnassa auttaa testikemikaalin myrkyllisyydestä saatu aiempi tieto, joka on peräisin esimerkiksi välitöntä myrkyllisyyttä koskevasta testistä (4) ja/tai pitoisuusalueen määritystutkimuksista. Tarvittaessa pitoisuusalueen määritystesti toteutetaan esimerkiksi siten, että siinä on viisi testipitoisuutta (0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg/kg maa-aineksen kuivamassaan nähden). Jokaisesta käsittelystä riittää yksi rinnakkaisnäyte ja kontrolli. Pitoisuusalueen määritystesti kestää kaksi viikkoa, ja kuolleisuus arvioidaan testin lopussa.

Testijärjestely

35. Testille ei voi osoittaa yksittäistä yhteenvetotilastoa, joten testimenetelmä sallii sekä NOEC-arvon että EC_x-arvon määrittämisen. NOEC-arvo on se, jota sääntelyviranomaiset todennäköisesti edellyttävät lähitulevaisuudessa. Tilastollisten ja ekologisten näkökohtien vuoksi EC_x-arvoa saatetaan ryhtyä jatkossa käyttämään laajemmin. Tästä syystä ja änkyrimatojen lisääntymistestimenetelmää koskevan yhteistutkimuksen johdosta tehtyjen suositusten perusteella esitetään kolmea mahdollista testijärjestelyä (17).

36. Pitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— NOEC-arvoa määritettäessä testataan vähintään viisi/kaksitoista pitoisuutta geometrisessa sarjassa. Jokaista testipitoisuutta kohti suositellaan neljää rinnakkaisnäytettä ja kahdeksaa kontrollia. Pitoisuudet on porrastettava kertoimella, joka saa olla enintään 2,0.

— EC_x-arvoa (esimerkiksi EC_{10}, EC_{50}) määritettäessä suositellaan käytettäväksi niin montaa pitoisuutta, että saadaan aikaan vähintään neljä tilastollisesti erittäin merkitsevästi poikkeavaa keskivastetta. Jokaista testipitoisuutta kohti suositellaan vähintään kahta rinnakkaisnäytettä ja kuutta kontrollirinnakkaisnäytettä. Porrastuskerroin voi vaihdella ja olla enintään 1,8 odotetulla vaikutusalueella sekä yli 1,8 tätä suuremmilla ja pienemmillä pitoisuuksilla.

— Yhdistetty lähestymistapa mahdollistaa sekä NOEC- että EC_x-arvon määrittämisen. Tällöin käytetään kahdeksaa käsittelypitoisuutta geometrisessa sarjassa. Jokaista käsittelyä kohti suositellaan neljää rinnakkaisnäytettä ja kahdeksaa kontrollia. Pitoisuudet on porrastettava kertoimella, joka saa olla enintään 1,8.

Testin kesto ja mittaukset

37. Testin päivänä 28 elävät täysikasvuiset lierot tutkitaan ja lasketaan. Samalla kirjataan muistiin mahdollinen epätavallinen käyttäytyminen (esimerkiksi kyvyttömyys kaivautua maa-ainekseen tai makaaminen liikkumatta) sekä morfologiset poikkeavuudet (esimerkiksi avohaavat). Tämän jälkeen kaikki täysikasvuiset poistetaan testiastioista, ja ne lasketaan ja punnitaan. Täysikasvuisten yksilöiden löytämistä helpottaa, jos lierot sisältävä maa-aines siirretään puhtaalle tarjottimelle ennen arviointia. Maa-aineksesta talteenotetut lierot pestään ennen punnitusta (deionisoidulla vedellä) ja liika vesi poistetaan asettamalla lierot hetkeksi aikaa suodatinpaperin päälle. Lierot, joita ei tässä yhteydessä löydetä, on kirjattava kuolleiksi, sillä oletuksena on, että ne ovat kuolleet ja maatuneet ennen arviointia.

▼M6

38. Jos maa-aines on poistettu säiliöistä, se siirretään takaisin (ilman täysikasvuisia lieroja, mutta mahdollisesti tuotetut munakotelot ovat edelleen mukana). Tämän jälkeen maa-ainesta inkuboidaan vielä neljä viikkoa samoissa testiolosuhteissa, mutta ruokinta tapahtuu vain kerran tämän testivaiheen alussa (ks. 33 kohta).

39. Toisen neljä viikkoa kestävän jakson lopulla munakoteloista testimaa-aineksessa kuoriutuneiden poikasten määrä sekä munakoteloiden määrä todetaan lisäyksessä 5 kuvattuja menettelyjä käyttämällä. Kaikki lieroille aiheutuneet vauriot on myös kirjattava koko testin keston ajan.

Raja-annostesti

40. Jos pitoisuusalueen määritystestissä ei havaita vaikutuksia suurimmalla pitoisuudella (esimerkiksi 1 000 mg/kg), lisääntymistesti toteutetaan raja-annostestinä käyttäen testipitoisuutta 1 000 mg/kg. Raja-annostestin avulla voidaan osoittaa, että lisääntymisen NOEC-arvo on rajapitoisuutta korkeampi, mutta samalla testissä käytettyjen lierojen määrä voidaan pitää mahdollisimman pienenä. Sekä käsitellyn maa-aineksen että kontrollin osalta käytetään kahdeksaa rinnakkaisnäytettä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

41. Lisäyksessä 6 olevaa yhteenvetoa lukuun ottamatta tähän testimenetelmään ei kuulu tarkoin määriteltyä tilastollista menetelmää testitulosten analysointia varten.

42. Yksi tutkittavista ominaisuuksista on kuolleisuus. Muutokset käyttäytymisessä (esimerkiksi kyvyttömyys kaivautua maa-ainekseen tai makaaminen liikkumatta testiastian lasiseinämää vasten) ja morfologiassa (esimerkiksi avohaavat) sekä mahdollisten poikasten esiintyminen on kuitenkin myös syytä kirjata muistiin. LC_{50}-arvo määritetään normaalisti tilastollista koestusta (18) tai logistista regressiota käyttämällä. Tapauksissa, joihin tämä analyysimenetelmä ei sovellu (esimerkiksi silloin, kun osittaista kuolleisuutta havaitaan alle kolmessa pitoisuudessa), voidaan kuitenkin käyttää muita menetelmiä. Näitä ovat esimerkiksi liukuva keskiarvo (19), viritetty Spearmanin ja Kärberin menetelmä (20) tai yksinkertainen interpolointi (esimerkiksi LC_0:n ja LC_{100}:n geometrinen keskiarvo laskettuna LC_0:n neliöjuuresta kerrottuna LC_{100}:lla).

43. Toinen tutkittava ominaisuus on hedelmällisyys eli esimerkiksi tuotettujen poikasten lukumäärä. Pitoisuusalueen määritystestin tavoin kaikki muut merkit kemikaalin vaarallisuudesta on kuitenkin kirjattava loppuraporttiin. Tilastollinen analyysi edellyttää, että lisääntymisestä lasketaan aritmeettinen keskiarvo$\overline{x}$ ja keskihajonta kutakin käsittelyä ja kontrollia kohti.

44. Varianssianalyysiä tehtäessä keskihajonta s ja vapausaste (df) voidaan korvata yhdistetyllä varianssianalyysistä saadulla varianssiestimaatilla ja sen vapausasteilla sillä ehdolla, että varianssi ei ole riippuvainen pitoisuudesta. Tässä tapauksessa käytetään kontrollin ja käsittelyiden yksinkertaisia variansseja. Kaupalliset tilasto-ohjelmistot laskevat nämä arvot yleensä käyttämällä astiakohtaisia tuloksia rinnakkaisnäytteinä. Jos negatiivisista kontrolleista ja liuotinkontrolleista saadun datan yhdistäminen vaikuttaa järkevämmältä kuin testaaminen johonkin niistä verraten, ne on testattava, jotta voidaan todeta, etteivät ne eroa toisistaan merkittävästi (sopivasta testistä ks. 47 kohta ja lisäys 6).

45. Muut tilastolliset testit ja interferenssi riippuvat siitä, ovatko rinnakkaisnäytteiden arvot normaalijakaumalla ja varianssiin nähden homogeenisia.

▼M6

NOEC-estimointi

46. Huomiota kiinnitetään ennen kaikkea testien voimaan. Kun halutaan arvioida, noudattaako data suurin piirtein normaalijakaumaa, hyödynnetään esimerkiksi aiemmista yhteistutkimuksista saatua tietoa tai muuta historiallista tietoa. Kriittisempi on varianssin homogeenisuus (homoskedastisuus). Kokemuksen perusteella varianssi usein kasvaa keskiarvon noustessa, ja tässä tilanteessa datan muuntaminen saattaa johtaa homoskedastisuuteen. Muunnosten täytyy kuitenkin perustua historiallisesta tiedosta saatuun kokemukseen tutkittavana olevan datan asemasta. Jos data on homogeenista, tehdään useita t-testejä, esimerkiksi Watsonin-Williamsin testi (α = 0,05, yksisuuntainen) (21), (22) tai joissakin tapauksissa Dunnettin testi (23), (24). On syytä huomata, että jos rinnakkaisnäytteitä ei ole yhtä paljon, taulukon t-arvoja on korjattava Dunnettin ja Williamsin esittämillä tavoilla. Suuren variaation vuoksi vasteet eivät aina kasva tai pienene säännönmukaisesti ja monotonisuudesta poiketaan voimakkaasti, jolloin Dunnettin testi sopii tarkoitukseen paremmin. Jos homoskedastisuudessa on poikkeamia, voi olla tarpeen tutkia tarkemmin mahdollisia vaikutuksia variansseihin, jotta saadaan selville, voiko t-testejä käyttää testien voimasta tinkimättä (25). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää moninkertaista U-testiä, esimerkiksi Bonferroni-U-testiä Holmin mukaan (26). Jos datassa ilmenee heteroskedastisuutta, mutta se vastaa muutoin taustalla olevaa monotonista annosvastetta, voidaan käyttää myös muuta parametritonta testiä, esimerkiksi Jonckheere-Terprstran testiä (27), (28) tai Shirley-testiä (29), (30). Viimeksi mainitut ovat yleensä suositeltavampia kuin t-testit, joissa varianssit ovat heterogeenisiä. (Ks. myös lisäyksen 6 kaavio.)

47. Jos raja-arvotesti on tehty ja parametritestimenetelmien edellytykset (yleensä homogeenisuus) täyttyvät, voidaan käyttää parittaista Studentin t-testiä tai muussa tapauksessa Mann-Whitneyn U-testimenetelmää (31).

EC_x-pitoisuuden arviointi

48. Kaikkia EC_x-arvoja laskettaessa käsittelykohtaisia keskiarvoja käytetään regressioanalyysissa (lineaarisessa tai epälineaarisessa) sen jälkeen, kun on muodostettu sopiva annosvastefunktio. Kun lierojen kasvu on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida sopivalla regressioanalyysillä (32). Sopivia funktioita dikotomisia tietoja varten (kuolleisuus/eloonjääminen ja tuotettujen jälkeläisten määrä) ovat tavanomaiset S-funktio, logistinen funktio tai Weibullin funktio, jotka sisältävät 2–4 parametria, joista osalla voidaan mallintaa myös hormeettisia vasteita. Jos annosvastefunktio on sovitettu lineaarisella regressioanalyysilla, merkitsevä r^2 (determinaatiokerroin) ja/tai kaltevuus on etsittävä regressioanalyysilla, minkä jälkeen EC_x arvioidaan käyttämällä kontrollikeskiarvon x prosenttia vastaavaa arvoa regressioanalyysilla muodostetussa yhtälössä. Seuraavaksi 95 prosentin luottamusvälit lasketaan Fiellerin mukaan (teoksessa Finney (18)) tai jollakin muulla sopivalla, nykyaikaisella menetelmällä.

49. Vaihtoehtoisesti vaste voidaan mallintaa prosentti- tai muuna osuutena malliparametrista, joka tulkitaan kontrollin keskimääräiseksi vasteeksi. Tällöin normaali (logistinen, Weibullin) s-käyrä voidaan sovittaa helposti tuloksiin hyödyntämällä probitti-regressiomenetelmää (18). Painotusfunktiota on mukautettava metrisiin vasteisiin Christensenin esimerkin mukaan (33). Jos hormeesia on havaittu, probittianalyysin sijasta on käytettävä neliparametrista logistista tai Weibullin funktiota, joka sovitetaan epälineaarisella regressiomenetelmällä (34). Jos dataan ei saada sovitettua sopivaa annosvastefunktiota, voidaan ECx:n ja sen luottamusvälien estimoinnissa käyttää jotain muuta menetelmää, kuten Thompsonin liukuvaa keskiarvoa (19) tai viritettyä Spearman ja Kärberin menetelmää (20).

TESTIRAPORTTI

50. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

▼**M6**

Testikemikaali:

— testikemikaalin kattava kuvaus, erät ja CAS-numero sekä puhtaus

— testikemikaalin ominaisuudet (esimerkiksi log K_{ow}, vesiliukoisuus, höyrynpaine, Henryn vakio (H) sekä tiedot testikemikaalin kulkeutumisesta ja käyttäytymisestä.

Testiorganismit:

— käytetyt koe-eläimet: lajit, tieteellinen nimi, organismien lähde ja kasvatusolosuhteet

— testiorganismien ikä ja kokoluokka (massana)

Testiolosuhteet

— tiedot testimaa-aineksen valmistuksesta

— maa-aineksen enimmäisvedenpidätyskyky

— kuvaus tekniikasta, jolla testikemikaali on applikoitu maa-ainekseen

— tiedot kemikaalin annostelussa käytetyistä kemiallisista apuaineista

— ruiskutuslaitteiden kalibrointitiedot (tarvittaessa)

— kuvaus testijärjestelystä ja käytetyistä menettelyistä

— testisäiliöiden koko ja testimaa-aineksen määrä

— testiolosuhteet: valoteho, valoisien ja pimeiden jaksojen kesto, lämpötila

— kuvaus eläinten ruokinnasta; testissä käytetyn ruoan tyyppi ja määrä, ruokintapäivämäärät

— maa-aineksen pH ja vesipitoisuus testin alussa ja lopussa.

Testitulokset:

— täysikasvuisten kuolleisuus (prosentteina) jokaisessa testisäiliössä testin ensimmäisen neljän viikon lopussa

— täysikasvuisten yksilöiden kokonaismassa testin alussa jokaisessa testisäiliössä

— elävien täysikasvuisten yksilöiden ruumiinpainossa tapahtunut muutos (prosentteina alkupainosta) jokaisessa testisäiliössä testin ensimmäisen neljän viikon jälkeen

— jokaisessa testiastiassa tuotettujen poikasten määrä testin lopussa

— kuvaus selvistä patologisista oireista tai selkeistä muutoksista käyttäytymisessä

— vertailutestikemikaalista saadut tulokset

— LC_{50}-arvo, NOEC-arvo ja/tai EC_x (esimerkiksi EC_{50}, EC_{10}) lisääntymisen osalta, jos jotain näistä voidaan soveltaa luottamusvälien puitteissa, sekä käyrä sen laskennassa käytetystä sovitetusta mallista kaikki tiedot ja havainnot, jotka helpottavat tulosten tulkintaa

— annosvastesuhdetta esittävä käyrä

— jokaiseen testisäiliöön sovellettavat tulokset.

Lisäksi ilmoitetaan poikkeukset tässä testimenetelmässä kuvatuista menettelyistä ja kaikki testin aikana ilmenneet epätavallisuudet.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Jaenicke, J. (1982). ”*Eisenia foetida*” is two biological species. Megadrilogica 4, 6–8.

(2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm – III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277–282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. Teoksessa: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlin-Dahlem, 320, s. 50–82.

(4) Tämän liitteen luku C.8 Myrkyllisyystutkimus madoilla.

(5) International Organisation for Standardization (ISO) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

(6) International Organisation for Standardization (ISO) (1993). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 s.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

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

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

(13) International Organisation for Standardization (ISO) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. Teoksessa: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.

(15) International Organisation for Standardization (ISO) (1992). Soil Quality –Determination of water retention characteristics –Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.

(16) International Organisation for Standardization (ISO) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 s.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. – Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714–719; korjaus Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103–117.

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519–531.

(23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096–1121.

(24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482–491.

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355–361

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65–70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327–333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144–151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183–186.

(31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213–221.

(34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC_{50} and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25–32.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä sovelletaan seuraavia määritelmiä:

Kemikaali: aine tai seos.

EC_x (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia): Pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC_{50} on pitoisuus, jolla arvioidaan testin lopussa olevan 50 prosentin vaikutus altistuksen kohteeksi joutuneeseen populaatioon määritellyn altistusajan kuluessa. Tässä testissä kaikki vaikuttavat pitoisuudet ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti.

LC_0 (ei tappava pitoisuus): Testikemikaalin pitoisuus, joka ei aiheuta lainkaan altistuneiden testiorganismien kuolleisuutta tietyn ajanjakson aikana. Tässä testissä LC_0 ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti.

LC_{50} (mediaani tappava pitoisuus): Testikemikaalin pitoisuus, joka aiheuttaa 50 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa tietyn ajanjakson aikana. Tässä testissä LC_{50} ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti.

LC_{100} (täysin tappava pitoisuus): Testikemikaalin pitoisuus, joka aiheuttaa 100 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa tietyn ajanjakson aikana. Tässä testissä LC_{100} ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla on tilastollisesti merkittävä vaikutus ($p < 0,05$). Tässä testissä LOEC ilmaistaan testikemikaalin massana testimaa-aineksen kuivamassaa kohti. Kaikilla LOEC-pitoisuuden ylittävillä testipitoisuuksilla vaikutuksen olisi normaalisti oltava kontrollista tilastollisesti poikkeava. Kaikki poikkeamat edellä mainitusta on perusteltava testiraportissa.

NOEC (pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia): LOEC-arvoa välittömästi seuraava testikemikaalin korkein pitoisuus, josta ei ole havaittavaa vaikutusta. Tässä testissä NOEC-arvoa vastaavalla pitoisuudella ei ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta ($p < 0,05$) tietyn altistusajan kuluessa kontrolliin verrattuna.

Lisääntymiskyky: testijakson kuluessa tuotettujen poikasten keskimäärä täysikasvuisten lierojen määrään verrattuna.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M6

Lisäys 2

Maan enimmäisvedenpidätyskyvyn määrittäminen

Seuraavan menetelmän on havaittu olevan tarkoituksenmukainen maan enimmäisvedenpidätyskyvyn määrittämisessä. Menetelmä on kuvattu standardin ISO DIS 11268-2 liitteessä C (1).

Kerää tietty määrä (esimerkiksi viisi grammaa) testimaasubstraattia sopivalla näytteenottovälineellä (kierrekairalla tms.). Aseta kierrekairaputken pohjalle pala märkää suodatinpaperia, ja laita se sitten telineessä vesiastiaan. Putki upotetaan veteen vähitellen, kunnes vedenpinta on maanäytteen yläpuolella. Sen jälkeen näytettä pidetään vedessä noin kolme tuntia. Kaikkea maa-aineksen kapillaareihin imeytynyttä vettä ei pystytä pidättämään, minkä vuoksi maanäytettä valutetaan kahden tunnin ajan asettamalla putki hyvin märkään kerrokseen hienojakoista kvartsihiekkaa, joka on laitettu suljettuun astiaan (kuivumisen estämiseksi). Tämän jälkeen näyte punnitaan, kun se on kuivattu vakiomassaan 105 °C:ssa. Nyt vedenpidätyskyky (WHC) voidaan laskea seuraavasti:

$$\text{WHC (prosenttiosuus kuivamassasta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

jossa:

S = vesikyllästetty substraatti + putken massa + suodatinpaperin massa

T = taara (putken massa + suodatinpaperin massa)

D = substraatin kuivamassa.

VIITTEET:

(1) International Organisation for Standardization (ISO) (1996). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

▼**M6**

Lisäys 3

Maan pH:n määrittäminen

Seuraava menetelmä, jolla määritetään maan pH-arvo, perustuu maan laatua koskevassa standardissa ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (1) olevaan kuvaukseen.

Tietyn määrän maata annetaan kuivua huoneenlämmössä vähintään 12 tunnin ajan. Sen jälkeen maasta valmistetaan suspensio (joka sisältää vähintään viisi grammaa maata), jonka tilavuus on viisinkertainen joko analyyttista laatua olevaan 1 M:n kaliumkloridiliuoksen (KCl) tilavuuteen tai analyyttista laatua olevaan 0,01 M:n kalsiumkloridiliuokseen ($CaCl_2$) nähden. Sen jälkeen suspensiota ravistetaan perinpohjaisesti viisi minuuttia, ja sen annetaan asettua vähintään kaksi mutta enintään 24 tuntia. Nestefaasin pH-arvo mitataan pH-mittarilla, joka kalibroidaan ennen jokaista mittausta käyttämällä asianmukaisia puskuriliuoksia (esimerkiksi pH 4,0 ja 7,0).

VIITTEET:

(1) International Organisation for Standardization (ISO) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼M6

Lisäys 4

Eisenia fetida / Eisenia andrei lajien kasvatus

Kasvatuspaikaksi suositellaan ilmasto-olosuhteiltaan säädettävää kaappia, jonka lämpötila on 20 °C ± 2 °C. Tässä lämpötilassa riittävästi ruokitut lierot tulevat sukukypsiksi noin 2–3 kuukaudessa.

Kumpaakin lajia voidaan kasvattaa hyvin erilaisissa eläinjätteissä. Suositeltava kasvatusalusta on hevosen- tai lehmälantaa ja turvetta suhteessa 50:50. On syytä tarkistaa, että naudat tai hevoset, joista lanta on peräisin, eivät saa lääkitystä tai niitä ei hoideta kemikaaleilla, kuten kasvunedistäjillä, nematisideilla tai muilla eläinlääkinnällisillä valmisteilla, jotka saattavat vaikuttaa lieroihin haitallisesti testin aikana. Suositeltavaa on luomuviljelmältä itse kerätty lanta, sillä kokemus on osoittanut, että kaupallisesti saatavilla olevalla, puutarhalannoitteena käytettävällä lannalla voi olla lieroille haitallisia vaikutuksia. Aineen pH-arvon on oltava noin 6–7 (sitä säädellään kalsiumkarbonaatilla). Ionisen johtavuuden on oltava matala (alle 6 mS/cm tai suolapitoisuus alle 0,5 %), eikä kasvatusalustassa saa olla liikaa ammoniakkia tai eläinten virtsaa. Alustan on oltava kostea mutta ei liian märkä. Kasvatuslaatikon sopiva koko on 10–50 litraa.

Jotta saadaan vakioikäisiä ja -painoisia lieroja, viljelmä on paras aloittaa munakoteloilla. Kun viljelmä on perustettu, sitä pidetään yllä sijoittamalla täysikasvuisia lieroja kasvatuslaatikkoon, jossa on tuoretta substraattia, 14–28 vuorokauden ajaksi, jolloin saadaan lisää munakoteloita. Tämän jälkeen täysikasvuiset yksilöt poistetaan, ja munakoteloista kuoriutuneita poikasia voidaan käyttää seuraavan viljelmän perustana. Lieroja ruokitaan jatkuvasti eläinjätteellä, ja ne siirretään säännöllisin väliajoin tuoreeseen substraattiin. Kokemus on osoittanut, että sopivaa ravintoa ovat hienoksi jauhettu lehmän- tai hevosenlanta tai jauhetut kaurahiutaleet. On syytä varmistaa, että naudat tai hevoset, joista lanta on peräisin, eivät saa lääkitystä tai niitä ei hoideta kemikaaleilla, kuten kasvunedistäjillä, jotka saattavat vaikuttaa lieroihin haitallisesti pitkäaikaisen viljelyn aikana. Munakoteloista kuoriutuneita lieroja käytetään testaamisessa, kun ne ovat iältään 2–12 kuukautta ja katsotaan täysikasvuisiksi.

Lieroja pidetään terveinä, jos ne liikkuvat substraatin läpi, eivät yritä poistua substraatista ja lisääntyvät jatkuvasti. Lierojen hyvin hidas liikkuminen tai keltainen peräpää viittaa substraatin ehtymiseen. Tällöin on suositeltavaa lisätä tuoretta substraattia ja/tai vähentää kasvattamistiheyttä.

▼M6

Lisäys 5

Menetelmiä munakoteloista kuoriutuneiden lieronpoikasten laskemista varten

Lierojen poimiminen käsin maa-ainessubstraatista vie erittäin paljon aikaa. Tästä syystä suositellaan kahta vaihtoehtoista menetelmää.

a) Testisäiliöt upotetaan vesihauteeseen, jonka lämpötila on aluksi 40 °C, mutta se nostetaan 60 °C:een. Noin 20 minuutin kuluttua lieronpoikasten pitäisi ilmestyä maa-aineksen pinnalle, josta ne voidaan helposti poimia talteen ja laskea.

b) Testimaa-ainesta voidaan huuhdella siivilässä käyttämällä menetelmää, jonka ovat kehittäneet van Gestel ym. (1). Edellytyksenä on, että maa-ainekseen lisätty turve sekä lanta tai kaurahiutaleet oli jauhettu hienoksi jauheeksi. Kaksi siivilää, joiden silmäkoko on 0,5 mm ja halkaisija 30 cm, asetetaan päällekkäin. Testisäiliön sisältö huuhdellaan siivilöiden läpi voimakkaalla vesijohtovesisuihkulla, jolloin lieronpoikaset ja munakotelot jäävät pääasiassa ylempään siivilään. On tärkeää huomata, että ylemmän siivilän koko pinnan olisi pysyttävä märkänä koko toimenpiteen ajan, jotta lieronpoikaset kelluvat vesikerroksessa eivätkä pääse luikertelemaan siivilän reikien läpi. Paras tulos saadaan suihkupäätä käyttämällä.

Kun koko maa-ainessubstraatti on huuhdeltu siivilöiden läpi, poikaset ja munakotelot voidaan kaataa ylemmästä siivilästä astiaan. Tämän jälkeen astian sisällön annetaan seistä hetken, jolloin tyhjät munakotelot nousevat veden pintaan ja täydet munakotelot sekä poikaset laskeutuvat astian pohjalle. Sen jälkeen seisova vesi voidaan kaataa pois ja lieronpoikaset ja munakotelot siirtää petrimaljaan, jossa on pohjalla vähän vettä. Lierot voidaan poimia maljasta laskemista varten neulalla tai pinseteillä.

Kokemus on osoittanut, että menetelmä a sopii paremmin lieronpoikasten talteenottamiseen, sillä ne saattavat huuhtoutua läpi jopa siivilästä, jonka silmäkoko on vain 0,5 mm.

Lierojen (sekä tarvittaessa munakoteloiden) maa-ainessubstraatista erottamiseen käytetyn menetelmän toimivuus on aina todettava. Jos poikaset poimitaan käsin, on suositeltavaa toistaa toimenpide kahdesti kaikkien näytteiden osalta.

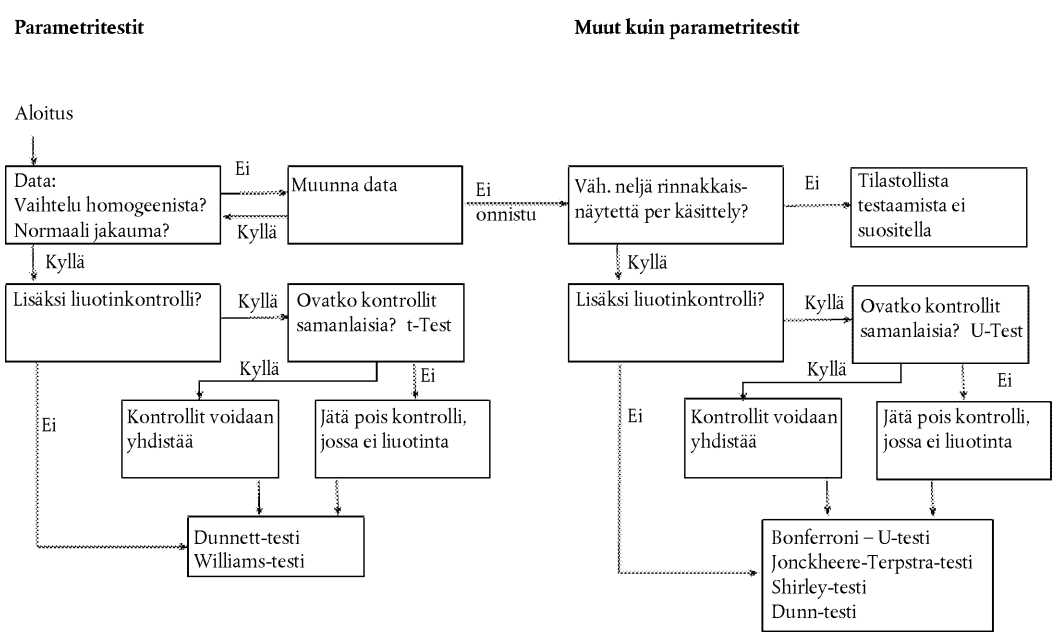
VIITTEET:

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367–371.

▼**M6**

Lisäys 6

Yhteenveto datan tilastollisesta arvioinnista (NOEC-arvon määrittäminen)



▼M6

C.34. ANAEROBISTEN BAKTEERIEN TOIMINNAN ESTYMISEN TOTEAMINEN – KAASUNMUODOSTUKSEN VÄHENTYMINEN ANAEROBISESSA MÄDÄTYSLIETTEESSÄ (JÄTEVEDESSÄ)

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 224 (2007). Vesiympäristöön joutuneet kemikaalit läpäisevät sekä aerobisen että anaerobisen vyöhykkeen, jossa ne saattavat alkaa hajota ja/tai estää bakteerien toimintaa; joissakin tapauksissa kemikaalit saattavat jäädä muuttumattomina anaerobiseen vyöhykkeeseen vuosikymmeniksi tai vieläkin pitemmäksi ajaksi. Jätevedenkäsittelyssä ensimmäinen vaihe eli esiselkiyttäminen on aerobinen supernatanttinesteeessä ja anaerobinen sedimenttilietteessä. Toisessa vaiheessa aktiivilietteen ilmastustankissa on aerobinen vyöhyke ja jälkiselkeyttimessä oleva sedimenttiliete on anaerobisella vyöhykkeellä. Molemmissa vaiheissa olevalle lietteelle tehdään tavallisesti anaerobinen käsittely, jolloin saadaan metaania ja hiilidioksidia, joita käytetään yleensä sähkön tuotantoon. Ympäristössä lahtien, jokisuistojen ja merenpohjan sedimentteihin päätyvät kemikaalit pysyvät todennäköisesti näissä anaerobisissa vyöhykkeissä määrittämättömän ajan, elleivät kyseiset kemikaalit ole biologisesti hajoavia. Joistakin kemikaaleista suhteellisen suuri määrä päätyy todennäköisesti anaerobisiin vyöhykkeisiin fysikaalisten ominaisuuksiensa vuoksi. Näitä ominaisuuksia ovat esimerkiksi alhainen vesiliukoisuus, voimakas adsorboituminen kiintoaineisiin sekä se, että olosuhteet eivät salli aerobista biohajoamista.

2. Ympäristöön päästettävien kemikaalien pitäisi ihannetapauksissa olla biologisesti hajoavia sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa, mutta ehdottoman tärkeää on, että kemikaalit eivät saa estää mikro-organismien toimintaa kummassakaan vyöhykkeessä. Yhdistyneessä kuningaskunnassa on havaittu tapauksia, joissa metaanin tuotanto on estynyt täydellisesti esimerkiksi teollisuuden päästöissä esiintyneen pentakloorifenolin vuoksi. Tämän seurauksena inhiboitunutta lietettä on jouduttu siirtämään kalliilla hinnalla mädätyslaitoksista turvallisille alueille ja tuomaan tilalle tervettä mädätyslietettä muista laitoksista. Samalla on kuitenkin ilmennyt monia vähemmän vakavia tapauksia, joissa mädätys on häiriintynyt muiden kemikaalien, esimerkiksi kuivapesussa käytettyjen alifaattisten halohiilivetyjen ja pesuaineiden vuoksi, mikä on aiheuttanut huomattavaa haittaa mädätyslaitoksen toiminnalle.

3. Tiedossa on vain yksi testimenetelmä, jossa tutkimuksen kohteena on bakteerien toiminnan estyminen (C.11 Aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti (1)). Tällä testillä arvioidaan testikemikaalien vaikutusta hapenottoon substraatin läsnä ollessa. Menetelmä on laajassa käytössä, sillä se varoittaa jo varhaisessa vaiheessa kemikaalien mahdollisista haittavaikutuksista jäteveden aerobisessa käsittelyssä sekä osoittaa erilaisissa biologisen hajoavuuden testeissä testikemikaalien pitoisuudet, joilla ei ole inhibitiovaikutusta. Testimenetelmällä C.43 (2) voidaan joissakin tapauksissa määrittää testikemikaalin myrkyllisyys anaerobisen lietteen kaasunmuodostukselle, kun liete on laimennettu yhteen kymmenesosaan normaalista kiintoainepitoisuudestaan, jotta prosentuaalinen biohajoavuus voidaan arvioida riittävällä tarkkuudella. Laimennettu liete saattaa olla herkempää inhiboiville kemikaaleille, minkä vuoksi Kansainvälisen standardisoimisjärjestön ISOn työryhmä päätti kehittää menetelmän, jossa käytettäisiin laimentamatonta lietettä. Ainakin kolmen (Tanskassa, Saksassa ja Yhdistyneessä kuningaskunnassa tehdyn) testin tutkimisen jälkeen laadittiin kaksi ISO-standardia: standardissa ISO 13 641-1 (3) käytetään laimentamatonta lietettä ja standardissa ISO 13 641-2 (4) yhteen sadasosapitoisuuteen laimennettua lietettä, mikä edustaa bakteeripitoisuudeltaan alhaisia liejuja ja sedimenttejä. Molemmille menetelmille tehtiin yhteistutkimus (5), ja osa 1 hyväksyttiin standardiksi, mutta osasta 2 ei päästy yksimielisyyteen. Yhdistyneen kuningaskunnan näkemyksen mukaan menetelmä vaatii vielä lisätutkimuksia, sillä osanottajista merkittävä osuus ilmoitti kaasua muodostuneen vain vähän tai ei ollenkaan osittain siksi, että kaasutilan prosentuaalinen osuus (75 prosenttia) oli ihanteellisen herkkyyden kannalta liian suuri.

4. Yhdistyneessä kuningaskunnassa aiemmin tehdyissä tutkimuksissa (6), (7) on käytetty manometrimenetelmää, jossa laimentamatonta mädätyslietettä sekä käsittelemätöntä jätevesilietettä laitettiin 500 ml:n pulloihin. Menetelmä oli kuitenkin kömpelö ja käsittelemättömän lietteen haju sietämättömän voimakas. Myöhemmin Wilson ym. (10) on käyttänyt hyvällä menestyksellä

▼M6

Sheltonin & Tiedjen (8) kehittämää ja Battersbyn & Wilsonin (9) muokkaamaa kooltaan pienempää ja helppokäyttöisempää laitteistoa. Kawahara ym. (11) on onnistunut valmistamaan laboratorio-olosuhteissa vakioidumpia lietteitä, joita voidaan käyttää anaerobisen biologisen hajoavuuden ja inhibitiovaikutuksen testauksessa useilla eri kemikaaleilla. Substraattina ei ole käytetty käsittelemätöntä lietettä, jolloin testiin kelpaavat myös yhteen sadasosapitoisuuteen laimennettu anaerobinen liete sekä esimerkiksi lieju ja sedimentit, joissa bakteeritoiminta on vähäistä.

5. Menetelmällä saatavasta tiedosta voi olla hyötyä ennakoitaessa testikemikaalin todennäköisiä vaikutuksia kaasunmuodostukselle anaerobisissa mädätyslaitoksissa. Ainoastaan pitkäkestoinen, mädätyslaitoksen toimintaa tarkemmin simuloiva koe voi kuitenkin osoittaa, kykenevätkö mikro-organismit sopeutumaan testikemikaaliin vai voiko lietteeseen todennäköisesti absorboituvista ja adsorboituvista kemikaaleista muodostua myrkyllisiä pitoisuuksia, kun aikaa kuluu kauemmin kuin tämän testin puitteissa on mahdollista.

TESTIN PERIAATE

6. Anaerobisen mädätyslietteen (kiintoainepitoisuus 20–40 g/l) ja hajoavan substraattiliuoksen seoksen alikvootteja inkuboidaan yksittäin ja samanaikaisesti testikemikaalin eri pitoisuuksissa suljetuissa astioissa enintään kolmen vuorokauden ajan. Tuotetun kaasun (metaani ja hiilidioksidi) määrä mitataan pulloissa vallitsevan paineen (Pa) kasvuna. Kaasunmuodostuksen prosentuaalinen inhibitio testikemikaalin eri pitoisuuksilla lasketaan testi- ja kontrollipulloissa tuotettujen määrien perusteella. EC_{50} ja muut vaikuttavat pitoisuudet lasketaan kuvaajista, jotka esittävät prosentuaalista inhibitiota testikemikaalien pitoisuuteen tai yleisemmin pitoisuuden logaritmiin nähden.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

7. Testikemikaaleja käytetään yleensä niiden puhtaimmassa helposti saatavilla olevassa muodossa, sillä eräiden kemikaalien, kuten kloorifenolien, epäpuhtaudet voivat olla paljon myrkyllisempiä kuin itse testikemikaali. On kuitenkin otettava huomioon, että kemikaaleja voi olla tarpeen testata siinä muodossa, jossa niitä valmistetaan tai jossa ne ovat kaupallisesti saatavilla. Valmisteiden käyttöä ei yleensä suositella, mutta jos kyseessä on huonosti liukeneva testikemikaali, valmisteen käyttö voi olla asianmukaista. Testikemikaalista on oltava tiedossa ainakin seuraavat ominaisuudet: liukoisuus veteen ja eräisiin orgaanisiin liuottimiin, höyrynpaine, adsorptiokerroin, hydrolyysi sekä anaerobinen biologinen hajoavuus.

MENETELMÄN SOVELTUVUUS

8. Testiä voidaan käyttää vesiliukoisille tai veteen liukenemattomille kemikaaleille, myös haihtuville kemikaaleille. Heikosti veteen liukenevien (ks. kirjallisuusviite (12)), voimakkaasti haihtuvien materiaalien käsittelyssä on kuitenkin noudatettava erityistä varovaisuutta. Muista anaerobisista kohteista peräisin olevia siirrosteita, esimerkiksi liejua, kyllästettyä maa-ainesta tai sedimenttejä, voidaan myös käyttää. Anaerobisia bakteerijärjestelmiä, jotka ovat aiemmin altistuneet myrkyllisille kemikaaleille, voidaan sopeuttaa pysymään aktiivisina ksenobioottisten kemikaalien läheisyydessä. Sopeutetuista bakteerijärjestelmistä peräisin oleva siirroste saattaa sietää testikemikaaleja paremmin kuin sopeuttamattomista järjestelmistä peräisin oleva.

VERTAILUKEMIKAALIT

9. Prosessin toimivuus tarkistetaan testaamalla vertailukemikaalia sopivissa astioissa samanaikaisesti tavanomaisen testin suorittamisen kanssa; 3,5-dikloorifenolin on osoitettu estävän johdonmukaisesti paitsi anaerobisen kaasunmuodostuksen, myös aktiivilietteen ja muiden kemiallisten reaktioiden hapenkulutuksen. Kahden muun kemikaalin eli metyleeni-bis-tiosyanaatin ja pentakloorifenolin on osoitettu estävän metaanintuotantoa 3,5-dikloorifenolia tehokkaammin, mutta näillä kemikaaleilla saatuja tuloksia ei ole validoitu. Pentakloorifenolia ei suositella, sillä sitä ei ole yleisesti saatavilla puhtaassa muodossa.

▼M6

TULOSTEN VERRATTAVUUS

10. Kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (5) kymmenen osallistujalaboratorion 3,5-dikloorifenolilla ja 2-bromietaanisulfonihapolla saamat EC_{50}-arvot olivat vain kohtuullisessa määrin verrattavissa keskenään. (Vaihteluväli 3,5-dikloorifenolilla oli 32–502 mg/l ja 2-bromietaanisulfonihapolla 220–2 190 mg/l.)

Laboratorioiden määrä	mg/l			mg/g lietettä		
	keskiarvo	keskihajonta	variaatiokerroin (%)	keskiarvo	keskihajonta	variaatiokerroin (%)
	3,5-dikloorifenoli					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromietaanisulfonihappo					
10	1 058	896	85	34	26	76

Yhteistutkimuksesta saadut EC_{50}-tiedot – laimentamaton liete

11. Laboratorioiden väliset suuret variaatiokertoimet kuvastavat suurelta osin eroja lietteen mikro-organismien herkkyydessä, mikä johtuu joko aiemmasta altistuksesta testikemikaalille tai muulle kemiallisesti läheistä sukua olevalle kemikaalille taikka altistuksen puuttumisesta. Tarkkuus, jolla lietteen pitoisuuteen perustuva EC_{50}-arvo määriteltiin, oli vain lievästi parempi kuin volumetrinen arvo (mg/l). Niiden kolmen laboratorion, jotka ilmoittivat EC_{50}-arvonsa tarkkuuden 3,5-dikloorifenolille, variaatiokerroin oli huomattavasti pienempi (järjestyksessä 22, 9 ja 18 prosenttia, kun EC_{50}-arvo ilmoitetaan milligrammoina grammaa kohti) kuin kaikkien kymmenen laboratorion keskiarvojen. Kyseisten kolmen laboratorion omat keskiarvot olivat 3,1, 3,2 ja 2,8 mg/g. Hyväksyttävän matalat laboratorioiden sisäiset variaatiokertoimet (9–22 prosenttia) verrattuna laboratorioiden välisten arvojen huomattavasti suurempiin kertoimiin (92 prosenttia) viittaavat siihen, että yksittäisten lietteiden ominaisuudet poikkeavat merkittävästi toisistaan.

MENETELMÄN KUVAUS

Välineet

12. Testissä tarvitaan tavallinen laboratoriolaitteisto ja seuraavat välineet:

a) inkubaattori – kipinänkestävä, lämpötilaksi säädetty 35 °C ± 2 °C;

b) paineenkestäviä lasisia testiastioita, joiden nimelliskoko on sopiva ([1]) ja joista jokaisessa on kaasutiivis, pinnoitettu tulppa, joka kestää noin kahden baarin tai 2×10^5 Pa:n paineen (pinnoitteena käytetään esimerkiksi PTFE:tä eli polytetrafluorieteeniä). Suositeltavia ovat lasiset seerumipullot, joiden nimellistilavuus on 125 ml ja kokonaistilavuus noin 160 ml ja jotka voidaan sulkea seerumitulpalla ([2]) ja reunatuilla alumiinirenkailla, mutta tarkoitukseen kelpaavat pullot, joiden kokonaistilavuus on 0,1–1 litraa;

([1]) Suositeltu koko on 0,1–1 litraa.

([2]) Kaasutiiviiden silikonitulppien käyttö on suositeltavaa. Lisäksi suositellaan, että tulppien, etenkin butyylikumitulppien, kaasutiiviys testataan, koska monet kaupallisesti saatavilla olevat tulpat eivät ole riittävän tiiviitä metaanin suhteen, ja jotkin tulpat eivät pysy tiiviinä, kun ne puhkaistaan neulalla testiolosuhteissa.
- Suositeltavia ovat kaasutiiviit, pinnoitetut tulpat, joiden käyttö on pakollista haihtuville kemikaaleille (osa kaupallisesti saatavista tulpista on verrattain ohuita, alle 0,5 cm, ja niiden kaasutiiviys menetetään, kun ne puhkaistaan ruiskuneulalla);
- Jos testikemikaalit eivät ole haihtuvia, suositeltavia ovat noin 1 cm:n butyylikumitulpat, jotka pysyvät yleensä kaasutiiviinä myös neulalla puhkaisun jälkeen.
- Ennen testin aloittamista on suositeltavaa tutkia tarkasti, pysyvätkö tulpat kaasutiiviinä neulalla puhkaisun jälkeen.

▼M6

c) tarkkuuspainemittari ([1]) ja siihen liitetty neula

Muodostuneen kaasun kokonaismäärä (metaani ja hiilidioksidi) mitataan painemittarilla, jolla voi sekä mitata että ilmata tuotettua kaasua. Sopiva instrumentti on esimerkiksi kädessä pidettävä tarkkuuspainemittari, johon on liitetty sopiva injektioneula, ja kaasutiiviin kolmitieventtiilin avulla voidaan poistaa liiallista painetta (lisäys 1). Paineanturin putken ja venttiilin sisäisen tilavuuden on oltava mahdollisimman pieni, jotta virheet, jotka aiheutuvat laitteiston tilavuuden huomiotta jättämisestä, ovat merkityksettömiä.

d) eristettyjä säiliöitä mädätyslietteen kuljettamiseen;

e) kolmitiepaineventtiilejä;

f) siivilä, jonka silmäkoko on 1 mm;

g) säiliö mädätyslietteelle: lasista tai suuritiheyspolyetyleenistä valmistettu pullo, jonka tilavuus on noin viisi litraa ja johon kuuluu sekoitin sekä kaasutila, jonka läpi typpikaasu (ks. 13 kohta) pääsee virtaamaan;

h) kalvosuodattimia (0,2 μm) substraatin sterilointia varten;

i) mikroruiskuja, joilla toteutetaan paineanturin (ks. 12(c) kohta) ja pullojen kaasutilan (ks. 12(b) kohta) välinen kaasutiivis liitos ja joilla myös lisätään liukenemattomat nestemäiset testimateriaalit pulloihin;

j) hansikaskaappi, jossa on lievästi paineistettua typpikaasua; kaappi ei ole välttämätön, mutta sen käyttöä suositellaan.

Reagenssit

13. Käytä pelkästään analyysilaatuisia reagensseja. Koko testin ajan on käytettävä erittäin puhdasta typpikaasua, joka sisältää happea alle 5 μl/l.

Vesi

14. Jos aineita on laimennettava, käytetään deionisoitua vettä, josta ilma on poistettu aiemmin. Veden analysoiminen ei ole tarpeen, mutta deionisointilaitteen säännöllisestä kunnossapidosta on huolehdittava. Deionisoitua vettä käytetään myös kantaliuosten valmistamisessa. Ennen kuin anaerobista siirrostetta lisätään mihinkään testimateriaaliliuokseen tai -laimennokseen, on tarkistettava, ettei missään ole happea. Hapettomuus tarkistetaan joko puhaltamalla typpikaasua laimennusveden (tai laimennosten) läpi yhden tunnin ajan ennen siirrosteen lisäämistä tai kuumentamalla laimennukseen käytettävä vesi kiehumispisteeseen ja jäähdyttämällä se huoneenlämpöiseksi hapettomassa ympäristössä.

Mädätysliete

15. Aktiivinen mädätysliete kerätään jäteveden käsittelylaitoksessa olevasta mädätyslaitoksesta tai laboratoriossa olevasta mädätyslaitoksesta, jossa käsitellään pääasiassa kotitalousjätevedestä peräisin olevaa lietettä. Käytännön tietoa laboratoriossa olevasta mädätyslaitoksesta saatavasta lietteestä on muissa lähteissä (11). Jos testissä on määrä käyttää muokattua siirrosainetta, voidaan harkita myös teollisuusjätevedenkäsittelylaitoksesta peräisin olevaa

([1]) Mittarin käytössä ja sen säännöllisin väliajoin tehtävässä kalibroinnissa noudatetaan valmistajan ohjeita. Jos testissä käytetään kuvatun mukaista painemittaria (esimerkiksi sellaista, jossa on teräskalvo), sitä ei tarvitse kalibroida laboratoriossa. Mittarin kalibrointi tehdään suositusten mukaisin väliajoin lisensoidun kalibrointilaitoksen toimesta. Kalibroinnin tarkkuus voidaan tarkistaa laboratoriossa yksipistemittauksella 1×10^5 Pa:n paineella sellaisella painemittarilla, jossa on mekaaninen näyttö. Kun tämä piste mitataan oikein, myös lineaarisuus pysyy muuttumattomana. Jos testissä käytetään muita mittauslaitteita (joilla ei ole valmistajan sertifioimaa kalibrointia), muuntaminen on suositeltavaa tehdä koko asteikolla säännöllisin väliajoin (ks. lisäys 2).

▼M6

mädätyslietettä. Lietteen keräämiseen käytetään leveäkaulaisia pulloja, jotka on valmistettu suurtiheyspolyeteenistä (HDPE:stä) tai vastaavasta, laajenevasta materiaalista. Pullot täytetään lietteellä noin 1 cm:n päähän pullonsuusta ja suljetaan tiiviisti mieluiten varoventtiilillä (12(e) kohta). Tämän jälkeen pullot sijoitetaan lämpösokin vähentämiseksi eristettyihin säiliöihin (12(d) kohta), kunnes pullot siirretään inkubaattoriin, jonka lämpötilana pidetään 35 °C ± 2 °C. Pulloja avatessa on muistettava vapauttaa ylimääräinen kaasunpaine joko löysäämällä suljinta varovasti tai käyttämällä kolmitiepaineventtiiliä (12(e) kohta). Liete on suositeltavaa käyttää muutaman tunnin sisällä keräämisestä. Muussa tapauksessa sitä voi säilyttää 35 °C ± 2 °C:ssa typpikaasussa enintään kolmen vuorokauden ajan, sillä tässä ajassa aktiivisuus normaalisti pysyy lähes samalla tasolla.

Varoitus – Mädätysliete sisältää syttyviä kaasuja, joista aiheutuu tulipalo- ja räjähdysvaara. Niissä voi olla myös patogeenisia organismeja, joten lietettä käsitellessä on noudatettava asianmukaisia varotoimia. Älä kerää lietettä lasiastioihin turvallisuussyistä.

Siirrosaine

16. Liete sekoitetaan varovasti välittömästi ennen käyttöä ja kaadetaan siivilän (silmäkoko 1 mm^2) läpi (12(f) kohta) sopivaan pulloon (12(g) kohta), jonka kaasutilan läpi johdetaan typpikaasua. Lietteestä otetaan erilleen näyte, josta kiintoaineen kokonaispitoisuus voidaan mitata (ks. esimerkiksi standardi ISO 11 923 (13) tai vastaava EU-standardi). Yleensä lietettä käytetään laimentamattomana. Kiintoainepitoisuus on yleensä 2–4 prosenttia (massaprosenttina tilavuutta kohti). Lietteen pH-arvo tarkistetaan ja se säädetään tarvittaessa arvoon 7 ±0,5.

Testissä käytettävä substraatti

17. Deionisoituun veteen liuotetaan 10 g ravinneliuosta (esimerkiksi Oxoid), 10 g hiivauutetta ja 10 g D-glukoosia ja vettä lisätään niin paljon, että liuoksen tilavuudeksi saadaan 100 ml. Liuos steriloidaan suodattamalla se 0,2 μm kalvosuodattimen läpi (12(h) kohta) ja käytetään välittömästi tai säilytetään 4 °C:ssa enintään yhden vuorokauden ajan.

Testikemikaali

18. Erillinen kantaliuos valmistetaan jokaista vesiliukoista testikemikaalia varten liuottamalla kemikaalia esimerkiksi 10 g litraan hapetonta laimennusvettä (14 kohta). Kantaliuoksia käytetään riittävä määrä porrastettuja pitoisuuksia sisältävien reaktioseosten valmistamiseen. Vaihtoehtoisesti jokaisesta kantaliuoksesta voidaan valmistaa laimennussarja, jolloin testipulloihin lisätään sama määrä jokaista tarvittavaa loppupitoisuutta kohti. Kantaliuosten pH:ksi säädetään tarvittaessa 7 ±0,2.

19. Katso ISO 634 -standardista (12) tai vastaavasta EU-standardista veteen huonosti liukenevia testikemikaaleja koskevia lisäohjeita. Jos on tarpeen käyttää orgaanista liuotinta, vältä esimerkiksi kloroformia ja hiilitetrakloridia, joiden tiedetään estävän voimakkaasti metaanin tuotantoa. Pitoisuudeltaan sopiva liuos valmisteaan veteen liukenemattomasta kemikaalista ja sopivasta haihtuvasta liuottimesta, esimerkiksi asetonista tai dietyylieetteristä. Tarvittava määrä liuotinta sisältävää liuosta lisätään tyhjiin testipulloihin (12(b) kohta) ja liuotin haihdutetaan ennen lietteeseen lisäämistä. Muiden käsittelyiden osalta hyödynnetään standardia ISO 10 634 (12) tai vastaavaa EU-standardia, mutta muista, että emulsioiden tuottamiseen tarkoitetut pinta-aktiiviset aineet voivat estää anaerobista kaasunmuodostusta. Jos orgaanisten liuottimien ja emulgointiaineiden epäillään aiheuttavan artefakteja, testikemikaalia voidaan lisätä suoraan testiseokseen jauheena tai nesteenä. Haihtuvat kemikaalit ja veteen liukenemattomat testikemikaalit voidaan injektoida siirrosteella täytettyihin seerumipulloihin mikroruiskulla (12(i) kohta).

▼M6

20. Testikemikaaleja lisätään pulloihin siten, että pitoisuudet muodostavat geometrisen sarjan, esimerkiksi 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l ja 15,6 mg/l. Jos myrkyllisyyden voimakkuus ei ole tiedossa samankaltaisten kemikaalien perusteella, ensin tehdään pitoisuusalueen määritystesti pitoisuuksilla 1 000 mg/l, 100 mg/l ja 10 mg/l, jotta sopiva pitoisuusalue löytyy.

Vertailukemikaali

21. Vesiliuos valmistetaan 3,5-dikloorifenolista (10 g/l) lisäämällä vähitellen vähimmäismäärä 5 mol/l natriumhydroksidiliuosta kiintoaineen joukkoon ja ravistamalla, kunnes se on liuennut. Tämän jälkeen lisätään laimennusvettä, josta happi on poistettu (14 kohta), kunnes liuosta on haluttu määrä. Ultraäänihajotus edistää liukenemista. Muita vertailukemikaaleja voidaan käyttää, kun EC_{50}-arvon keskimääräinen vaihteluväli on muodostettu ainakin kolmen eri siirrosteilla tehdyn testin perusteella (siirrosteet kerätty eri lähteistä tai eri aikoina).

INTERFERENSSI/VIRHEET

22. Lietteen jotkut ainesosat voivat mahdollisesti reagoida mahdollisten inhibiittoreiden kanssa, jolloin mikro-organismit eivät joudu niiden kanssa kosketuksiin ja tuloksena on heikko tai olematon inhibitiovaikutus. Jos lietteessä on toisaalta jo valmiiksi inhiboivaa kemikaalia, kyseistä kemikaalia testatessa tulokset ovat virheellisiä. Näiden mahdollisuuksien lisäksi joukko muitakin havaittuja tekijöitä voi vääristää tuloksia. Nämä tekijät on lueteltu lisäyksessä 3, jossa kerrotaan myös, miten vääristymät voidaan poistaa tai niitä voidaan vähentää.

TESTIMENETTELY

23. Rinnakkaisnäytteiden määrä valitaan sen mukaan, kuinka tarkasti inhibitioindeksit on saatava määritettyä. Jos pullojen sulkimet ovat riittävän kaasutiiviitä koko testin ajan, tarvitaan vain yksi erä (jossa on vähintään kolme rinnakkaisnäytettä) testipulloja jokaista vaadittavaa pitoisuutta kohti. Lisäksi varataan yksi pulloerä, jossa on vertailukemikaalia, sekä yhdet kontrollit. Jos pullojen sulkimet sen sijaan säilyvät tiiviinä vain 1–2 läpäisykertaa, varataan yksi erä (esimerkiksi kolme rinnakkaisnäytettä) testipulloja jokaista väliaikaa (t) kohti, jonka ajalta tulokset tarvitaan, jotta kaikki testikemikaalin pitoisuudet saadaan testattua. Samalla varataan t määrä pulloeriä vertailukemikaalia ja kontrolleja varten.

24. Suositeltavaa on käyttää hansikaskaappia (12(j) kohta). Viimeistään 30 minuuttia ennen testin alkua käynnistetään typpivirtaus kaikki tarvittavat välineet sisältävän hansikaskaapin läpi. Samalla varmistetaan, että lietteen lämpötila pysyy 35 °C ± 2 °C:ssa pullojen käsittelyn ja sulkemisen ajan.

Alustava testi

25. Jos lietteen toimintaa ei tunneta, on suositeltavaa tehdä alustava testi. Testiä varten varataan kontrolleja, joissa on kiintoainetta esimerkiksi pitoisuutena 10 g/l, 20 g/l ja 40 g/l sekä substraattia, mutta ei testikemikaalia. Testissä käytetään myös erisuuruisia määriä reaktioseosta, jotta kaasutilan ja nesteen tilavuus muodostaa 3–4 eri suhdelukua. Eri aikaväleillä muodostuneen kaasun määrästä päätellään sopivimmat olosuhteet, joissa voidaan tehdä päivittäin kaksi mittausta ja saada merkittävä määrä kaasua sekä vapauttaa painetta päivittäin siten, että herkkyys pysyy ihanteellisena ([1]), mutta räjähdysvaaraa ei ole.

Testikemikaalien lisääminen

26. Vesiliukoiset testikemikaalit lisätään tyhjiin testipulloihin (12(b) kohta) vesiliuoksena (18 kohta). Jokaisella pitoisuusalueella käytetään vähintään

([1]) Tämä koskee koeasetelmaa ja -olosuhteita, joissa muodostuneen kaasun määrää nollakontrolleissa ja astioissa, joissa inhibitio on 70–80 prosenttia, voidaan arvioida siten, että virhemarginaali pysyy hyväksyttävällä tasolla.

▼M6

kolmen pullon erää (20 kohta). Jos testikemikaali on liukenematonta tai huonosti liukenevaa, kemikaalista tehtyä liuosta injektoidaan tyhjissä pulloissa oleviin orgaanisiin liuottimiin mikroruiskulla siten, että testikemikaalin jokaisesta viidestä pitoisuudesta saadaan rinnakkaisnäytteet. Liuotin haihdutetaan puhaltamalla typpikaasua testipulloissa olevien liuosten pinnan yli. Liukenemattomat kiinteät kemikaalit voidaan myös punnita suoraan testipulloihin.

27. Jos liukenemattomien ja huonosti veteen liukenevien testikemikaalien lisäämisessä ei käytetä liuotinta, ne lisätään mikroruiskulla suoraan testipulloihin siirrosteen ja testisubstraatin lisäämisen jälkeen (ks. 30 kohta). Haihtuvat testikemikaalit voidaan lisätä samalla tavalla.

Siirrosteen ja substraatin lisääminen

28. Sopivaa määrää siivilöityä mädätyslietettä (ks. 16 kohta) sekoitetaan viiden litran pullossa (12(g) kohta) samalla, kun kaasutilan läpi johdetaan typpikaasuvirta. Vesiliuosta tai testikemikaalien haihdutettua liuotinta sisältävää liuosta sisältäviä testipulloja huuhdellaan typpikaasuvirralla noin kahden minuutin ajan, jotta ilma poistuu. Tämän jälkeen hyvin sekoitetun lietteen alikvootteja, joiden tilavuus on esimerkiksi 100 ml, annostellaan testipulloihin suurikärkisellä pipetillä tai mittalasilla. Pipettiin on ehdottomasti otettava kerralla täsmälleen tarvittava lietemäärä, sillä lietteen kiintoaineet laskeutuvat helposti. Jos pipettiin tulee liikaa lietettä, tyhjennä se ja aloita alusta.

29. Tämän jälkeen lisätään typpikaasuvirtaa katkaisematta substraattiliuosta (17 kohta), kunnes ravinneliuoksen, hiivauutteen ja D-glukoosin pitoisuus seoksessa on 2 g/l. Seuraavassa on esimerkki testieristä.

Testikemikaalin lopullinen massapitoisuus testipulloissa (mg/l)	Testikemikaalin tilavuus (ml)		Reagenssit ja väliaine (ml)		
	Kantaliuos a) 10 g/l 18 kohta	Kantaliuos b) 1 g/l 18 kohta	Laimennusvesi 14 kohta	Siirrosaine 16 kohta	Substraatti 17 kohta
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Pullon kokonaistilavuus = 160 ml. Nesteen tilavuus = 103 ml.
Kaasutilavuus = 57 ml eli 35,6 % kokonaistilavuudesta.

30. Riittävä määrä tyhjiä testipulloja huuhdellaan samalla tavalla typpikaasulla, jotta haihtuvat ja liukenemattomat nestemäiset testikemikaalit poistuvat (ks. 27 kohta).

▼M6

Kontrollit ja vertailukemikaali

31. Kontrolleiksi varataan pelkästään lietettä ja substraattia sisältäviä pulloja vähintään kolmena kappaleena. Lisäksi varataan rinnakkaisnäytepulloja, joissa on lietettä ja substraattia sekä riittävästi vertailukemikaalin eli 3,5-dikloorifenolin kantaliuosta (21 kohta), jotta lopulliseksi pitoisuudeksi saadaan 150 mg/l. Tällä pitoisuudella kaasun muodostumisen pitäisi estyä noin 50 prosentilla. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää vertailukemikaalia eri pitoisuuksina. Lisäksi pH-arvon mittaamista varten varataan neljä ylimääräistä pulloa, jotka sisältävät lietettä, vettä, josta happi on poistettu, ja substraattia. Testikemikaalia lisätään kahteen pulloon suurimpana testattavana pitoisuutena ja kahteen muuhun pulloon lisätään vettä, josta happi on poistettu.

32. Varmista, että kaikissa pulloissa – testi- ja vertailukemikaalia sisältävissä sekä kontrolleissa – on sama määrä nestettä (V_R). Tarvittaessa pulloihin voidaan lisätä deionisoitua vettä, josta happi on poistettu (14 kohta), kunnes haluttu tilavuus on saavutettu. Kaasutilan on oltava 10–40 prosenttia pullon tilavuudesta; arvo valitaan alustavan testin perusteella saatuja tietoja käyttämällä. Kun kaikki ainesosat on lisätty pulloihin, poista kaasuneula ja sulje jokainen pullo kumitulpalla ja alumiinikorkilla (12(b) kohta). Tulpan saa helpommin paikalleen, kun se kostutetaan pisaralla deionisoitua vettä. Sekoita jokaisen pullon sisältö ravistamalla.

Pullojen inkubaatio

33. Siirrä pullot mieluiten ravistimella varustettuun inkubaattoriin, jonka lämpötilan voi säätää 35 °C ± 2 °C:een. Pulloja inkuboidaan pimeässä. Noin yhden tunnin kuluttua tasaa pullojen ja ilmakehän välinen paine työntämällä sisään painemittariin kiinnitetty ruiskuneula (12(c) kohta) vuorollaan jokaisen pullon sulkimen läpi, avaa venttiili, kunnes painemittari näyttää nollaa, ja lopuksi sulje venttiili. Neula työnnetään sisään noin 45 asteen kulmassa, jotta kaasu ei pääse vuotamaan pulloista. Jos pulloja inkuboidaan laitteessa, johon ei kuulu ravistinta, ravistele pulloja käsin kahdesti päivässä koko inkubaatioajan, jotta järjestelmä tasaantuu. Pulloja inkuboidaan ja ne käännetään ylösalaisin, jotta kaasua ei pääse tulpan läpi. Pullojen ylösalaisin kääntäminen ei kuitenkaan sovi silloin, kun liukenemattomat testikemikaalit saattavat tarttua pullon pohjaan.

Paineen mittaaminen

34. Kun pullojen lämpötila on 35 °C ± 2 °C, ota tarkoitukseen varatuista neljästä pullosta otetaan kaksi, niiden sisällön pH-arvo mitataan ja kirjataan muistiin ja sisältö hävitetään, minkä jälkeen pullojen inkubointia pimeässä jatketaan. Pulloissa oleva paine mitataan ja kirjataan muistiin kahdesti päivässä seuraavan 48–72 tunnin ajan työntämällä painemittarin neula vuorollaan jokaisen pullon sulkimen läpi ja kuivaamalla neula mittausten välillä. Kaikki pullon osat pidetään inkubointilämpötilassa mittauksen ajan, ja mittaus tehdään mahdollisimman nopeasti. Anna painelukeman tasaantua ennen muistiin kirjaamista. Avaa tämän jälkeen venttiili kaasun poistamista varten ja sulje se, kun paine näyttää nollaa. Testiä jatketaan yleensä 48 tunnin ajan ensimmäisestä paineentasauskerrasta eli nollahetkestä lukien. Haihtuvia kemikaaleja käytettäessä lukemat tarkistetaan ja kaasua poistetaan vain kerran (inkuboinnin lopuksi) tai kahdesti, jotta testikemikaalia joutuu hukkaan mahdollisimman vähän (10).

35. Jos painelukema on negatiivinen, älä avaa venttiiliä. Toisinaan ruiskun neulaan ja letkuun kertyy kosteutta ja painelukema näyttää heikkoa alipainetta. Tässä tapauksessa irrota neula, ravista putkea, kuivaa se paperilla ja laita paikalleen uusi neula.

pH:n mittaaminen

36. Mittaa ja kirjaa muistiin jokaisen pullon sisällön pH-arvo viimeisen painemittauksen jälkeen.

▼M6

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten ilmoittaminen

37. Laske jokaisesta rinnakkaisnäytepullojen sarjasta kaikilta aikaväleiltä muistiin kirjattujen paineiden summa ja keskiarvo sekä laske keskimääräinen kumulatiivinen bruttokaasunpaine kaikilla aikaväleillä jokaisen rinnakkaisnäytesarjan osalta. Piirrä käyrät, jotka esittävät keskimääräistä kumulatiivista kaasunmuodostusta (Pa) ajan funktiona kontrolli-, testi- ja vertailukemikaalipulloissa. Valitse jokin ajankohta käyrän lineaariselta osalta, tavallisesti 48 tuntia, ja laske prosentuaalinen inhibitio (I) kunkin pitoisuuden osalta käyttämällä yhtälöä [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

jossa

I = prosentuaalinen inhibitio (prosentteina);

P_t = testimateriaaleilla aikaan saatu kaasunpaine valittuna ajankohtana (pascaleina (Pa));

P_c = kontrollissa muodostunut kaasunpaine samana ajankohtana (pascaleina (Pa)).

Molemmat käyrät (käyrä I) on suositeltavaa piirtää paitsi pitoisuuden, myös pitoisuuden logaritmin funktiona, jotta näistä voidaan valita tarkemmin lineaarinen käyrä. EC_{50}-arvo (mg/l) arvioidaan silmämääräisesti tai regressioanalyysilla siitä käyrästä, joka on tarkemmin lineaarinen. Vertailua varten voi olla käytännöllisempää ilmaista kemikaalin pitoisuus milligrammana kemikaalia yhtä kokonaiskiintoainegrammaa kohti. Tämä pitoisuus saadaan jakamalla tilavuuspitoisuus (mg/l) lietteen kuiva-aineen tilavuuspitoisuudella (g/l) (16 kohta).

38. Laske joko käytetyn vertailukemikaalin yhdellä pitoisuudella aikaansaatu prosentuaalinen inhibitio tai EC_{50}-arvo, jos pitoisuuksia on ollut tutkittavana riittävän monta.

39. Muunna kontrollissa muodostuneen kaasun keskipaine P_c (Pa) tilavuudeksi painemittarin kalibrointikäyrän avulla (lisäys 2). Laske tämän perusteella kaasunmuodostus ilmaistuna tilavuutena, joka muodostui 48 tunnin aikana 100 ml:sta laimentamatonta lietettä, jonka kiintoainepitoisuus on 2–4 prosenttia (20–40 g/l).

Hyväksyttävyyskriteerit

40. Kansainvälisen standardoimisjärjestön laboratorioiden välisen kokeen (5) tulokset osoittavat, että vertailukemikaali aiheutti kaasunmuodostuksessa 50 prosentin inhibition pitoisuuksilla 32–510 mg/l, keskiarvo 153 mg/l (10 kohta). Pitoisuusalue on niin laaja, että sen perusteella ei voi määrittää luotettavasti tarkkoja inhibitiorajoja; tämä tulee mahdolliseksi vasta sitten, kun on opittu tuottamaan yhdenmukaisempia siirrosteita. Kontrollipulloissa 48 tunnin aikana muodostuneen kaasun määrä yhtä lietteen kuiva-ainegrammaa kohti oli 21–149 ml (keskiarvo 72 ml). Muodostuneen kaasun määrän sekä vastaavan EC_{50}-arvon välillä ei todettu selkeää suhdetta. Lopullinen pH-arvo oli välillä 6,1–7,5.

41. Testi katsotaan hyväksyttäväksi, jos inhibitio 3,5-dikloorifenolia pitoisuutena 150 mg/l sisältävässä vertailukontrollissa on vähintään 20 prosenttia, nollanäytteessä muodostuu vähintään 50 ml kaasua yhtä kuiva-ainegrammaa kohti ja pH-arvo testin lopussa on välillä 6,2–7,5.

Testiraportti

42. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava ja merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

▼M6

— testikemikaalin puhtaus (epäpuhtaudet),

Testiolosuhteet

— nestemäisen sisällön ja kaasutilan määrä testiastioissa

— kuvaus testiastioista sekä kaasunmittauksesta (esimerkiksi painemittarin tyyppi)

— testikemikaalin ja vertailukemikaalin applikointi testijärjestelmään: käytetyt testipitoisuudet ja mahdollinen liuottimien käyttö

— siirrosteen tiedot: esimerkiksi jätevesien käsittelylaitoksen nimi, kuvaus käsiteltävän jäteveden lähteestä (esimerkiksi toimintalämpötila, lietteen pidätysaika sekä tieto siitä, onko käsiteltävä jätevesi peräisin pääasiassa kotitalouksista vai teollisuudesta), kiintoainepitoisuus, kaasunmuodostus anaerobisessa mädätyslaitoksessa, aiempi altistuminen myrkyllisille kemikaaleille tai mahdollinen ennalta sopeutuminen niille taikka liejun, sedimentin tai vastaavan keruupaikka

— inkubaatiolämpötila ja lämpötilan vaihteluväli

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset

— pH-arvot testin lopussa

— kaikki testiastioista, nollanäytteistä ja vertailukemikaalin kontrolliastioista kerätyt mittaustiedot tarpeen mukaan (esimerkiksi paine pascaleina tai millibaareina) taulukkomuodossa esitettynä

— prosentuaalinen inhibitio testi- ja vertailupulloissa sekä inhibitiota pitoisuuden funktiona esittävät käyrät

— laskelma EC_{50}-arvoista ilmaistuna yksikköinä mg/l ja mg/g

— kaasunmuodostus yhtä lietegrammaa kohti 48 tunnin aikana

— syyt mahdolliseen testitulosten hylkäämiseen

— tulosten pohdinta, mukaan lukien mahdolliset poikkeukset tässä testimenetelmässä kuvatuista menettelyistä, sekä pohdintaa mahdollisen interferenssin ja virheiden vuoksi ilmenneistä poikkeamista odotettavissa olleista testituloksista

— maininta siitä, oliko testin tarkoituksena mitata myrkyllisyyttä ennalta altistuneille vai ennalta altistumattomille mikro-organismeille.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Tämän liitteen luku C.11. Aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

(2) Tämän liitteen luku C.43. Orgaanisten aineiden anaerobinen biohajoavuus mädätyslietteessä: Mittauskohteena kaasuntuotanto.

(3) International Organisation for Standardization (ISO) (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

(4) International Organisation for Standardization (ISO) (2003) ISO 13 641-2 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) International Organisation for Standardization (ISO) (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58–70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, teoksessa: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850–857.

(9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441–2460.

(10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, s. 117–132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007–2018.

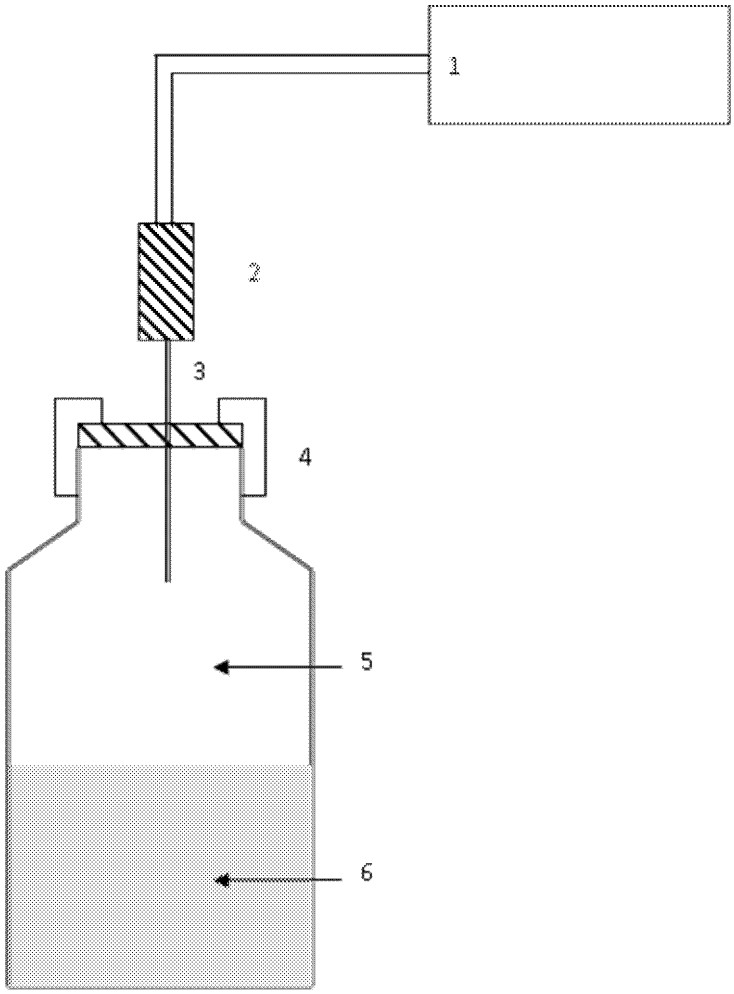
(12) International Organisation for Standardization (ISO) (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organisation for Standardization (ISO) (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Lisäys 1

Esimerkki laitteistosta, jolla mitataan biokaasun tuotantoa kaasunpaineen perusteella



Selitykset:

1 – painemittari

2 – kaasutiivis kolmitieventtiili

3 – injektioneula

4 – kaasutiivis tulppa (kiristysholkki ja tulppa)

5 – kaasutila

6 – siirrosaine (mädätysliete)

Testiastioiden käyttölämpötila on 35 °C ± 2 °C.

▼M6

Lisäys 2

Painemittarin lukemien muuntaminen

Painemittarin lukemat voidaan liittää kaasutilavuuksiin vakiokäyrällä, josta voidaan laskea 48 tunnin aikana muodostuneen kaasun tilavuus per yksi gramma kuivaa lietettä. Tämä toimivuusindeksi on eräs niistä kriteereistä, joiden perusteella testitulosten hyväksyttävyyttä arvioidaan. Kalibrointikäyrä saadaan injektoimalla tietty tilavuus ilmaa lämpötilassa 35 °C ± 2 °C seerumipulloihin, jotka sisältävät reaktioseoksen tilavuutta V_R vastaavan tilavuuden vettä:

— Laita viiteen seerumipulloon V_R ml alikvootteja vedestä, jota on pidetty lämpötilassa 35 °C ± 2 °C. Sulje pullot ja laita ne vesihauteeseen (35 °C ± 2 °C) tasapainottumaan tunnin ajaksi.

— Kytke painemittari päälle, anna sen tasapainottua ja säädä se nollaan.

— Paina injektioneula yhden pullon tulpan läpi, avaa venttiiliä, kunnes painemittarin lukema on nolla, ja sulje venttiili.

— Toista toimenpide muille pulloille.

— Injektoi jokaiseen pulloon 1 ml ilmaa lämpötilassa 35 °C ± 2 °C. Paina (painemittarin) neula yhden pullon tulpan läpi ja anna painelukeman asettua. Merkitse painelukema muistiin. Avaa venttiiliä, kunnes painelukema on nolla, ja sulje venttiili.

— Toista toimenpide muille pulloille.

— Toista koko toimenpide käyttämällä 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ja 50 ml ilmaa.

— Piirrä paineen (Pa) muuntokäyrä injektoidun kaasutilavuuden (ml) funktiona. Instrumentin vaste on lineaarinen välillä 0–70 000 Pa ja kaasuntuotannon osalta välillä 0–50 ml.

▼M6

Lisäys 3

Havaittuja tekijöitä, jotka voivat johtaa tulosten vääristymiseen

a) *Pullonkorkkien laatu*

Seerumipulloille on kaupallisesti saatavilla monenlaisia tulppia, mutta jotkut tulpat, esimerkiksi butyylikumista valmistetut, menettävät tiiviytensä, kun ne on lävistetty neulalla tämän testin olosuhteissa. Joskus paine lähtee laskemaan hyvin hitaasti sen jälkeen, kun tulppa on puhkaistu ruiskuneulalla. Vuotojen välttämiseksi on suositeltavaa käyttää kaasutiiviitä tulppia (12(b) kohta).

b) *Ruiskuneulassa oleva kosteus*

Toisinaan ruiskun neulaan ja letkuun kertyy kosteutta ja painelukema näyttää heikkoa alipainetta. Korjaa tilanne irrottamalla neula, ravistamalla putkea, kuivaamalla putki paperilla ja laittamalla paikalleen uusi neula (12(c) ja 35 kohdat).

c) *Happikontaminaatio*

Anaerobiset menetelmät ovat alttiita kaasunmuodostusta mahdollisesti vähentävästä happikontaminaatiosta johtuville virheille. Tässä menetelmässä happikontaminaation mahdollisuus on saatava mahdollisimman vähäiseksi käyttämällä ehdottomasti anaerobisia tekniikoita, esimerkiksi hansikaskaappia.

d) *Ylimääräinen substraatti lietteen joukossa*

Anaerobiseen kaasunmuodostukseen sekä lietteen herkkyyteen vaikuttavat substraatit, jotka siirtyvät siirrosteiden mukana testipulloihin. Kotitalouksien jätevettä käsittelevistä anaerobisista mädätyslaitoksista peräisin olevassa lietteessä on usein jäljellä tunnistettavia osasia, kuten hiuksia ja selluloosapitoisia kasvien jäänteitä, mikä voi tehdä edustavien näytteiden ottamisesta vaikeaa. Lietteen siivilöinnillä saadaan poistettua ylimääräiset, liukenemattomat osaset, jolloin näytteistä saadaan todennäköisemmin edustavia (16 kappale).

e) *Haihtuvat testikemikaalit*

Haihtuvat testikemikaalit vapautuvat testipullojen kaasutilaan. Tällöin osa testimateriaalista saatetaan menettää järjestelmästä painemittausten jälkeisessä ilmauksessa, jolloin EC_{50}-arvoista tulee liian suuria. Virhe pienenee, kun kaasutilan ja nesteen tilavuuksien suhde on oikea eikä ilmausta tehdä paineenmittausten jälkeen (10).

f) *Kaasunmuodostuksen epälineaarisuus*

Jos kumulatiivisesta kaasunmuodostuksen keskiarvosta inkubaatioajan funktiona piirretty käyrä ei ole suunnilleen lineaarinen 48 tunnin aikana, testin tarkkuus saattaa kärsiä. Tämän välttämiseksi voi olla suositeltavaa käyttää toisesta lähteestä peräisin olevaa mädätyslietettä ja/tai lisätä suurempi pitoisuus testisubstraatin sekä ravinneliuoksen, hiivauutteen ja glukoosin seosta (29 kohta).

▼M6

Lisäys 4

Soveltaminen ympäristöstä kerättyihin näytteisiin, joissa biomassan pitoisuus on pieni (esimerkiksi anaerobinen lieju ja sedimentit)

Johdanto

A.1 Luonnossa tavattavassa anaerobisessa liejussa, sedimenteissä, maa-aineksissa ja vastaavissa mikrobien toiminta (yhtä kiintoainegrammaa kohti tuotetun kaasun määrä) jää yleensä huomattavasti vähäisemmäksi kuin jätevedestä peräisin olevassa anaerobisessa lietteessä. Mitattaessa kemikaalien inhibitiovaikutusta tällaisissa vähemmän aktiivisissa näytteissä onkin syytä muuttaa osaa koeolosuhteista. Vähemmän aktiivisille näytteille voidaan valita kahdesta mahdollisesta toimintatavasta:

a) Tehdään alustava testi (25 kohta) mukautetussa muodossa käyttämällä laimentamatonta lieju-, maa-aines- tai muuta näytettä lämpötilassa 35 °C ± 2 °C tai, jos halutaan tarkempaa simulointia, näytteen keruupaikan lämpötilassa (kuten standardin ISO 13 641 osassa 1 on kuvattu);

(b) Tai tehdään testi käyttämällä laimennettua (1:100) mädätyslaitoksesta peräisin olevaa lietettä, jotta voidaan simuloida luonnosta peräisin olevan näytteen todennäköisesti vähäistä aktiivisuutta, mutta annetaan lämpötilan olla 35 °C ± 2 °C (kuten standardin ISO 13 641 osassa 2 on kuvattu).

A.2 Vaihtoehto a) voidaan toteuttaa noudattamalla tässä kuvattua menetelmää (joka vastaa standardin ISO 13 641 osaa 1), mutta alustava testi (25 kohta) on välttämätön ihanteellisten testiolosuhteiden varmistamiseksi, jolleivät nämä olosuhteet ole tiedossa jo aiempien testien perusteella. Lieju- tai sedimenttinäyte on sekoitettava perusteellisesti esimerkiksi tehosekoittimessa ja tarvittaessa laimennettava pienellä määrällä vettä, josta ilma on poistettu (14 kohta), jotta näyte on riittävän juoksevaa siirrettäväksi suurikärkisellä pipetillä tai mittalasilla. Jos näytteestä epäillään puuttuvan ravintoaineita, liejunäyte voidaan sentrifugoida (anaerobisissa olosuhteissa) ja suspendoida uudelleen hiivauutetta sisältävään epäorgaaniseen aineeseen (A.11).

A.3 Vaihtoehto b) jäljittelee kohtuullisen hyvin ympäristöstä kerättyjen näytteiden vähäistä aktiivisuutta, mutta siitä puuttuu näytteisiin yleensä kuuluva runsas suspendoitunut kiintoaine. Kiintoaineiden merkitystä inhibitiolle ei tunneta, mutta on mahdollista, että testikemikaalien ja liejun ainesosien väliset reaktiot sekä testikemikaalien adsorboituminen kiintoaineisiin saattavat vähentää testikemikaalin myrkyllisyyttä.

A.4 Toinen tärkeä tekijä on lämpötila. Kun halutaan simulaation olevan mahdollisimman tarkkaa, testit on tehtävä näytteenottopaikan lämpötilassa, sillä erilaisten metaania tuottavien bakteeriryhmien tiedetään toimivan eri lämpötiloissa (termofiilit noin 30–35 °C:ssa, mesofiilit 20–25 °C:ssa ja psykrofiilit alle 20 °C:ssa), jolloin inhibitiovaikutukset voivat olla erilaisia.

A.5 Testin kesto. Yhteistutkimuksessa havaittiin, että yleisen testin 1. osassa, jossa käytettiin laimentamatonta lietettä, kaasua muodostui 2–4 vuorokaudessa aina riittävä määrä, mutta 2. osassa, jossa käytettiin yhteen sadasosapitoisuuteen laimennettua lietettä, kaasua muodostui liian vähän tai ei ollenkaan. Jälkimmäistä testiä tutkineiden Madsenin ym. (1996) mukaan testin keston olisi oltava vähintään seitsemän vuorokautta.

Testaaminen matalalla biomassapitoisuudella (vaihtoehto b)

Testin kuvaukseen tehdään seuraavat muutokset, joilla korvataan varsinaisen tekstin kohtia ja alakohtia tai lisätään uusia:

▼**M6**

A.6 Lisätään 6 kohtaan (Testin periaate) seuraava teksti:

”Tätä tekniikkaa voidaan käyttää anaerobiselle lietteelle, joka on laimennettu pitoisuuteen 1:100 osittain siksi, että näin voidaan simuloida liejun ja sedimenttien vähäistä aktiivisuutta. Inkubointilämpötila voi olla joko 35 °C tai se lämpötila, joka vallitsee näytteen keräyspaikassa. Bakteeritoiminta on huomattavasti laimentamatonta lietettä vähäisempää, joten inkubointiaikaa on pidennettävä vähintään seitsemään vuorokauteen.”

A.7 Lisätään 12(a) kohtaan seuraava maininta:

”Inkubaattorin on oltava sellainen, joka toimii alimmillaan 15 °C:n lämpötilassa.”

A.8 Lisätään ylimääräinen reagenssia 13 kohdan jälkeen:

”Fosforihappo (H_3PO_4), pitoisuus 85 prosenttia mitattuna massana vedessä.”

A.9 Lisätään 16 kohdan loppuun seuraava maininta:

”Testissä käytettävä lopullinen kiintoaineen kokonaispitoisuus on 0,20 ±0,05 g/l.”

A.10 17 kohta (Testissä käytettävä substraatti):

Tätä substraattia ei pidä käyttää, vaan se korvataan hiivauutteella (ks. 17 kohdan A.11, A.12 ja A.13 alakohdat).

A.11 Anaerobisen lietteen laimentamiseen tarvitaan hivenaineita sisältävää epäorgaanista ainetta, ja käytön helpottamiseksi aineeseen lisätään orgaanista substraattia eli hiivauutetta.

Lisätään 17 kohdan jälkeen seuraava maininta:

”a) Epäorgaanista testiainetta, joka sisältää hiivauutetta.

Epäorgaaninen aine valmistetaan 10-kertaisesti tiivistetystä testiaineesta (17(b) kohta; A.12) hivenaineliuoksen avulla (17(c) kohta; A.13). Käytä vastahankittua natriumsulfidinonahydraattia (17(b) kohta; A.12) tai pese ja kuivaa aine ennen käyttöä, jotta sen pelkistyskapasiteetti on riittävä. Jos testissä ei käytetä hansikaskaappia (12(j) kohta), natriumsulfidin määrää kantaliuoksessa olisi nostettava pitoisuuteen 2 g/l (pitoisuudesta 1 g/l). Natriumsulfidi voidaan lisätä myös asianmukaisesta sopivasta kantaliuoksesta suljettujen testipullojen tulpan kautta. Näin pienennetään hapettumisen riskiä. Lopullisen pitoisuuden on oltava 0,2 g/l. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää myös titaani(III)sitraattia (17(b) kohta). Lisää ainetta suljettujen testipullojen tulpan kautta siten, että pitoisuudeksi tulee 0,8–1,0 mmol/l. Titaani(III)sitraatti on erittäin tehokas pelkistävä aine, jonka myrkyllisyys on pieni, ja sitä valmistetaan seuraavasti: Liuotetaan 2,94 g trinatriumsitraaattidihydraattia 50 ml:aan hapetonta laimennusvettä (14 kohta) (jolloin saadaan liuos, jonka pitoisuus on 200 mmol/l) ja lisätään 5 ml titaani(III)kloridiliuosta (15 g/100 ml laimennusvettä). Liuos neutraloidaan pH-arvoon 7 ± 0,5 natriumkarbonaatilla ja laitetaan se sopivaan seerumipulloon typpikaasuvirtauksen alla. Tässä kantaliuoksessa titaani(III)sitraatin pitoisuus on 164 mmol/l. Käytä testiaine välittömästi tai säilytä sitä 4 °C:ssa enintään yhden vuorokauden ajan.

A.12 b) Kymmenkertaiseksi tiivistettyä testiainetta, joka valmistetaan seuraavista:

vedetöntä dikaliumvetyfosfaattia (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatriumvetyfosfaattia (Na_2HPO_4)	4,4 g
(tai 11,2 g dodekahydraattia)	5,3 g
ammoniumkloridia (NH_4Cl)	

▼**M6**

kalsiumkloridihydraattia ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnesiumkloridiheksahydraattia ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
rauta(II)kloriditetrahydraattia ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resatsuriinia (hapetus-pelkistysreaktion indikaattoria)	0,01 g
natriumsulfidinonahydraattia ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(tai titanium(III)sitraattia): lopullinen pitoisuus	0,8–1,0 mmol/l
hivenaineliuosta (ks. 17(c) kohta; A.13)	10,0 ml
hiivauutetta	100 g
Liuotetaan laimennusveteen (14 kohta) ja lisätään vettä niin paljon, että tilavuudeksi saadaan	1 000 ml

A.13 c) Hivenaineliuosta, joka valmistetaan seuraavista:

mangaaneesi(II)kloriditetrahydraattia ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
ortoboorihappoa (H_3BO_3)	0,05 g
sinkkikloridia ($ZnCl_2$)	0,05 g
kupari(II)kloridia ($CuCl_2$)	0,03 g
natriummolybdaattidihydraattia ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
koboltti(II)kloridiheksahydraattia ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
nikkeli(II)kloridiheksahydraattia ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dinatriumseleniittiä (Na_2SeO_3)	0,05 g
Liuotetaan laimennusveteen (14 kohta) ja lisätään vettä niin paljon, että tilavuudeksi saadaan	1 000 ml”

A.14 25 kohta (Alustava testi)

Kuvauksen 25 kohdan mukainen alustava testi on välttämätön, mutta sillä erotuksella, että lietteen kiintoainepitoisuuden on oltava yksi sadasosa mainituista arvoista eli 0,1 g/l, 0,2 g/l ja 0,4 g/l. Inkuboinnin keston on oltava vähintään seitsemän vuorokautta.

Huomaa: Yhteistutkimuksessa (5) kaasutilan tilavuus oli liian suuri, kun se oli 75 prosenttia kokonaistilavuudesta. Kaasutilan suositeltava tilavuus on 10–40 prosenttia. Merkityksellinen kriteeri on se, että inhibition ollessa noin 80 prosenttia muodostuneen kaasun tilavuus on voitava mitata hyväksyttävällä tarkkuudella (esimerkiksi ± 5…± 10 prosenttia).

A.15 26–30 kohta (Testikemikaalien lisääminen sekä siirrosteen ja substraatin lisääminen)

Lisääminen tehdään näissä kohdissa kuvatulla tavalla, mutta substraattiliuoksen (17 kohta) sijasta käytetään testiainetta sekä hiivauutesubstraattia (A.11).

Samalla kuivan kiintoaineen lopullista pitoisuutta vähennetään arvosta 2–4 g/l arvoon 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Kaksi esimerkkiä ainesosien lisäämisestä testiseokseen annetaan taulukossa A.1, joka korvaa 29 kohdassa olevan taulukon.

A.16 33 kohta (Pullojen inkubaatio)

Kaasun muodostumisen odotetaan olevan vähäisempää, minkä vuoksi inkubaatiota jatketaan vähintään seitsemän vuorokauden ajan.

▼**M6**

A.17 34 kohta (Paineen mittaaminen)

Paine mitataan pullojen kaasutilasta samalla tavalla kuin 34 kohdassa on kuvattu, jos halutaan tietää määrät kaasufaasissa. Jos mitattava suure on CO_2:n ja CH_4:n yhteismäärä, nestefaasin pH-arvoa pienennetään noin arvoon 2 injektoimalla H_3PO_4:ää jokaiseen tarvittavaan pulloon ja mittaamalla paine sen jälkeen, kun pulloja on ravisteltu 30 minuutin ajan testilämpötilassa. Lisätietoa siirrosteen laadusta saadaan kuitenkin mittaamalla jokaisen pullon paine ennen ja jälkeen happamuuden lisäämistä. Esimerkiksi tilanteessa, jossa CO2:ta muodostuu huomattavasti enemmän kuin metaania, fermentatiivisten bakteerien herkkyys voi muuttua ja/tai testikemikaalin käyttäytyminen suosii metanogeenisia bakteereja.

A.18 36 kohta (pH:n mittaaminen)

H_3PO_4:ää käytettäessä on etenkin pH-arvon mittaamista varten varattava myös ylimääräisiä pulloja, jotka eivät sisällä H_3PO_4:ää.

Lähde:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Taulukko A.1

Esimerkkejä testierille käytettävästä koeasetelmasta

Reaktioseoksen ainesosat	Esimerkki 1	Esimerkki 2	Tavanomainen lisäämisjärjestys
Valmistetun siirrosteen pitoisuus (g/l)	0,42	2,1	—
Lisätyn siirrosteen määrä (ml)	45	9	4
Siirrosteen pitoisuus testipulloissa (g/l)	0,20	0,20	—
Lisätyn testiaineen määrä (ml)	9	9	2
Lisätyn laimennusveden määrä (ml)	36	72	3
Hiivauutteen pitoisuus testipulloissa (g/l)	9,7	9,7	—
Testikemikaalin kantaliuoksen määrä (ml)	3	3	1
Nesteen tilavuus yhteensä (ml)	93	93	—

▼**M6**

Lisäys 5

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Kemikaali: aine tai seos.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M6

C.35. MYRKYLLISYYSTESTI *LUMBRICULUS*-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN KÄSITELTYÄ SEDIMENTTIÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 225 (2007). Sedimenttiä ravinnokseen nielevät pohjaeläimet saattavat altistua suurille pitoisuuksille sedimenttiin sitoutuneita kemikaaleja, minkä vuoksi niihin olisi kiinnitettävä erityishuomiota (esimerkiksi (1), (2), (3)). Näistä sedimenttiä nielevistä eläimistä vedessä elävillä harvasukasmadoilla on tärkeä tehtävä vesijärjestelmien sedimenteissä. Koska nämä eläimet muokkaavat sedimenttiä ja koska ne ovat myös saaliseläimiä, ne voivat vaikuttaa voimakkaasti haitallisten kemikaalien biologiseen saatavuuteen muille organismeille, kuten pohjaeläimiä syöville kaloille. Toisin kuin pohjan päällä elävät organismit, vedenpohjassa elävät harvasukasmadot (esimerkiksi *Lumbriculus variegatus*) kaivautuvat sedimenttiin ja nielevät ravinnokseen sedimenttihiukkasia sedimentin pinnan alta. Näin testiorganismit altistuvat varmasti testikemikaalille kaikkia mahdollisia reittejä (esimerkiksi joutumalla suoraan kosketukseen kemikaalien kanssa ja kontaminoituneita sedimenttihiukkasia nielemällä, mutta myös huokosveden ja yläpuolisen veden kautta).

2. Tällä testimenetelmällä arvioidaan vaikutuksia, joita pohjassa elävälle harvasukasmadolle *Lumbriculus variegatus* (Müller) koituu pitkäaikaiseta altistuksesta sedimentteihin kertyville kemikaaleille. Menetelmä perustuu nykyisiin sedimentin myrkyllisyyttä ja biokertyvyyttä koskeviin testisuunnitelmiin, esimerkiksi (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Menetelmä on kuvattu staattisia testiolosuhteita varten. Tässä testimenetelmässä altistus tapahtuu lisäämällä sedimenttiin testikemikaalia. Käsitellyn sedimentin käyttämisellä simuloidaan testikemikaalilla kontaminoitunutta sedimenttiä.

3. Kemikaalit, joita sedimentissä elävillä eliöillä testataan, säilyvät yleensä sedimentissä pitkään. Sedimentissä elävät organismit voivat altistua useita reittejä pitkin. Jokaisen altistusreitin suhteellinen tärkeys sekä toksiseen kokonaisvaikutukseen vaadittava aika määräytyvät käytettävän kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ja eläimen elimistössä kulkeutumisen mukaan. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva kemikaali (esim. log K_{ow} > 5) tai kemikaali, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, kontaminoituneen ravinnon nauttiminen voi olla tärkeä altistusreitti. Jotta tällaisten kemikaalien myrkyllisyyttä ei aliarvioida, testiorganismien lisääntymiseen ja kasvuun tarvittavaa ruokaa on lisättävä sedimenttiin ennen testiaineen applikointia (11). Kuvattu testimenetelmä on riittävän yksityiskohtainen, jotta testi voidaan tehdä, vaikka testijärjestelyjä olisi mukautettava yksittäisten laboratorioiden olosuhteiden sekä testikemikaalien erilaisten ominaisuuksien mukaan.

4. Testimenetelmällä on tarkoitus todeta testikemikaalin vaikutukset testiorganismien lisääntymiseen ja biomassaan. Mitattavia biologisia parametreja ovat eloonjääneiden matojen kokonaismäärä ja biomassa (kuivapaino) altistuksen lopussa. Data analysoidaan joko regressiomallilla, jolloin voidaan arvioida pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen (esimerkiksi EC50, EC25 ja EC10) tai tilastollisella hypoteesitestauksella, jolloin saadaan selville NOEC- (No Observed Effect Concentration eli pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia) ja LOEC-arvo (Lowest Observed Effect Concentration eli pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus).

5. Tämän liitteen luvussa C.27 (Surviaissääskillä tehtävä myrkyllisyystesti, käyttäen vettä tai sedimenttiä, joihin on lisätty tutkittavaa ainetta (6)) on mainittu useita olennaisia ja hyödyllisiä seikkoja, joilla esitetyn sedimentin myrkyllisyystestimenetelmän toimivuutta voidaan parantaa. Tämä asiakirja toimiikin pohjadokumenttina, johon on kirjattu muutoksia, joita sedimentin myrkyllisyystestien suorittaminen *Lumbriculus variegatus* -eliöllä edellyttää. Muita tekstissä mainittuja asiakirjoja ovat esimerkiksi ASTM:n Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated

▼M6

Contaminants by Benthic Invertebrates (3), U.S. EPA:n Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7) sekä ASTM:n Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12). Muita tärkeitä tietolähteitä asiakirjaa laadittaessa ovat olleet testimenetelmän yhteistutkimuksen kuluessa saatu käytännön kokemus ((13), yhteistutkimuksen testiraportti) sekä kirjallisuudesta peräisin olevat tiedot.

POHJATIEDOT JA OHJEET

6. Tietoa testikemikaalista (turvallisuustoimenpiteet ja asianmukaiset säilytysolosuhteet) ja analyysimenetelmistä on hankittava ennen tutkimuksen aloittamista. Kirjallisuusviitteessä (14) annetaan ohjeita sellaisten kemikaalien testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

7. Ennen testin tekemistä testiaineesta on oltava tiedossa seuraavat:

— yleisnimi, kemiallinen nimi (mieluiten IUPAC-nimi), rakennekaava, CAS-numero, puhtaus

— höyrynpaine

— vesiliukoisuus.

8. Seuraavista tiedoista saattaa lisäksi olla hyötyä ennen testin aloittamista:

— oktanoli/vesi-jakautumiskerroin K_{ow}

— orgaaninen hiili-vesi-jakautumiskerroin K_{oc}

— hydrolyysi

— valokemiallinen muuntuminen vedessä

— biologinen hajoavuus

— pintajännitys.

9. Tiedot käytettävän sedimentin eräistä ominaisuuksista on hankittava ennen testin aloittamista (7). Ks. tarkemmin 22–25 kohta.

TESTIN PERIAATE

10. Samankaltaisessa fysiologisessa tilassa olevat madot (jotka on synkronoitu lisäyksessä 5 kuvatulla tavalla) altistetaan sarjalle myrkyllisiä pitoisuuksia, joita on applikoitu sedimentti-vesijärjestelmän sedimenttifaasiin. Väliaineena käytetään keinosedimenttiä sekä synteettistä vettä. Kontrolleina toimivat testiastiat, joihin ei lisätä testikemikaalia. Testikemikaalin eri pitoisuudet lisätään sedimenttiin irtonaisena, jolloin vaihtelu kunkin pitoisuustason rinnakkaisnäytteiden välillä saadaan pidettyä mahdollisimman pienenä, minkä jälkeen testiorganismit siirretään testiastioihin, joissa sedimentti- ja vesipitoisuudet on tasapainotettu (ks. 29 kohta). Koe-eläimet altistetaan sedimentti-vesijärjestelmille 28 vuorokauden ajan. Keinosedimentin ravinnepitoisuus on alhainen, minkä vuoksi sedimentteihin on lisättävä ravintolähde (ks. 22 ja 23 kohta sekä lisäys 4), jotta voidaan varmistaa, että madot kasvavat ja lisääntyvät kontrolliolosuhteissa. Samalla varmistetaan, että koe-eläimet altistuvat paitsi veden ja sedimentin, myös ravinnon kautta.

11. Suositeltavia tutkittavia ominaisuuksia tällaisessa tutkimuksessa ovat lisääntymisen EC_x-arvo (esimerkiksi EC_{50}, EC_{25} ja EC_{10} eli vaikuttava pitoisuus, joka vaikuttaa x prosenttiin testiorganismeista) sekä biomassa kontrolliin

▼M6

verrattuna. On kuitenkin syytä huomata, että kun huomioon otetaan pienen EC_x-arvon (esimerkiksi EC_{10} tai EC_{25}) erittäin suuri epätodennäköisyys, varsin korkeat 95 prosentin luottamusvälit (esimerkiksi (15)) sekä hypoteesitestauksen aikana laskettu tilastollinen voima, katsotaan EC_{50} kaikkein luotettavimmaksi tutkittavaksi ominaisuudeksi. Biomassalle ja lisääntymiselle voidaan lisäksi laskea NOEC-arvo (No Observed Effect Concentration eli pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia) ja LOEC-arvo (Lowest Observed Effect Concentration eli pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus), jos testijärjestely ja data tukevat näitä laskelmia (ks. 34–38 kohta). Testijärjestely valitaan sen mukaan, onko tutkimuksen tarkoituksena saada selville EC_x- vai NOEC-arvo.

VERTAILEVAT TESTIT

12. Oletuksena on, että kontrolliorganismien toiminta osoittaa riittävällä tavalla, että laboratorio pystyy suorittamaan testin, ja jos historiallista dataa on saatavilla, myös testin toistettavuuden. Testiorganismien herkkyyden arvioimiseksi voidaan lisäksi tehdä säännöllisin väliajoin vertailevia myrkyllisyystestejä, joissa käytetään vertailumyrkkyä. Koe-eläinten herkkyys ja tila voidaan tyydyttävästi osoittaa vain vedessä tehtävillä 96 tunnin vertailevilla myrkyllisyystesteillä (4), (7). Tietoa pentakloorifenolin (PCP) myrkyllisyydestä lyhentämättömissä testeissä (28 vuorokauden altistus käsitellylle sedimentille) on lisäyksessä 6 sekä testimenetelmän yhteistutkimuksesta laaditussa raportissa (13). PCP:n välitön myrkyllisyys vain vedessä kuvataan esimerkiksi kirjallisuusviitteessä (16). Tätä tietoa voidaan käyttää verrattaessa testiorganismin herkkyyttä vertailevissa testeissä, kun vertailumyrkkynä on PCP. Kaliumkloridia (KCl) tai kuparisulfaattia ($CuSO_4$) on suositeltu vertailumyrkyiksi *L. variegatus* -lajille (4), (7). Toistaiseksi kaliumkloridin myrkyllisyystietoihin perustuvien laatukriteerien määrittäminen on vaikeaa, sillä vaikutuksista *L. variegatus* -lajiin on saatavilla niukasti kirjallisuustietoa. Tietoa kuparin myrkyllisyydestä *L. variegatus* -lajille on kirjallisuusviitteissä (17)–(21).

TESTIN VALIDITEETTI

13. Testi on validi, jos seuraavat edellytykset täyttyvät:

— Yhteistutkimuksella on osoitettu, että *Lumbriculus variegatus* -lajilla elävien matojen keskimäärän kontrollien rinnakkaisnäytettä kohti pitäisi kasvaa ainakin 1,8-kertaiseksi altistusjakson lopussa verrattuna matojen määrään rinnakkaisnäytettä kohti altistusjakson alussa.

— Yläpuolisen veden pH:n on oltava 6–9 koko testin ajan.

— Yläpuolisen veden happipitoisuus ei testin aikana saa laskea alle 30 prosenttiin ilman kyllästysarvosta (ASV) testilämpötilassa.

TESTIMENETELMÄN KUVAUS

Testijärjestelmä

14. Testauksessa suositellaan käytettäväksi staattisia järjestelmiä, joissa yläpuolinen vesi ei vaihdu. Jos sedimentin ja veden välinen suhdeluku (ks. 15 kohta) on sopiva, varovainen ilmastaminen riittää yleensä pitämään veden laadun testiorganismien kannalta hyväksyttävällä tasolla (esimerkiksi maksimoimaan liuenneen hapen määrän ja pitämään ulosteiden kertymisen mahdollisimman vähäisenä). Semistaattisia tai läpivirtausjärjestelmiä, joissa yläpuolinen vesi vaihtuu säännöllisesti tai jatkuvasti, käytetään vain poikkeustapauksissa, sillä yläpuolisen veden säännöllisen vaihtumisen voidaan olettaa vaikuttavan kemialliseen tasapainoon (esimerkiksi testikemikaalin häviämiseen testijärjestelmästä).

Koeastiat ja -välineet

15. Altistuminen tapahtuu dekantterilaseissa, joiden tilavuus on esimerkiksi 250 ml ja halkaisija 6 cm. Muitakin lasiastioita voidaan käyttää, kunhan sedimentin ja sen yläpuolisen veden syvyys on sopiva. Jokaiseen astiaan tulee noin 1,5–3 cm paksu kerros synteettistä sedimenttiä. Sedimenttikerroksen ja sen päällä olevan veden syvyyden suhteen on oltava 1:4. Astioiden

▼M6

tilavuuden on oltava täyttöasteen kannalta riittävä eli sedimentin painoyksikköä kohti lisättyjen testimatojen lukumäärälle sopiva (ks. myös 39 kohta).

16. Astioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testikemikaalin kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Missään laitteiston osissa ei saa käyttää materiaaleja, jotka voivat liuottaa tai adsorboida testikemikaalia, joista voi liueta muita kemikaaleja ja jotka voivat vaikuttaa haitallisesti koe-eläimiin. Kaikissa laitteissa, jotka ovat kosketuksissa testiväliaineeseen, on käytettävä polytetrafluoroetyleenistä (PTFE), ruostumattomasta teräksestä ja/tai lasista valmistettuja osia. Jos käytetään orgaanisia kemikaaleja, joiden tiedetään adsorboituvan lasiin, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet on heitettävä pois käytön jälkeen.

Testilajit

17. Tässä tutkimuksessa käytettävä testilaji on makeassa vedessä elävä harvasukasmato *Lumbriculus variegatus* (Müller). Laji kykenee elämään monenlaisissa sedimenteissä ja sitä käytetään yleisesti sedimentin myrkyllisyyden ja biokertyvyyden testauksessa [esimerkiksi (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Koe-eläinten alkuperä, lajin tunnistamistapa (esimerkiksi (6)) sekä viljelyolosuhteet on raportoitava. Lajin tunnistusta ei ole tarpeen tehdä ennen joka testiä, jos eliöt ovat peräisin laboratorion omasta viljelmästä.

Testiorganismien viljely

18. Matoja kannattaa pitää pysyvässä laboratorioviljelmässä, jolloin niitä on aina riittävästi sedimentin myrkyllisyystestejä varten. Ohjeita *Lumbriculus variegatus* -lajin viljelymenetelmistä laboratoriossa sekä aloitusviljelmien lähteitä on mainittu lisäyksessä 5. Tarkempia tietoja lajin viljelystä on lähdeviitteissä (3), (7) ja (27).

19. On erittäin suositeltavaa pitää yhdessä viljelmässä vain yhden lajin edustajia, jotta testien suorittamiseen käytetään varmasti aina saman lajin eläimiä. On syytä varmistaa, ettei viljelmissä eikä etenkään testeissä käytettävissä madoissa ole havaittavissa tauteja tai poikkeavuuksia.

Vesi

20. Testissä käytettäväksi yläpuoliseksi vedeksi suositellaan tämän liitteen C.1 luvun (37) mukaista synteettistä vettä, jota voidaan käyttää myös matojen laboratorioviljelmissä (synteettisen veden valmistamisesta ks. lisäys 2). Tarvittaessa voidaan käyttää myös luonnonvettä. Valitun veden on oltava laadultaan sellaista, että koe-eläimet kasvavat ja lisääntyvät siinä totuttautumisvaiheen ja testin ajan ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään poikkeavaa. On osoitettu, että *Lumbriculus variegatus* pysyy elossa, kasvaa ja lisääntyy tällaisessa vedessä (30), jossa testi- ja kasvatusolosuhteet on vakioitu mahdollisimman pitkälle. Synteettistä vettä käytettäessä on ilmoitettava sen koostumus ja mainittava ennen käyttöä ainakin veden pH-arvo, happipitoisuus ja kovuus (ilmaistuna milligrammoina $CaCO_3$:ta litrassa). Hyödyllistä tietoa saatetaan saada, jos vedestä analysoidaan mikrosaasteet ennen käyttöä (ks. esimerkiksi lisäys 3).

21. Yläpuolisen veden pH:n on oltava 6,0–9,0 (ks. 13 kohta). Jos ammoniakin muodostumisen odotetaan olevan runsasta, on hyvä pitää pH-arvo välillä 6,0–8,0. Esimerkiksi laimeiden orgaanisten happojen testaamista varten on suositeltavaa säätää pH-arvoa puskuroimalla testissä käytettävä vesi esimerkiksi kirjallisuusviitteessä (16) kuvatulla tavalla. Luonnonvettä käytettäessä testissä käytettävän veden kokonaiskovuuden on oltava 90–300 mg $CaCO_3$:ta litrassa. Lisäyksessä 3 on yhteenveto hyväksyttävän laimennusveden muista kriteereistä OECD:n testiohjeen (TG) nro 210 (38) mukaisesti.

▼M6

Sedimentti

22. Kontaminoitumattomia luonnonsedimenttejä ei ole välttämättä saatavilla tietystä lähteestä kaikkina vuodenaikoina, minkä lisäksi paikalliset organismit ja mahdolliset mikrosaasteet saattavat vaikuttaa testiin. Tästä syystä on suositeltavinta käyttää synteettistä sedimenttiä (jota kutsutaan myös keinotekoiseksi sedimentiksi tai keinosedimentiksi). Synteettistä sedimenttiä käytettäessä testiolosuhteiden vaihtelu sekä paikallisten eläinten joutuminen testiin pysyy mahdollisimman vähäisenä. Seuraava synteettinen sedimentti perustuu kirjallisuusviitteissä (6), (39) ja (40) kuvattuun keinosedimenttiin. Tässä testissä suositellaan käytettäväksi seuraavanlaista synteettistä sedimenttiä ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):

a) 4–5 prosenttia (kuivapaino) rahkaturvetta; on tärkeää käyttää vain hienoksi jauhettua (hiukkaskoko ≤ 0,5 mm), ilmakuivattua turvetta, jonka maatumisaste on medium.

b) 20 ± 1 prosenttia (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 prosenttia).

c) 75–76 prosenttia (kuivapaino) hienoa kvartsihiekkaa (jyväskoko ≤ 2 mm, mutta > 50 prosenttia hiukkasista olisi oltava kooltaan 50–200 μm).

d) Deionisoitua vettä 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta sedimentin kuivien ainesosien lisäksi.

e) Kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoa voidaan säätää.

f) Orgaanisen hiilen kokonaispitoisuuden lopullisessa seoksessa on oltava 2 prosenttia (±0,5 prosenttia) sedimentin kuivapainosta. Pitoisuutta voidaan säätää lisäämällä sopiva määrä turvetta ja hiekkaa kohtien a ja c mukaisesti.

g) Ruokaa, esimerkiksi nokkosen (*Urtica sp*., lääkestandardien ja elintarvikkeita koskevien vaatimusten mukaisesti) hienoksi jauhettuja lehtiä tai seosta, jossa on *Urtica sp.* -lajin hienoksi jauhettuja lehtiä ja alfaselluloosaa suhteessa 1:1; määrä on noin 0,4–0,5 prosenttia sedimentin kuivapainosta sedimentin kuivien ainesosien lisäksi; lisätietoa on lisäyksessä 4.

23. Turpeen, kaoliniittisaven, ravinnon ja hiekan alkuperän on oltava tiedossa. Kohdassa g) mainitun ruoan lisäksi tämän liitteen luvussa C.27 (6) on lueteltu muita kasvimateriaaleja, joita voidaan käyttää ruokinnassa: sopivia ovat valkomulperin (*Morus alba*), valkoapilan (*Trifolium repens*), pinaatin (*Spinacia oleracea*) tai viljakasvien itujen kuivatut lehdet.

24. Valittu ravinnonlähde on lisättävä astioihin ennen kuin sedimenttiin lisätään testikemikaali tai kemikaalin lisäämisen aikana. Valitun ravinnonlähteen on oltava sellainen, jota käytettäessä lisääntyminen kontrolleissa on vähintään tyydyttävällä tasolla. Hyödyllistä tietoa voidaan saada, kun keinosedimentistä tai sen ainesosista analysoidaan mikrosaasteet ennen sen käyttöä. Esimerkki synteettisen sedimentin valmistuksesta on lisäyksessä 4. Myös kuivien ainesosien sekoittaminen on hyväksyttävää, jos voidaan osoittaa, että sedimentin ainesosat eivät erotu (esimerkiksi kelluvia turvehiukkasia) yläpuolisen veden lisäämisen jälkeen ja että turve tai sedimentti on vakioitunut riittävästi (ks. myös 25 kohta sekä lisäys 4). Keinosedimentistä on mainittava vähintään ainesosien alkuperä, raekokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet), orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC), vesipitoisuus ja pH. Hapetus-pelkistyspotentiaalin mittaus on vapaaehtoista.

25. Tarvittaessa (esimerkiksi tiettyihin testaustarkoituksiin) testi- ja/tai kasvatussedimenttinä (3) voidaan käyttää myös luonnonsedimenttiä, joka on peräisin saastumattomilta alueilta. Luonnonsedimenttiä käytettäessä siitä on mainittava vähintään ainesosien alkuperä (keruupaikka), huokosveden pH-arvo ja ammoniakkipitoisuus, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) ja typpipitoisuus, hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet)

▼M6

sekä prosentuaalinen vesipitoisuus. Luonnonsedimentissä ei saa olla minkäänlaista kontaminaatiota eikä muita organismeja, jotka saattavat kilpailla testiorganismien kanssa tai käyttää niitä saaliseläiminään. Hapetus-pelkistyspotentiaalin sekä kationinvaihtokyvyn mittaaminen ei ole pakollista. Lisäksi on suositeltavaa, että ennen kuin luonnolliseen sedimenttiin lisätään testiainetta, sitä vakioidaan seitsemän päivän ajan samoissa olosuhteissa, jotka testissä vallitsevat. Tämän vakioimisvaiheen jälkeen yläpuolinen vesi on poistettava ja hävitettävä.

26. Käytettävän sedimentin on oltava laadultaan sellaista, että kontrolliorganismit pysyvät siinä elossa ja lisääntyvät koko altistumisajan ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään poikkeavaa. Kontrollimatojen kuuluu kaivautua sedimenttiin ja niellä sitä. Kontrolleissa tapahtuvan lisääntymisen on oltava vähintään 13 kohdassa mainitun hyväksyttävyyskriteerin mukaista. Tiedot sedimentin pinnalla olevista ulostepelleteistä, jotka ovat merkki siitä, että madot nielevät sedimenttiä, tai niiden puuttumisesta on kirjattava ylös, sillä ne saattavat helpottaa testitulosten tulkintaa altistumisreittien kannalta. Lisää tietoa sedimentin nielemisestä voidaan saada käyttämällä lähdeviitteissä (24), (25), (44) ja (45) kuvattuja menetelmiä, joissa selvitetään, miten testiorganismit nielevät sedimenttiä tai valitsevat hiukkasia.

27. Luonnollisten sedimenttien käsittelyä ennen niiden käyttöä laboratoriossa kuvataan kirjallisuusviitteissä (3), (7) ja (12). Keinotekoisen sedimentin, jota suositellaan käytettäväksi *Lumbriculus*-eliöillä tehtävässä testissä, valmistamisesta ja säilytyksestä kerrotaan lisäyksessä 4.

Testikemikaalin lisääminen

28. Testikemikaali lisätään sedimenttiin. Oletuksena on, että useimmat testikemikaalit liukenevat huonosti veteen, minkä vuoksi ne on liuotettava sopivaan orgaaniseen liuottimeen (esimerkiksi asetoni, n-heksaani tai sykloheksaani) mahdollisimman pienenä määränä kantaliuoksen valmistamista varten. Testiliuoksia valmistettaessa kantaliuosta laimennetaan samalla liuottimella. Liuottimen myrkyllisyys ja haihtuvuus sekä testikemikaalin liukenevuus valittuun liuottimeen ovat tärkeimmät kriteerit soveltuvan liuotusapuaineen valinnassa. Jokaista pitoisuustasoa varten käytetään saman verran vastaavaa liuosta. Testikemikaalin eri pitoisuustasot lisätään sedimenttiin irtonaisena, jolloin vaihtelu testikemikaalien pitoisuuksien rinnakkaisnäytteiden välillä saadaan pidettyä mahdollisimman pienenä. Tämän jälkeen testiliuokset sekoitetaan kvartsihiekkaan 22 kohdan mukaisesti (esimerkiksi 10 g kvartsihiekkaa testiastiaa kohti). Riittäväksi määräksi, jolla kvartsihiekka saadaan kasteltua kokonaan, on todettu 0,20–0,25 ml yhtä hiekkagrammaa kohti. Tämän jälkeen liuottimen annetaan haihtua, kunnes hiekka on kuivaa. Päällystetty hiekka on käytettävä välittömästi kuivaamisen jälkeen, jotta testikemikaalia haihtuu liuottimen mukana mahdollisimman vähän (esimerkiksi kemikaalin höyrynpaineen mukaan). Kuiva hiekka sekoitetaan sopivaan määrään vastaavan pitoisuustason synteettistä sedimenttiä. Testikemikaalin ja hiekkaseoksen mukana tuleva hiekka on otettava huomioon sedimentin valmistuksessa (eli sedimentin valmistukseen on käytettävä pienempi määrä hiekkaa). Menettelyn tärkeimpänä etuna on, että sedimenttiin ei joudu oikeastaan lainkaan liuotinta (7). Vaihtoehtoisesti esimerkiksi kentältä kerättyä sedimenttiä käytettäessä testikemikaali voidaan lisätä kuivattuun ja hienoksi jauhettuun sedimentin osaan samalla tavoin kuin edellä kuvattiin kvartsihiekan yhteydessä, tai sekoittamalla testikemikaali märkään sedimenttiin ja antamalla mahdollisen liuotusapuaineen höyrystyä. Varmista huolellisesti, että sedimenttiin lisättävä testikemikaali sekoittuu sedimenttiin hyvin ja tasaisesti. Tarvittaessa haluttujen pitoisuuksien muodostuminen sedimenttiin ja homogeenisuuden aste voidaan todeta osanäytteiden analyysilla. Myös testiliuosten osanäytteitä analysoimalla voidaan todeta, että sedimenttiin on saatu halutut pitoisuudet. Kvartsihiekka päällystetään testikemikaalilla liuottimen avulla, minkä vuoksi tarvitaan liuotinkontrolli, jota valmistettaessa käytetään yhtä paljon liuotinta kuin testisedimenteissä. Testikemikaalin lisäämisessä käytetty menetelmä sekä perustelut muun kuin edellä kuvatun

▼M6

lisäämismenetelmän valinnalle on ilmoitettava raportissa. Lisäämismenetelmää voidaan mukauttaa testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan esimerkiksi siksi, että näin voidaan välttää kemikaalin menettäminen haihtumisen vuoksi lisäämisen tai järjestelmän tasapainottumisen aikana. Lisää ohjeita testiaineen lisäämismenettelyistä on julkaisussa Environment Canada (1995) (46).

29. Kun sedimentti on valmistettu ja testikemikaali lisätty, sedimentti jaettu rinnakkaisiin testiastioihin ja testivettä lisätty, on suotavaa antaa testikemikaalin erottua sedimentistä vesifaasiin (esimerkiksi (3), (7), (9)). Tämä on suositeltavaa tehdä samoissa lämpötila- ja ilmastusolosuhteissa, joita testissä käytetään. Sopiva tasapainottumisaika määräytyy sedimentin ja kemikaalin mukaan, ja se voi vaihdella tunneista päiviin tai harvinaisissa tapauksissa jopa useampiin viikkoihin (4–5 viikkoa) (esimerkiksi (27), (47)). Tässä testissä tasapainottumista ei odoteta, vaan suositeltu tasapainottumisaika on 48 h – 7 päivää. Näin testikemikaalin hajoamisaika jää mahdollisimman lyhyeksi. Tutkimuksen tarkoituksen mukaan (esimerkiksi jos tarkoitus on jäljitellä ympäristöolosuhteita) käsiteltyä sedimenttiä voidaan tasapainottaa tai vanhentaa pidemmänkin aikaa.

30. Tasapainottumisajan lopulla otetaan näytteitä testikemikaalin pitoisuuden analysointia varten vähintään yläpuolisesta vedestä sekä irtosedimentistä ainakin suurimmasta ja yhdestä pienemmästä pitoisuudesta. Näiden testikemikaalin analyyttisten määritysten perusteella voidaan laskea massatase, ja tulokset ilmoitetaan mitattujen pitoisuuksien pohjalta. Yleisesti ottaen näytteenotto häiritsee sedimentti-vesijärjestelmää tai tuhoaa sen. Siksi ei ole yleensä mahdollista käyttää samoja rinnakkaisnäytteitä sedimentistä ja madoista otettaviin näytteisiin. Tämän vuoksi on varattava riittävän kokoisia analyysiastioita, jotka käsitellään samalla tavalla (mukaan lukien testiorganismien käyttö), mutta joista ei tehdä biologisia havaintoja. Astioiden koko valitaan siten, että näytteitä saadaan analyysimenetelmässä tarvittava määrä. Näytteenottoa käsitellään tarkemmin 53 kohdassa.

TESTIN SUORITTAMINEN

Alustava testi

31. Jos testikemikaalin myrkyllisyydestä *Lumbriculus variegatus* -lajille ei ole olemassa tietoa, voi olla hyödyllistä tehdä alustava koe, jonka avulla päätetään varsinaisessa testissä testattava pitoisuusalue sekä optimoidaan varsinaisen testin olosuhteet. Tähän tarkoitukseen käytetään testikemikaalin pitoisuuksia laajoin pitoisuusvälein. Madot altistetaan testikemikaalin jokaiselle pitoisuudelle tietyn aikaa (esimerkiksi 28 vuorokauden ajan, kuten varsinaisessa testissä), jolloin voidaan arvioida sopivat testipitoisuudet; tässä vaiheessa ei tarvita rinnakkaisnäytteitä. Alustavan testin aikana tulee tarkkailla matojen käyttäytymistä, esimerkiksi sedimentin välttelyä, mikä voi johtua testikemikaalista ja/tai sedimentistä, ja sitä koskevat havainnot on kirjattava muistiin. Alustavassa testissä testattavien pitoisuuksien on oltava alle 1 000 mg sedimentin kuivapainokiloa kohti.

Varsinainen testi

32. Varsinaisessa testissä käytetään vähintään viittä pitoisuutta, joiden valintaperusteena on alustavan pitoisuusalueen määritystestin tulos (31 kohta); pitoisuuksien valinta kuvataan 35, 36, 37 ja 38 kohdassa.

▼M6

33. Testisarjan lisäksi käytetään yhtä kontrollia, jossa on mukana kaikki ainesosat testikemikaalia lukuun ottamatta (rinnakkaisnäytteistä katso 36, 37 ja 38 kohta). Jos testikemikaalin applikoinnissa käytetään liuotusapuainetta, pelkkää liuotinta sisältävän kontrollin avulla osoitetaan, että apuaineella ei ole merkittävää vaikutusta testiorganismeihin.

Testijärjestely

34. Testijärjestely tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, astioiden lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja kuhunkin astiaan lisättyjen matojen lukumäärää. EC_x- ja NOEC-arvon estimointia sekä raja-arvotestin tekemistä varten tarvittavat järjestelyt kuvataan 35, 36, 37 ja 38 kohdissa.

35. Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. EC_{50}, EC_{25} tai EC_{10}) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testikemikaalin kannalta. Huomattavasti pienimmän testiorganismeihin vaikuttavan pitoisuuden alapuolelle tai suurimman testatun pitoisuuden yläpuolelle menevää ekstrapolointia tulee välttää. Jos poikkeustapauksissa tehdään tällainen ekstrapolointi, toimenpide on perusteltava raportissa.

36. Jos on tarkoitus estimoida EC_x-arvoa, on testattava vähintään viisi pitoisuutta ja vähintään kolme rinnakkaisnäytettä jokaista pitoisuutta kohti; kontrollia tai tarvittaessa liuotinkontrollia varten suositellaan kuutta rinnakkaisnäytettä, jotta kontrollien vaihtelua saadaan arvioitua paremmin. On joka tapauksessa suositeltavaa käyttää riittäviä testipitoisuuksia, jotta mallin estimointi onnistuu hyvin. Pitoisuuksien välinen kerroin ei saa olla yli kaksi (poikkeus voidaan tehdä, jos pitoisuusvastekäyrä on loiva). Käsittelyssä käytettävien rinnakkaisnäytteiden määrää voidaan vähentää, jos 5–95 prosentin vasteita aiheuttavien testipitoisuuksien määrää nostetaan. Jos toistojen määrää lisätään tai testipitoisuuden välejä pienennetään, testin luottamusväli yleensä kapenee.

37. LOEC-/NOEC-arvoja estimoidessa on käytettävä vähintään viittä testipitoisuutta ja vähintään neljää rinnakkaisnäytettä (kontrollia tai tarvittaessa liuotinkontrollia varten suositellaan kuutta rinnakkaisnäytettä, jotta kontrollien vaihtelua saadaan arvioitua paremmin), ja pitoisuuksien välinen kerroin saa olla enintään kaksi. Testimenetelmälle tehdyn yhteistutkimuksen hypoteesitestauksen yhteydessä havaitusta tilastollisesta voimasta on tietoa lisäyksessä 6.

38. Raja-arvotesti (yhdellä testipitoisuudella ja kontrolleilla) voidaan tehdä, jos vaikutuksia ei odoteta pitoisuudella, joka on enintään 1 000 mg sedimentin kuivapainokiloa kohti (esimerkiksi alustavan pitoisuusalueen määritystestin perusteella), tai jos yhdellä pitoisuudella testaaminen riittää mielenkiinnon kohteena olevan NOEC-arvon toteamiseen. Jälkimmäisessä tapauksessa yksityiskohtaiset perustelut raja-arvopitoisuuden valinnalle on kirjattava testiraporttiin. Rajatestin tarkoituksena on tehdä testi riittävän suurella pitoisuudella, jotta päättäjät voivat sulkea pois testikemikaalin mahdolliset toksiset vaikutukset, ja raja asetetaan pitoisuuteen, jota ei odoteta esiintyvän missään tilanteessa. Suositeltava arvo on 1 000 mg/kg (kuivapaino). Yleensä vähintään kuusi rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä on tarpeen. Testimenetelmälle tehdyn yhteistutkimuksen hypoteesitestauksen yhteydessä havaitusta tilastollisesta voimasta on tietoa lisäyksessä 6.

Altistumisolosuhteet

Testiorganismit

39. Testiä tehtäessä jokaisessa biologisten parametrien määrittämiseen käytettävässä rinnakkaisnäytteessä on oltava vähintään 10 matoa. Tämä määrä vastaa noin 50–100 mg:aa märkää biomassaa. Kun kuiva-ainepitoisuudeksi oletetaan 17,1 prosenttia (48), tulokseksi saadaan noin 9–17 mg kuivaa

▼M6

biomassaa astiaa kohti. U.S. EPA:n (2000 (7)) suosituksen mukaan täyttöasteessa kuivan biomassan ja orgaanisen hiilen kokonaispitoisuuden suhdeluku saa olla enintään 1:50. Kun käytetään 22 kohdassa kuvattua synteettistä sedimenttiä, tämä vastaa noin 43 g:aa sedimenttiä (kuivapaino) kymmentä matoa kohti, kun orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus on 2,0 prosenttia kuivasta sedimentistä. Jos matoja käytetään astiaa kohti yli 10 kappaletta, sedimentin ja yläpuolisen veden määrää mukautetaan vastaavasti.

40. Testissä käytettävien matojen on oltava peräisin samasta lähteestä, ja eläinten fysiologisen tilan on oltava samanlainen (ks. lisäys 5). Testiä varten valitaan samankokoisia matoja (ks. 39 kohta). Matoerästä tai -kannasta otettu osanäyte on suositeltavaa punnita ennen testiä keskipainon arvioimiseksi.

41. Testissä käytettävät madot poistetaan kasvatussäiliöstä (lisätietoa on lisäyksessä 5). Suurikokoiset (täysikasvuiset) eläimet, joissa ei ole merkkejä viimeaikaisesta jakaantumisesta, siirretään puhdasta vettä sisältäviin lasiastioihin (esimerkiksi petrimaljoihin). Tämän jälkeen ne synkronisoidaan lisäyksessä 5 kuvatulla tavalla. Kun madot ovat regeneroituneet 10–14 vuorokauden ajan, testiä varten valitaan vahingoittumattomia kokonaisia matoja, jotka ovat samankokoisia ja jotka uivat tai matelevat aktiivisesti kevyen mekaanisen ärsytyksen seurauksena. Jos testiolosuhteet poikkeavat viljelyolosuhteista esimerkiksi lämpötilan, valon ja pimeyden vaihtelun tai yläpuolisen veden osalta, matojen mukautumiseen testiolosuhteisiin riittää yleensä esimerkiksi 24 tunnin totutusjakso, jonka aikana lämpötila, valon ja pimeyden vaihtelu ja yläpuolinen vesi ovat samoja kuin testissä. Olosuhteisiin mukautuneet harvasukasmadot siirretään satunnaistetusti testiastioihin.

Ruokinta

42. Ruokaa lisätään sedimenttiin ennen testikemikaalin applikointia (tai sen aikana), minkä vuoksi madoille ei anneta muuta ruokaa testin aikana.

Valo ja lämpötila

43. Valoisa jakso kasvatuksessa ja testissä on tavallisesti 16 tuntia (3), (7). Valo pidetään suhteellisen heikkona (esimerkiksi 100–500 luksissa), millä jäljitellään luonnonolosuhteita sedimentin pinnalla. Valon voimakkuus mitataan vähintään kerran altistumisjakson aikana. Lämpötilan on oltava 20 ± 2 °C koko testin ajan. Kaikkina mittausajankohtina testiastioiden välinen lämpötilaero saa olla enintään ± 1 °C. Testiastiat sijoitetaan testi-inkubaattoriin tai testialueelle satunnaisessa järjestyksessä esimerkiksi siksi, että näin vältetään lisääntymisen vääristyminen astian sijainnin takia.

Ilmastus

44. Yläpuolista vettä testiastioissa on ilmastettava kevyesti (esimerkiksi 2–4 ilmakuplaa sekunnissa) Pasteur-pipetillä, joka sijaitsee noin kahden sentin päässä sedimentin pinnasta sedimentin sekoittumisen välttämiseksi. Samalla on varottava, että liuenneen hapen pitoisuus ei laske alle 30 prosenttiin ilman kyllästysarvosta (ASV). Tuloilman määrää on seurattava ja sitä on tarvittaessa säädettävä arkisin vähintään kerran päivässä.

Veden laadun mittaaminen

45. Yläpuolisesta vedestä mitataan seuraavat laatua kuvaavat parametrit:

Lämpötila:	mitataan vähintään yhdestä kutakin pitoisuustasoa edustavasta testiastiasta sekä yhdestä kontrolleihin kuuluvasta testiastiasta kerran viikossa sekä altistusjakson alussa ja lopussa; lisäksi ympäröivän väliaineen (huoneilman tai vesihauteen) lämpötila mitataan esimerkiksi tunnin välein

▼M6

Liuenneen hapen pitoisuus:	mitataan vähintään yhdestä kutakin pitoisuustasoa edustavasta testiastiasta sekä yhdestä kontrolleihin kuuluvasta testiastiasta kerran viikossa sekä altistusjakson alussa ja lopussa; ilmoitetaan yksikköinä mg/l ja prosenttiosuus ASV:stä (ilman kyllästysarvo)
Tuloilma:	seurataan vähintään kerran päivässä arkipäivisin ja säädetään tarvittaessa
pH:	mitataan vähintään yhdestä kutakin pitoisuustasoa edustavasta testiastiasta sekä yhdestä kontrolleihin kuuluvasta testiastiasta kerran viikossa sekä altistusjakson alussa ja lopussa
Veden kokonaiskovuus:	mitataan vähintään yhdestä kontrolleihin kuuluvasta rinnakkaisnäytteestä sekä yhdestä korkeinta pitoisuutta edustavasta testiastiasta altistusjakson alussa ja lopussa; ilmoitetaan yksikköinä mg/l $CaCO_3$
Ammoniakin kokonaispitoisuus:	mitataan vähintään yhdestä kontrolleihin kuuluvasta rinnakkaisnäytteestä sekä yhdestä kutakin pitoisuustasoa edustavasta testiastiasta altistusjakson alussa ja sen jälkeen kolmesti viikossa; ilmoitetaan yksikköinä mg/l NH_4^+ tai NH_3 tai kokonaisammoniakki-N

Jos veden laatua kuvaavien parametrien mittaaminen edellyttää merkittävien vesinäytteiden keräämistä astioista, voi olla suositeltavaa varata erilliset astiat veden laadun mittaamista varten, jotta veden ja sedimentin tilavuuksien välistä suhdetta ei muutettaisi.

Biologiset havainnot

46. Altistusaikana testiastioita on tarkkailtava, jotta voidaan arvioida silmämääräisesti mahdollisia eroja matojen käyttäytymisessä (esimerkiksi sedimentin välttely, sedimentin pinnalla näkyvät ulostepelletit) kontrolleihin verrattuna. Havainnot kirjataan muistiin.

47. Testin lopussa kaikki rinnakkaisnäytteet tutkitaan (kemiallisia analyysejä varten varatut ylimääräiset astiat voidaan jättää huomiotta). Kaikki madot kerätään testiastioista sopivaa menetelmää käyttäen. Madot on kerättävä niin varovasti, että ne saadaan talteen vahingoittumattomina. Eräs mahdollinen tapa on siivilöidä madot sedimentin joukosta. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää silmäkooltaan sopivaa ruostumattomasta teräksestä valmistettua siivilää. Suurin osa yläpuolisesta vedestä dekantoidaan varovasti ja jäljelle jäävää sedimenttiä ja vettä sekoitetaan, jotta muodostuu lietettä, joka voidaan kaataa siivilän läpi. Kun siivilän silmäkoko on 500 μm, suurin osa sedimenttihiukkasista menee nopeasti siivilän läpi. Siivilöinti on kuitenkin syytä tehdä ripeästi, jotta madot eivät pääse luikertelemaan siivilän reikiin tai niiden läpi. Kun siivilän silmäkoko on 250 μm, madot eivät pääse luikertelemaan siivilän rei'istä, mutta tällöin on huolehdittava, että sedimenttihiukkasia jää siivilään mahdollisimman vähän. Kustakin rinnakkaisnäyteastiasta peräisin oleva siivilöity liete voidaan siivilöidä vielä uudelleen, jotta kaikki madot saadaan varmasti talteen. Vaihtoehtoinen menetelmä on sedimentin lämmittäminen asettamalla testiastiat vesihauteeseen, jonka lämpötila on 50–60 °C. Madot poistuvat sedimentistä, jolloin ne voidaan kerätä sedimentin pinnalta leveäsuisella, liekkikiillotetulla pipetillä. Toisessa vaihtoehtoisessa menetelmässä sedimentistä tehdään lietettä, joka kaadetaan sopivankokoiseen matalaan astiaan. Matalasta lietekerroksesta madot voidaan poimia teräsneulalla tai teräväkärkisillä pinseteillä (joita käytetään haarukan tapaan, ei pihteinä, jotta madot eivät vahingoitu) ja siirtää puhtaaseen veteen. Kun madot on erotettu sedimenttilietteestä, ne huuhdellaan testiväliaineessa ja lasketaan.

48. Käytetystä menetelmästä riippumatta laboratorioiden on osoitettava, että niiden henkilökunta pystyy ottamaan talteen vähintään 90 prosenttia koko sedimentissä olevista organismeista. Tietty määrä testiorganismeja voidaan

▼M6

esimerkiksi lisätä kontrollisedimenttiin tai testisedimentteihin ja talteenoton onnistumista voidaan arvioida tunnin kuluttua (7).

49. Elävien ja kuolleiden yksilöiden kokonaismäärä rinnakkaisnäytettä kohti kirjataan muistiin ja analysoidaan. Madot katsotaan kuolleiksi, jos ne täyttävät jonkin seuraavista tunnusmerkeistä:

a) varovainen mekaaninen ärsyke ei aiheuta reaktiota

b) madossa näkyy merkkejä maatumisesta (yhdessä a-kohdan kanssa)

c) matoa ei löydy.

Lisäksi elävät madot voidaan jakaa kolmeen ryhmään:

a) suurikokoiset, vahingoittumat yksilöt (täysikasvuiset), joilla ei ole regeneroituneita vartalon osia

b) vahingoittumat yksilöt, joilla on väriltään vaaleampia, regeneroituneita vartalon osia (uusi takapää, uusi etupää tai molemmat)

c) vahingoittuneet yksilöt (äskettäin osia menettäneet yksilöt, joiden vartalon osat eivät ole regeneroituneet).

Nämä lisähuomiot eivät ole välttämättömiä, mutta niitä voidaan hyödyntää biologisten tulosten tarkemmassa tulkitsemisessa (esimerkiksi suuri määrä c-ryhmään kuuluvia matoja saattaa tarkoittaa, että tietyssä käsittelyssä lisääntyminen tai regeneroituminen on viivästynyt). Lisäksi on syytä todeta ja kirjata muistiin eroavaisuudet käsiteltyjen ja kontrollimatojen ulkonäössä (esimerkiksi integumentissa olevat leesiot tai pöhöttyneet vartalon osat).

50. Välittömästi laskennan ja analysoinnin jälkeen jokaisesta rinnakkaisnäytteestä talteen otetut elävät madot siirretään kuivattuihin, etukäteen punnittuihin ja merkittyihin vaakakuppeihin (yksi jokaiselle rinnakkaisnäytteelle) ja lopetetaan tiputtamalla pisara etanolia jokaiseen vaakakuppiin. Vaakakuppeja kuivataan yön yli kuivausuunissa, jonka lämpötila on 100 ± 5 °C, minkä jälkeen vaakakupit jäähdytetään eksikkaattorissa ja punnitaan, ja matojen kuivapaino kirjataan muistiin (mieluiten grammoina ja vähintään neljän desimaalin tarkkuudella).

51. Kokonaiskuivapainon lisäksi voidaan todeta tuhkaton kuivapaino kirjallisuusviitteessä (49) kuvatulla tavalla, jotta huomioon otetaan myös matojen ruoansulatuskanavassa olevasta sulamattomasta sedimentistä peräisin olevat epäorgaaniset yhdisteet.

52. Biomassa määritetään kokonaisbiomassana rinnakkaisnäytettä kohti sisältäen täysikasvuiset madot ja poikaset. Kuolleita matoja ei huomioida rinnakkaisnäytekohtaista biomassaa määritettäessä.

Testikemikaalin pitoisuuksien toteaminen

Näytteenotto

53. Testikemikaalin kemiallista analyysia varten tarvittavat näytteet otetaan ainakin kaikkein suurimmasta pitoisuudesta sekä yhdestä pienemmästä pitoisuudesta vähintään tasapainottumisvaiheen lopussa (ennen testiorganismien lisäämistä) sekä testin lopussa. Analyysia varten otetaan näytteet vähintään irtosedimentistä ja yläpuolisesta vedestä. Jokaista matriisia ja käsittelyä kohti otetaan kaikkina näytteenottopäivinä vähintään kaksi näytettä. Toinen kahdesta näytteestä voidaan säästää varalle (analysoitavaksi esimerkiksi siinä tapauksessa, että alkuperäinen analyysi ei ole nimellispitoisuuden ± 20 prosentin vaihteluvälin sisällä). Jos kemikaalilla on erityisominaisuuksia ja sen esimerkiksi odotetaan hajoavan nopeasti, analyysien aikataulua voidaan

▼M6

muuttaa (esimerkiksi näytteenottotiheyttä voidaan kasvattaa tai analysoitavien pitoisuustasojen määrää lisätä) asiantuntija-arvion perusteella. Näytteitä voidaan tällöin ottaa välinäytteenottopäivinä (esimerkiksi seitsemäntenä päivänä altistuksen alkamisesta lukien).

54. Yläpuolisesta vedestä otetaan näytteitä varovasti dekantoimalla tai lapolla, jotta sedimentti sekoittuu mahdollisimman vähän. Näytteiden tilavuus kirjataan muistiin.

55. Kun yläpuolinen vesi on poistettu, sedimentti homogenoidaan ja siirretään sopivaan säiliöön. Märän sedimentin paino kirjataan muistiin.

56. Jos lisäksi tarvitaan huokosvedessä olevan kemikaalin analysointia, homogenoidut ja punnitut sedimenttinäytteet sentrifugoidaan, jolloin saadaan huokosvettä. Noin 200 ml märkää sedimenttiä voidaan esimerkiksi laittaa 250 ml:n sentrifugointiastioihin. Tämän jälkeen näytteitä sentrifugoidaan ilman suodatusta huokosveden erottamiseksi esimerkiksi kierrosnopeudella 10 000 ± 600 × *g* 30–60 minuutin ajan enintään testilämpötilassa. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti dekantoidaan tai pipetoidaan varovasti, jotta sedimenttipartikkeleita ei tule mukaan, ja tilavuus kirjataan muistiin. Jäljelle jääneen sedimenttikakun paino kirjataan muistiin. Massataseen arviointi tai testikemikaalin talteenotto vesi-sedimenttijärjestelmästä on helpompaa, jos sedimentin kuivapaino määritetään jokaisena näytteenottopäivänä. Joskus pitoisuuksien analysointi huokosvedestä ei ole mahdollista, koska näyte on liian pieni.

57. Jos analyysia ei tehdä välittömästi, kaikki näytteet varastoidaan asianmukaisesti esimerkiksi olosuhteissa, joita suositellaan, jotta kyseinen testikemikaali hajoaisi mahdollisimman vähän (esimerkiksi ympäristöstä kerättyjä näytteitä säilytetään yleensä pimeässä ja – 18 °C:n lämpötilassa). Kerää tietoa kunkin testikemikaalin asianmukaisista säilytysolosuhteista – esimerkiksi säilytyslämpötilasta, säilytyksen kestosta ja talteenottomenetelmistä – ennen tutkimuksen aloittamista.

Analyysimenetelmä

58. Koko menetelmään vaikuttaa olennaisesti testikemikaalin määritykseen käytettävän menetelmän tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys, minkä vuoksi on todettava kokeellisesti, että kyseisessä menetelmässä kemiallisen määrityksen täsmällisyys ja toistettavuus samoin kuin testikemikaalin saanto vesi- ja sedimenttinäytteistä ovat kyseisen menetelmän kannalta hyväksyttäviä ainakin pienimmän ja suurimman testipitoisuuden osalta. Lisäksi on tarkistettava, ettei testikemikaalia havaita kontrolliastioissa määritysrajaa suurempia pitoisuuksia. Tarvittaessa laadunvalvonnan huippuarvojen saannon nimellispitoisuuksia voidaan korjata (esimerkiksi silloin, kun saanto on alle 80 tai yli 120 prosenttia lisätystä määrästä). Käsittele kaikkia näytteitä testin aikana siten, että kontaminaatio ja häviö ovat mahdollisimman pieniä (niitä voi aiheuttaa esimerkiksi testikemikaalin adsorptoituminen näytteenottovälineisiin).

59. Testikemikaalin saanto, määritysraja sekä havaitsemisraja sedimentissä ja vedessä kirjataan muistiin ja ilmoitetaan.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

60. Testin tärkeimmät pakolliset vastemuuttujat, joita arvioidaan tilastollisesti, ovat biomassa ja matojen kokonaismäärä rinnakkaisnäytettä kohti. Lisääntymistä (matojen määrän lisääntyminen) ja kasvua (kuivan biomassan määrän kasvu) voidaan niin haluttaessa myös arvioida. Tässä tapauksessa on tehtävä arvio matojen kuivapainosta altistumisen alussa esimerkiksi mittaamalla synkronoidusta, testiin käytettävästä matoerästä otetun edustavan osanäytteen kuivapaino.

▼M6

61. Kuolleisuus ei ole tutkittava ominaisuus tässä testissä, mutta kuolleisuutta olisi kuitenkin arvioitava mahdollisimman tarkasti. Kuolleisuutta arvioitaessa kuolleiksi katsotaan madot, joita ei löydy, jotka eivät reagoi varovaiseen mekaaniseen ärsykkeeseen tai joissa näkyy merkkejä maatumisesta. Kuolleiden matojen määrä on ainakin kirjattava muistiin ja otettava huomioon testituloksia tulkittaessa.

62. Vaikuttavat pitoisuudet ilmaistaan milligrammoina sedimentin kuivapainokiloa kohti. Jos sedimentissä tai sedimentissä ja yläpuolisessa vedessä altistuksen alussa mitatun testikemikaalin saanto on 80–120 prosenttia nimellispitoisuudesta, vaikuttavat pitoisuudet (EC_x-, NOEC- ja LOEC-arvo) voidaan ilmoittaa nimellispitoisuuksien perusteella. Jos saanto poikkeaa nimellispitoisuudesta yli ± 20 prosenttia, vaikuttavien pitoisuuksien (EC_x-, NOEC- ja LOEC-arvon) on perustuttava altistuksen alussa mitattuihin pitoisuuksiin ottaen samalla huomioon esimerkiksi testikemikaalin massataseen testijärjestelmässä (ks. 30 kohta). Näissä tapauksissa lisätietoa saadaan analysoimalla kanta- ja/tai applikointiliuoksia, millä voidaan todentaa, että testisedimentit oli valmistettu oikein.

EC_x

63. Tämän testiohjeen 60 kohdasssa kuvattujen parametrien EC_x-arvot lasketaan sopivien tilastollisten menetelmien avulla (esimerkiksi tilastollinen koestus, logistinen funktio tai Weibullin funktio, viritetty Spearmanin ja Kärberin menetelmä tai yksinkertainen interpolointi). Ohjeita tilastollisen arvioinnin tekemistä varten on kirjallisuusviitteissä (15) ja (50). EC_x saadaan lisäämällä yhtälöön kontrollin keskiarvon x prosenttia vastaava arvo. Jos halutaan laskea EC_{50} tai jokin muu EC_x-arvo, käsittelyä edeltävälle keskiarvolle ($\overline{X}$) olisi tehtävä regressioanalyysi.

NOEC/LOEC

64. Jos tilastollisella analyysilla on tarkoitus määrittää NOEC/LOEC-arvo, astiakohtaiset tilastot (yksittäisiä astioita pidetään rinnakkaisnäytteinä) ovat tarpeen. Laskennassa käytetään asianmukaisia tilastollisia menetelmiä. Yleensä testin kohteen haitallisia vaikutuksia verrattuna kontrolliin tutkitaan käyttämällä yksisuuntaista (pienempää) hypoteesitestausta, jossa $p \leq 0,05$. Esimerkkejä annetaan seuraavissa kappaleissa. Ohjeita sopivan tilastollisen menetelmän valintaa varten on kirjallisuusviitteissä (15) ja (50).

65. Datan normaalijakaumaa voidaan testata esimerkiksi Kolmogorov-Smirnovin sopivuustestillä, vaihteluvälin ja normaalijakauman suhdetta mittaavalla R/s-testillä tai Shapiro-Wilk-testillä (kaksisuuntainen, $p \leq 0,05$). Cochranin testiä, Levenen testiä tai Bartlettin testiä (kaksisuuntainen, $p \leq 0,05$) voidaan käyttää varianssin homogeenisuuden testaamiseen. Jos parametritestimenetelmien edellytykset (normaalius, varianssin homogeenisuus) täyttyvät, voidaan tehdä yksisuuntainen varianssianalyysi (ANOVA) sekä tämän jälkeen monivertailutestejä. Parivertailuja (esimerkiksi Dunnettin t-testiä) tai alaspäin askeltavia trenditestejä (esimerkiksi Williamsin testiä) voidaan käyttää sen laskemiseen, onko kontrollien ja eri testikohdepitoisuuksien välillä merkitseviä eroja ($p \leq 0,05$). Muutoin NOEC- ja LOEC-arvojen määrittämisessä käytetään parametrittomia menetelmiä (esimerkiksi Bonferroni-U-testiä Holmin mukaan tai Jonckheere-Terpstran trenditestiä).

Raja-annostesti

66. Jos raja-annostesti (kontrollin ja vain yhden käsittelyn vertailu) on tehty ja jos parametristen testimenetelmien vaatimukset (normaalius, homogeenisuus) täyttyvät, metrisiä vasteita (matojen kokonaismäärä sekä biomassa matojen kuivapainona) voidaan arvioida Studentin testillä (t-testillä). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia (Welchin t-testi) tai parametritonta testiä, kuten Mann-Whitney-U-testiä. Menetelmälle tehdyn yhteistutkimuksen hypoteesitestauksen yhteydessä havaitusta tilastollisesta voimasta on tietoa lisäyksessä 6.

▼M6

67. Kontrollien välisten (kontrolli ja liuotinkontrolli) merkitsevien erojen määrittämiseksi jokaisen kontrollin rinnakkaisnäytteet voidaan testata raja-annoksen yhteydessä kuvatulla tavalla. Jos näissä testeissä ei havaita merkitseviä eroja, kaikki kontrolli- ja liuotinkontrollirinnakkaisnäytteet voidaan yhdistää. Muussa tapauksessa kaikkia käsittelyjä tulee vertailla liuotinkontrolliin.

Tulosten tulkinta

68. Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos kuvatusta testimenetelmästä on poikettu ja jos testipitoisuuksista mitatut pitoisuudet ovat lähellä käytetyn analyysimenetelmän havaitsemisrajaa. Kaikki poikkeamat testimenetelmästä on kirjattava muistiin.

Testiraportti

69. Testiraportissa on annettava ainakin seuraavat tiedot:

— *Testikemikaali:*

— kemialliset tunnistetiedot (yleisnimi, kemiallinen nimi, rakennekaava, CAS-numero jne.) sekä puhtaus ja testiaineen kvantifioinnissa käytetty analyysimenetelmä; testikemikaalin lähde, liuottimen tunnistetiedot ja pitoisuus

— kaikki ennen testin alkua hankitut tiedot fysikaalisesta olomuodosta ja fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista (esimerkiksi vesiliukoisuus, höyrynpaine, jakaantumiskerroin maa-aineksessa (tai sedimentissä, jos saatavissa), log K_{ow} ja stabiilisuus vedessä)

— *Testilajit:*

— tieteellinen nimi, lähde, mahdollinen esikäsittely, totuttamistiedot, viljelyolosuhteet jne.

— *Testiolosuhteet:*

— testauksessa käytetty menetelmä (staattinen, semistaattinen tai läpivirtausmenetelmä)

— testijärjestely (testiastioiden lukumäärä, materiaali ja koko, veden tilavuus astiaa kohti, sedimentin massa ja tilavuus astiaa kohti, (läpivirtaus- tai semistaattisissa menetelmissä veden vaihtumisnopeus,) ennen testiä ja sen aikana käytetty ilmastus, rinnakkaisnäytteiden määrä, matojen lukumäärä rinnakkaisnäytettä kohti altistuksen alussa, testipitoisuuksien lukumäärä, vakioimis-, tasaantumis- ja altistusvaiheiden pituus, näytteenottotiheys)

— sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys

— testikemikaalin esikäsittelymenetelmä sekä lisäämis-/applikointimenetelmä

— nimelliset testipitoisuudet, tiedot kemiallista analyysia varten otetuista näytteistä sekä analyysimenetelmät, joilla testikemikaalin pitoisuudet saatiin;

— testimenetelmän 24–25 kohdassa kuvatut sedimentin ominaisuudet ja kaikki muut tehdyt mittaukset; synteettisen sedimentin valmistus

— testiveden valmistus (jos käytetään synteettistä vettä) ja ominaisuudet (happipitoisuus, pH, johtavuus, kovuus ja kaikki muut tehdyt mittaukset) ennen testin alkua

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta, kuten ravinnon tyyppi, valmistus, määrä ja ruokinta-aikataulu

▼M6

— valon voimakkuus ja valoisan ajan määrä

— kaikkien biologisten parametrien määrityksessä käytetyt menetelmät (esimerkiksi näytteenotto ja testiorganismien tutkiminen ja punnitseminen) sekä abioottisten parametrien määrityksessä käytetyt menetelmät (esimerkiksi veden ja sedimentin laatua kuvaavat parametrit)

— kaikkien kemiallista analyysia varten otettujen näytteiden tilavuudet ja/tai painot

— tarkat tiedot kaikkien kemiallisesti analysoitavien näytteiden käsittelystä, mukaan luettuina tiedot testikemikaalin valmistuksesta, säilytyksestä, lisäämistavasta, talteenotosta ja analyysimenetelmistä (ja tarkkuudesta) sekä testikemikaalin saannista.

— *Tulokset:*

— veden laatu testiastioissa (pH-arvo, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, kovuus, ammoniakkipitoisuudet ja kaikki muut tehdyt mittaukset)

— orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC), kuivapainon ja märkäpainon suhde, sedimentin pH-arvo ja kaikki muut tehdyt mittaukset

— matojen kokonaismäärä sekä täydellisten ja epätäydellisten matojen määrä jokaisessa testikammiossa testin lopussa, jos tämä on määritetty

— jokaisessa testikammiossa testin lopussa olleiden matojen kuivapaino sekä madoista otetun osanäytteen kuivapaino testin alussa, jos tämä on mitattu

— havaittu epätavallinen käyttäytyminen kontrolleihin verrattuna (esimerkiksi sedimentin välttäminen, ulostepellettien mahdollinen esiintyminen)

— todettu kuolleisuus

— myrkyllisten tutkittavien ominaisuuksien estimaatit (kuten EC_x-, NOEC- ja/tai LOEC-arvo) ja niiden määrittämiseen käytetyt tilastolliset menetelmät

— kaikki nimelliset testipitoisuudet, mitatut testipitoisuudet ja tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritettiin testikemikaalin pitoisuus testiastiassa

— poikkeamat hyväksyttävyyskriteereistä.

— *Tulosten arviointi*

— kohdassa 13 annettujen hyväksyttävyyskriteerien täyttyminen

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Euroopan komissio (2003). Tekninen ohjeasiakirja, jolla tuetaan uusien ilmoitettujen aineiden vaarojen arviointiperiaatteiden vahvistamisesta annettua komission direktiiviä 93/67/ETY, olemassa olevien aineiden vaarojen arviointiperiaatteiden vahvistamisesta annettua komission asetusta (EY) N:o 1488/94 sekä biosidituotteiden markkinoille saattamisesta annettua Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiiviä 98/8/EY, osa I–IV. Euroopan unionin julkaisutoimisto, Luxemburg.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. Teoksessa ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. Teoksessa ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269–279.

(6) Tämän liitteen luku C.27. Surviaissääskillä tehtävä myrkyllisyystesti, käyttäen vettä tai sedimenttiä, joihin on lisätty tutkittavaa ainetta.

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105–110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35–46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. s. 205–215. Teoksessa J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271–278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99–109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261–1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57–63.

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885–1894.

(23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196–2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183–194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292–302.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191–201.

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872–885.

(29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. Teoksessa: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271–280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, s. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503–1508.

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407–414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94–103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Tämän liitteen luku C.1 Akuutti myrkyllisyys kalalle.

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835–852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10–20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on ”Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163–1175.

(43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181–184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111–124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588–595.

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223–228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244–1249.

▼**M6**

(50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. s. 107–119.

Muuta kirjallisuutta tilastollisista menetelmistä:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096–1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19–76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714–719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65–70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591–611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103–117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519–531.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Kemikaali: aine tai seos.

Vakioimisvaihe: Käytetään sedimentin mikrobien vakauttamiseen ja esimerkiksi sedimentin ainesosissa olevan ammoniakin poistamiseen; sopeuttaminen tehdään ennen testikemikaalin lisäämistä sedimenttiin. Tavallisesti yläpuolinen vesi hävitetään vakioimisen jälkeen.

EC_x: testikemikaalin pitoisuus sedimentissä, jonka seurauksena johonkin biologiseen parametriin kohdistuu x prosentin (esimerkiksi 50 prosentin) suuruinen vaikutus mainitun altistusajan kuluessa.

Tasapainottumisaika: käytetään testikemikaalin jakaantumiseen kiinteään faasiin, huokosveteen ja yläpuoliseen veteen. Sitä sovelletaan ennen testikemikaalin lisäämistä sedimenttiin ja ennen testiorganismien lisäämistä.

Altistumisvaihe: aika, jona testiorganismit altistetaan testattavalle kemikaalille.

Synteettinen sedimentti: luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalin havaitaan aiheuttavan merkitsevän vaikutuksen ($p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä suuri vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkittävää vaikutusta (todennäköisyystasolla $p < 0,05$).

Oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin (K_{ow}, joskus myös P_{ow}): Kemikaalin prosentuaalinen liukoisuus n-oktanoliin ja veteen tasapainotilassa. Edustaa kemikaalin lipofiilisyyttä (tämän liitteen A.24 luku). K_{ow}-arvoa tai sen logaritmia (log K_{ow}) käytetään ilmaisemaan kemikaalin biokertyvyyspotentiaalia vesieliöissä.

Orgaaninen hiili-vesi-jakaantumiskerroin (K_{oc}): sedimentin orgaanisen hiilen fraktiossa tai sen pinnalla olevan kemikaalin pitoisuuden ja vedessä tasapainotilassa olevan pitoisuuden välinen suhde.

Yläpuolinen vesi: testiastiassa sedimentin peittävä vesi.

Huokosvesi: sedimentin tai maa-aineksen hiukkasten välissä olevaa vettä.

Käsitelty sedimentti: sedimenttiä, johon on lisätty testiaine.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼**M6**

Lisäys 2

Suositellun synteettisen veden koostumus

(muokattu tämän liitteen C.1 luvusta (1))

a) *Kalsiumkloridiliuos*

Liuota 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$:ta deionisoituun veteen ja lisää deionisoitua vettä yhteen litraan saakka.

b) *Magnesiumsulfaattiliuos*

Liuota 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$:ta deionisoituun veteen ja lisää deionisoitua vettä yhteen litraan saakka.

c) *Natriumbikarbonaattiliuos*

Liuota 2,59 g $NaHCO_3$:a deionisoituun veteen ja lisää deionisoitua vettä yhteen litraan saakka.

d) *Kaliumkloridiliuos*

Liuota 0,23 g KCl:a deionisoituun veteen ja lisää deionisoitua vettä yhteen litraan saakka.

Kaikkien kemikaalien on oltava analyyttistä laatua.

Tislatun tai deionisoidun veden johtavuus saa olla enintään 10 μScm^{-1}.

25 ml jokaisesta liuoksesta (a–d) sekoitetaan ja kokonaistilavuudeksi valmistetaan yksi litra deionisoidulla vedellä. Näiden liuosten kalsium- ja magnesiumionien summa on 2,5 mmol/l.

Ca:Mg-ionien suhde on 4:1 ja Na:K-ionien suhde on 10:1. Tämän liuoksen happokapasiteetti $K_{S4.3}$ on 0,8 mmol/l.

Ilmasta laimennusvettä, kunnes happikyllästys saavutetaan, ja säilytä sitä sen jälkeen noin kaksi päivää ilmastamatta ennen käyttöä.

VIITE

(1) Tämän liitteen luku C.1 Akuutti myrkyllisyys kalalle.

▼**M6**

Lisäys 3

Hyväksyttävän laimennusveden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

Komponentti	Pitoisuudet
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 µg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 ug/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l
mukautettu kirjallisuuslähteestä OECD (1992) (1))	

VIITE

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼M6

Lisäys 4

Suositeltu keinosedimentti – valmistus- ja varastointiohjeet

Sedimentin ainesosat

Ainesosa	Ominaisuudet	% sedimentin kuivapainosta
Turve	Rahkasammalturve, maatumisaste: ”medium”, ilmakuivattu, ei näkyviä kasvinjäänteitä, hienojakoinen (hiukkaskoko ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Kvartsihiekka	Raekoko: ≤ 2 mm, mutta > 50 prosenttia hiukkasista on oltava kokoa 50–200 μm	75–76
Kaoliniittisavi	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %	20 ± 1
Ravinto	esimerkiksi jauhettua Folia urticae -kasvia, nokkosen (Urtica dioica) lehtiä hienoksi jauhettuna (hiukkaskoko ≤ 0,5 mm), lääkestandardien ja elintarvikkeita koskevien vaatimusten mukaisesti; kuivan sedimentin lisäksi	0,4–0,5 %
Orgaaninen hiili	Säädetään lisäämällä turvetta ja hiekkaa	2 ± 0,5
Kalsiumkarbonaatti	$CaCO_3$, jauhemainen, kemiallisesti puhdas, kuivan sedimentin lisäksi	0,05–1
Deionisoitu vesi	Johtavuus ≤ 10 μS/cm, kuivan sedimentin lisäksi	30–50

Huomaa: Jos ammoniakkipitoisuuksien suurentuminen on odotettavissa (esimerkiksi jos testiaineen tiedetään estävän nitrifikaatiota), voi olla hyödyllistä korvata puolet typpipitoisesta nokkosjauheesta selluloosalla (esimerkiksi kemiallisesti puhdas α-selluloosajauhe, hiukkaskoko ≤ 0,5 mm) (1), (2).

Valmistaminen

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi. Tarvittava määrä turvejauhetta suspendoidaan deionisoituun veteen käyttämällä tehokasta homogenisointilaitetta. Tämän suspension pH säädetään välille 5,5 ± 0,5 $CaCO_3$:lla. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. pH-arvo mitataan uudelleen, ja sen täytyy olla 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen turvesuspensioon sekoitetaan muut ainesosat (hiekka ja kaoliniittisavi) ja deionisoitu vesi, jotta saadaan homogeenista sedimenttiä, jonka vesipitoisuus on 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta. Lopullisen seoksen pH mitataan vielä kerran, ja se säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla alueelle 6,5–7,5. Jos ammoniakin muodostumista on odotettavissa, sedimentin pH-arvo kannattaa pitää pienempänä kuin 7,0 (6,0–6,5). Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. Jos ammoniakin muodostumista on odotettavissa, synteettistä sedimenttiä voidaan vakioida seitsemän päivän ajan samoissa olosuhteissa, jotka vallitsevat varsinaisessa testissä (ts. sedimentin ja veden suhde 1:4, sedimenttikerroksen korkeus sama kuin testiastioissa), ennen kuin siihen lisätään testiainetta. Siihen on siis lisättävä ilmastettua vettä. Tämän vakiointivaiheen jälkeen yläpuolinen vesi on poistettava ja hävitettävä. Sen jälkeen sedimenttiin sekoitetaan kvartsihiekkaa, johon on lisätty testiainetta jokaisen käsittelytason

▼M6

mukaisesti. Sedimentti jaetaan rinnakkaisnäytetestiastioihin, joihin lisätään testivettä. Tämän jälkeen astioita inkuboidaan samoissa olosuhteissa, jotka vallitsevat varsinaisessa testissä. Tästä alkaa tasapainotusvaihe. Yläpuolinen vesi tulee ilmastaa.

Valittu ravinnonlähde on lisättävä astioihin ennen kuin sedimenttiin lisätään testikemikaali tai kemikaalin lisäämisen aikana. Se voidaan sekoittaa myös turvesuspensioon (ks. edellä). Ravinnon liiallinen hajoaminen ennen testiorganismien lisäämistä – esimerkiksi kun tasapainottumisaika on pitkä – voidaan välttää pitämällä ravinnon lisäämisen ja altistumisen aloittamisen välinen aika mahdollisimman lyhyenä. Ravinnon on oltava kosketuksissa testikemikaalin kanssa, minkä varmistamiseksi ravinto tulisi sekoittaa sedimenttiin viimeistään samana päivänä, kun testikemikaali lisätään sedimenttiin.

Säilytys

Keinosedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa tai huoneenlämmössä. Valmis sedimentti, johon testikemikaalia on lisätty, on käytettävä välittömästi testissä. Näytteitä sedimentistä, johon testikemikaalia on lisätty, voidaan säilyttää kyseiselle testikemikaalille suositelluissa säilytysolosuhteissa analyysiin saakka.

VIITTEET

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten – Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. s. 107–119.

▼M6

Lisäys 5

***Lumbriculus variegatus* -lajin kasvatusmenetelmät**

Lumbriculus variegatus (Müller) (Lumbriculidae, Oligochaeta) elää makean veden sedimenteissä kaikkialla maailmassa, ja sitä käytetään laajalti ympäristömyrkyllisyyden testauksessa. Sitä on helppo kasvattaa laboratorio-olosuhteissa. Seuraavassa kerrotaan yleisluonteisesti kasvatusmenetelmistä.

Kasvatusmenetelmät

Lumbriculus variegatuksen kasvatusolosuhteet on kuvattu yksityiskohtaisesti julkaisuissa Phipps ym. (1993) (1), Brunson ym. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Jäljempänä on lyhyt yhteenveto näistä olosuhteista. *L. variegatuksen* merkittävänä etuna on nopea lisääntyminen, jolloin laboratoriossa kasvatettujen populaatioiden biomassa kasvaa nopeasti (esimerkiksi (1), (3), (4), (5)).

Matoja voidaan kasvattaa suurissa akvaarioissa (57–80 l) 23 °C:ssa. Valojakson tulisi olla 16 h valoa ja 8 h pimeää (100–1 000 luksia), ja akvaarioissa tulisi käyttää päivittäin vaihtuvaa luonnollista vettä (45–50 l akvaariota kohti). Substraatti valmistetaan leikkaamalla valkaisemattomia ruskeita paperipyyhkeitä suikaleiksi, jotka laitetaan kasvatusveteen muutamaksi sekunniksi, jolloin muodostuu pieniä paloja paperisubstraattia. Sen jälkeen substraattia voi käyttää suoraan *Lumbriculus*-matojen kasvatusakvaariossa peittämällä niillä akvaarion pohja, tai niitä voidaan säilyttää jäädytettynä deionisoidussa vedessä myöhempää käyttöä varten. Uusi substraatti kestää säiliössä yleensä noin kaksi kuukautta.

Jokainen matoviljelmä aloitetaan 500–1 000 madolla, ja niitä ruokitaan kolmesti viikossa10 ml:n suspensiolla, joka sisältää 6 g lohien kasvatusravintoa, ajoittaisvaihtoisissa tai läpivirtausolosuhteissa. Staattisissa tai semistaattisissa viljelmissä eläimiä on ruokittava vähemmän bakteeri- ja sienikasvun estämiseksi.

Näissä olosuhteissa viljelmässä olevien yksilöiden määrä yleensä kaksinkertaistuu 10–14 vuorokaudessa.

Vaihtoehtoisesti *Lumbriculus variegatus* -lajia voidaan kasvattaa myös järjestelmässä, joka koostuu keinosedimentin sijasta 1–2 cm:n syvyisestä kerroksesta kvartsihiekkaa sekä synteettisestä vedestä. Kasvatusastioina voidaan käyttää lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja säiliöitä, joiden korkeus on 12–20 cm. Vesikerrosta ilmastetaan kevyesti (noin kaksi kuplaa sekunnissa) Pasteur-pipetillä, joka sijaitsee noin kahden senttimetrin päässä sedimentin pinnasta. Esimerkiksi ammoniakin kertymisen välttämiseksi yläpuolinen vesi on vaihdettava läpivirtausjärjestelmää käyttäen tai manuaalisesti vähintään kerran viikossa. Harvasukasmatoja voidaan pitää huoneenlämmössä. Valoisan ajan pituus on 16 tuntia (valon voimakkuus 100–1 000 luksia) ja pimeän 8 tuntia. Semistaattisessa viljelmässä, jossa vesi vaihdetaan kerran viikossa, madoille annetaan kahdesti viikossa TetraMin-kalanruokaa (esimerkiksi 0,6–0,8 mg sedimentin pinta-alan cm^2:ä kohti), joka voidaan applikoida suspensiona, jossa on 50 mg TetraMiniä yhdessä millilitrassa deionisoitua vettä.

Lumbriculus variegatus voidaan ottaa pois viljelmistä esimerkiksi siirtämällä substraatti tiheäsilmäisellä haavilla tai poimimalla yksilöt liekkikiillotetulla leveäsuisella (halkaisija noin 5 mm) lasipipetillä erilliseen laboratoriolasiin. Jos laboratoriolasiin siirretään myös substraattia, matoja ja substraattia sisältävää lasia pidetään yön yli läpivirtausolosuhteissa, jolloin substraatti poistuu lasista ja madot jäävät astian pohjalle. Ne voidaan siirtää sen jälkeen uusiin valmisteltuihin kasvatussäiliöihin tai käsitellä käytettäväksi testissä lähdeviitteissä (3) ja (4) tai seuraavassa esitetyn mukaisesti.

Seikka, johon on syytä suhtautua kriittisesti käytettäessä *L. variegatusta* sedimenttitesteissä, on sen lisääntymistapa eli jakaantuminen (esimerkiksi (6)). Tässä suvuttomassa lisääntymistavassa mato jakaantuu kahteen osaan, jotka eivät tarvitse ravintoa, ennen kuin pää- tai häntäosa on regeneroitunut (ks. (7), (8)). *L. variegatuksen* altistuminen kontaminoituja sedimenttihiukkasia nielemällä ei siis tapahdu jatkuvasti.

▼M6

Sen vuoksi on huolehdittava synkronoinnista, jotta kontrolloimaton lisääntyminen ja regeneroituminen sekä testitulosten suuri vaihtelu voidaan minimoida. Vaihtelua voi nimittäin esiintyä, kun jotkin yksilöt, jotka ovat jakaantuneet eivätkä siksi tarvitse ravintoa tiettynä ajanjaksona, altistuvat testikemikaalille vähemmän kuin muut yksilöt, jotka eivät jakaannu testin aikana (9), (10), (11). Madot tulisi jakaa keinotekoisesti (synkronisointi) 10–14 päivää ennen altistumisen aloittamista. Synkronointia varten valitaan suurikokoisia (täysikasvuisia) matoja, joissa ei saisi näkyä merkkejä äskettäisestä jakautumisesta. Nämä madot asetetaan lasilevylle pisaraan kasvatusvettä ja leikataan skalpellilla kahtia ruumiin keskiosasta. Huomiota on kiinnitettävä siihen, että takapäät ovat samankokoisia. Sen jälkeen takaosat jätetään regeneroitumaan (jolloin niihin kehittyy uudet päät) kasvatusastiaan, joka sisältää samaa substraattia kuin alkuperäisessä kasvatusastiassa ja synteettistä vettä, altistuksen aloittamiseen saakka. Merkki siitä, että uudet päät ovat kehittyneet, on se, kun synkronisoidut madot alkavat kaivautua substraattiin (regeneroitujen päiden muodostuminen voidaan vahvistaa tutkimalla edustava alanäyte binokulaarimikroskoopilla). Tämän jälkeen testiorganismien oletetaan olevan samanlaisessa fysiologisessa tilassa. Kun synkronisoidut madot lisääntyvät morfallaksin kautta testin aikana, käytännössä kaikkien eläinten odotetaan altistuvan yhtä paljon sedimentille, johon on lisätty testiainetta. Synkronisoitujen matojen ruokkiminen tulee aloittaa heti, kun madot alkavat kaivautua substraattiin tai seitsemän päivän kuluttua leikkauksesta. Ruokintaohjelma tulisi olla samankaltainen kuin tavallisissa viljelmissä, mutta synkronisoituja matoja voi olla hyvä ruokkia samalla ravinnolla, jota käytetään myös testissä. Matoja pidetään testilämpötilassa 20 ± 2 °C. Kun madot ovat regeneroituneet, testiä varten valitaan vahingoittumattomia kokonaisia matoja, jotka uivat tai matelevat aktiivisesti kevyen mekaanisen ärsytyksen seurauksena. Matojen vaurioituminen tai autotomia on estettävä esimerkiksi käyttämällä niiden käsittelyssä pipettejä, joiden reunat on liekkikiillotettu, tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja hammastikkuja.

Lumbriculus variegatus -lajin aloitusviljelmien lähteitä (yhdysvaltalaiset osoitteet mukautettu kirjallisuusviitteestä (4))

Eurooppa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Deutschland

Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Deutschland

Joensuun yliopisto
Vesistötoksikologian laboratorio
Biologian laitos
Yliopistokatu 7, PL 111
80101 Joensuu
Suomi

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresden
Deutschland

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

Yhdysvallat

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

VIITTEET

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269–279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191–201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. Teoksessa ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94–103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196–2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183–194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and Lumbriculus variegatus in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, s. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with Lumbriculus variegatus and Chironomus riparius and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503–1508.

▼M6

Lisäys 6

Yhteenveto yhteistutkimuksen tuloksista

Sedimentin myrkyllisyystesti *Lumbriculus variegatus* -lajilla

Taulukko 1

Yhteistutkimuksen yksittäisten testien tulokset: Matojen keskimäärä kontrolleissa ja liuotinkontrolleissa testin lopussa; SD = standard deviation = keskihajonta; CV = coefficient of variation = variaatiokerroin.

	matojen keskimäärä kontrolleissa	SD	CV (%)	n	matojen keskimäärä liuotinkontrolleissa	SD	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	**39,0**	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	**36,0**	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	**38,5**	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	**30,8**	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	**26,3**	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	**30,7**	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	**28,8**	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	**27,7**	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	**21,3**	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	**35,0**	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	**33,5**	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	**15,0**	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	**43,7**	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	**21,7**	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	**31,3**	4,79	15,32	4
laboratorioiden välinen keskiarvo	**29,59**		**20,10**		**30,61**		**13,26**	
SD	**8,32**		**10,03**		**7,57**		**10,48**	
N	**15**				**15**			
min-arvo	**16,3**				**15,0**			
max-arvo	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Taulukko 2

Yhteistutkimuksen yksittäisten testien tulokset: Matojen keskimääräinen yhteenlaskettu kuivapaino rinnakkaisnäytettä kohti kontrolleissa ja liuotinkontrolleissa testin lopussa; SD = standard deviation = keskihajonta; CV = coefficient of variation = variaatiokerroin.

	matojen yhteenlaskettu kuivapaino rinnakkais-näytettä kohti (kontrollit)	SD	CV (%)	n	matojen yhteenlaskettu kuivapaino rinnakkais-näytettä kohti (liuotinkontrollit)	SD	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
laboratorioiden välinen keskiarvo	**25,15**		**20,36**		**27,68**		**17,53**	
SD	**7,87**		**12,56**		**7,41**		**9,10**	
N	**15**				**15**			
min-arvo	**12,9**				**10,5**			
max-arvo	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Taulukko 3

NOEC- ja LOEC-arvoille; SD = standard deviation = keskihajonta; CV = coefficient of variation = variaatiokerroin.

biologinen parametri		laboratorioiden välinen keskiarvo (mg/kg)	min-arvo	max-arvo	laboratorioiden välinen kerroin	SD	CV (%)	geometrinen ka. (mg/kg)
matojen kokonaismäärä	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	**22,5**	7,1	39,1				
matojen kuivapaino yhteensä	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	**24,8**	10,9	44,7				
kuolleisuus/ eloonjääminen	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
lisääntyminen (matojen määrän kasvu rinnakkaisnäytettä kohti)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	**29,7**	13,9	47,9				
kasvu (biomassan kasvu rinnakkaisnäytettä kohti)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	**32,2**	13,6	65,2				

MDD: pienin havaittava ero kontrolliarvoista hypoteesitestauksen aikana; käytetään tilastollisen voiman mittaamiseen

VIITE

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

▼M6

C.36. MAA-AINEKSESSA TEHTÄVÄ HARSOSÄÄSKENPETOPUNKIN *(HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER)* LISÄÄNTYMISTESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 226 (2008). Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi arvioitaessa maaperässä olevien kemikaalien vaikutuksia maaperässä elävien punkkilajien *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) lisääntymiskyvylle, jolloin voidaan arvioida populaation ominaiskasvunopeudelle koituvaa inhibitiovaikutusta (1), (2). Lisääntymiskyky tarkoittaa tässä testijakson lopussa havaittuja poikasia. *H. aculeifer* edustaa uutta ravintotasoa lajilla, jolle testimenetelmiä on jo olemassa. Tämän testimenetelmän tarkoitusta varten katsotaan riittäväksi lisääntymistesti, jossa lisääntymiskierron eri vaiheita ei eroteta toisistaan tai kvantifioida. Kemikaaleille, joiden altistusskenaario on jokin muu kuin maaperän kautta tapahtuva, jokin muu lähestymistapa voi sopia paremmin (3).

2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* -lajin katsotaan olevan maaperän eläimistön ja etenkin petopunkkien merkityksellinen edustaja. Sitä tavataan kaikkialla maailmassa (5), ja sitä on helppo kerätä ja kasvattaa laboratoriossa. Yhteenveto *H. aculeifer* -lajin biologiasta on lisäyksessä 7. Punkkilajin ekologiasta ja sen käytöstä ympäristömyrkyllisyyden tutkimuksessa on saatavilla taustatietoa (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

TESTIN PERIAATE

3. Täysikasvuiset naaraat altistetaan maa-ainekseen sekoitetun testikemikaalin eri pitoisuuksille. Testin alussa jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa on 10 täysikasvuista naarasta. Koiraita ei oteta testiin, sillä kokemus on osoittanut, että jos koiraita on läsnä, naaraat pariutuvat välittömästi tai lähes välittömästi sen jälkeen, kun ne ovat kuoriutuneet deutonymfivaiheesta. Lisäksi koiraiden ottaminen testiin pidentäisi testiä niin, että eri ikävaiheita jouduttaisiin erottamaan toisistaan, mikä on varsin suuritöistä. Varsinainen pariutuminen ei siis kuulu tähän testiin. Naaraat otetaan testattaviksi 28–35 vuorokautta sen jälkeen, kun munintavaihe on alkanut synkronoinnissa (ks. lisäys 4), sillä naaraiden voidaan tällöin katsoa jo pariutuneen ja ohittaneen munintaa edeltävään vaiheen. Jos lämpötila on 20 °C, testi päättyy päivänä 14 sen jälkeen, kun naaraat on otettu testattaviksi (päivä 0), jolloin ensimmäiset kontrollijälkeläiset ehtivät jo siirtyä deutonymfivaiheeseen (ks. lisäys 4). Tärkeintä mittaussuuretta varten todetaan poikasten lukumäärä testiastiaa kohti sekä lisäksi elossa olevien naaraiden lukumäärä. Testikemikaalille altistettujen punkkien lisääntymiskykyä verrataan kontrolleihin, jolloin voidaan määrittää EC_x-arvo (esimerkiksi EC_{10} ja EC_{50}) tai NOEC-arvo (No Observed Effect Concentration eli pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia) testijärjestelyn mukaan (ks. 29 kohta). Yhteenveto testin aikataulusta on lisäyksessä 8.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

4. Testikemikaalista pitäisi olla käytettävissä seuraavat tiedot: vesiliukoisuus, log K_{ow}, maa-vesi-jakaantumiskerroin sekä höyrynpaine. Lisätiedot testikemikaalin kulkeutumisesta maaperässä, kuten bioottinen ja abioottinen hajoamisnopeus, ovat myös suotavia.

5. Tätä testimenetelmää voidaan käyttää vesiliukoisten tai veteen liukenemattomien kemikaalien yhteydessä. Testikemikaalia käytetään kummassakin tapauksessa kuitenkin eri tavalla. Testimenetelmää ei voida soveltaa haihtuviin kemikaaleihin, eli sellaisiin, joiden osalta Henryn vakio tai ilma-vesi-jakaantumiskerroin on suurempi kuin yksi, tai sellaisiin kemikaaleihin, joiden höyrynpaine on suurempi kuin 0,0133 Pa 25 °C:ssa.

▼M6

TESTIN VALIDITEETTI

6. Jotta testitulosta voidaan pitää luotettavana, seuraavien kriteerien on täytyttävä käsittelemättömissä kontrolleissa:

— Aikuisten naaraiden keskimääräinen kuolleisuus testin lopussa saa olla enintään 20 prosenttia

— Nuorten eläinten keskimäärän rinnakkaisnäytettä (johon siirrettiin 10 aikuista naarasta) kohti testin lopussa on oltava vähintään 50

— Punkinpoikasten määrälle rinnakkaisnäytettä kohti lasketun variaatiokertoimen on oltava alle 30 prosenttia varsinaisen testin lopussa.

VERTAILUKEMIKAALI

7. Vertailukemikaalin NOEC-arvo ja/tai EC_x-arvo on määritettävä, jotta voidaan osoittaa, että laboratorion testiolosuhteet ovat asianmukaiset, sekä todeta, että testiorganismien vasteessa ei tapahdu ajan kuluessa muutosta. Sopiva vertailukemikaali, jonka on osoitettu vaikuttavan populaation kokoon, on dimetoaatti (CAS 60-51-5) (4). Vaihtoehtoisesti vertailukemikaalina voidaan käyttää boorihappoa (CAS 10043-35-3). Tästä kemikaalista on saatu vähemmän kokemusta. Testi voidaan järjestää kahdella tavalla:

— Vertailukemikaalia voidaan testata samanaikaisesti kun jokaisen testikemikaalin myrkyllisyys todetaan yhdestä pitoisuudesta, jonka on osoitettava etukäteen annosvastetutkimuksessa vähentävän jälkeläisten määrää > 50 prosenttia. Tässä tapauksessa rinnakkaisnäytteitä on oltava sama määrä kuin kontrolleissa (ks. 29 kohta).

— Vaihtoehtoisesti vertailukemikaali voidaan testata 1–2 kertaa vuodessa annosvastetestillä. Pitoisuuksien ja rinnakkaisnäytteiden määrä sekä porrastuskerroin ovat erilaiset eri järjestämistavoissa (ks. 29 kohta), mutta molemmissa vasteen olisi oltava 10–90 prosenttia (porrastuskerroin 1,8). Dimetoaatin jälkeläisten määrään perustuvan EC_{50}:n on oltava välillä 3,0–7,0 mg tehoainetta maa-aineskiloa kohti (kuivapaino). Tähän mennessä boorihapolla saatujen tulosten perusteella jälkeläisten määrään perustuvan EC_{50}:n on oltava välillä 100–500 mg maa-aineskiloa kohti (kuivapaino).

TESTIN KUVAUS

Testiastiat ja -laitteet

8. Käytettävät testiastiat on valmistettu lasista tai muusta kemiallisesti inertistä materiaalista, niiden halkaisija on 3–5 cm (maa-aineksen korkeus ≥1,5 cm) ja niissä on tiiviisti sulkeutuva kansi. Suositeltavimpia ovat kierrekannet, jolloin astioita voi tuulettaa kahdesti viikossa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kantta, joiden läpi kaasut voivat vaihtua suoraan substraatin ja ilmakehän välillä, esimerkiksi harsoa. Kosteuspitoisuus on pidettävä korkeana koko testin ajan, minkä vuoksi on erittäin tärkeää valvoa jokaisen koeastian painoa koko testin ajan ja lisätä vettä tarvittaessa. Tämä on erityisen tärkeää silloin, jos käytössä ei ole kierrekansia. Jos käytetään läpinäkymätöntä testiastiaa, kannen on oltava materiaalia, josta valo pääsee läpi (esimerkiksi läpinäkyvä, rei'itetty kansi) mutta joka estää punkkeja poistumasta. Testiastian koko ja tyyppi määräytyvät talteenottomenetelmän mukaan (aiheesta tarkemmin lisäyksessä 5). Jos lämpöerottamista käytetään suoraan testiastiaan, pohjaan voidaan lisätä silmäkooltaan sopiva pohjaverkko (joka suljetaan erottamiseen saakka), ja maa-aineksen syvyys on oltava riittävä lämpötila- ja kosteusgradientin muodostumiseen.

▼M6

9. Testissä tarvitaan myös vakiolaboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

— astioita, mieluiten lasisia, joissa on kierrekannet

— kuivauskaappi

— stereomikroskooppi

— harjoja punkkien siirtämistä varten

— pH-mittari ja luksimittari

— sopivia tarkkoja vaakoja

— asianmukaiset lämpötilan valvontalaitteet

— asianmukaiset ilmankosteuden valvontalaitteet (ei oleellinen, jos altistusastiat on peitetty kansilla)

— lämpökaappi, jonka lämpötilaa voi säätää, tai muu pieni tila

— talteenottovälineet (ks. lisäys 5) (13)

— katkaisijalla varustettu ripustettava paneelivalaisin

— keräilypurkkeja talteenotettuja punkkeja varten.

Keinomaan valmistus

10. Tässä kokeessa käytetään keinomaata. Keinomaan ainesosat ovat seuraavat (kaikki arvot perustuvat kuivamassaan):

— 5 prosenttia rahkaturvetta, joka on ilmakuivattu ja jauhettu hienoksi (sopiva hiukkaskoko 2 ± 1 mm)

— 20 prosenttia kaoliinisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 prosenttia)

— noin 70 prosenttia ilmakuivattua teollisuushiekkaa (tarvittavan $CaCO_3$-määrän mukaan), ensisijaisesti hienoa hiekkaa, jonka hiukkasista yli puolet on kooltaan 50–200 mikronia. Hiekan tarkkaan määrään vaikuttaa $CaCO_3$-määrä (ks. jäljempänä); niiden yhteismäärän tulisi olla 75 prosenttia.

— 1,0 prosenttia kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$, jauhemainen, analyyttinen laatu), jotta maan pH-arvoksi saadaan 6,0 ±0,5; lisättävän kalsiumkarbonaatin määrään saattaa vaikuttaa etenkin turpeen laatu/tyyppi (ks. huomautus 1).

Huomautus 1: $CaCO_3$:n tarvittavaan määrään vaikuttavat maa-ainesalustan ainekset, ja se on määritettävä mittaamalla maa-aineksen osanäytteiden pH-arvo juuri ennen testiä (14).

Huomautus 2: Keinomaan turvepitoisuus poikkeaa muissa maaperän organismeja käyttävissä testimenetelmissä käytetystä pitoisuudesta, joka on useimmiten 10 prosenttia turvetta (esimerkiksi (15)). EPPOn mukaan tyypillisessä maatalousmaassa on orgaanista ainetta kuitenkin enintään 5 prosenttia, ja turvepitoisuuden vähentäminen kuvastaa siis luonnonmaan heikentynyttä kykyä sitouttaa testikemikaalia orgaaniseen hiileen.

Huomautus 3: Tarvittaessa (esimerkiksi tiettyihin testaustarkoituksiin) testija/tai kasvatusalustana voidaan käyttää myös luonnonmaata, joka on peräisin saastumattomilta alueilta. Luonnonmaata käytettäessä siitä on kuitenkin mainittava vähintään seuraavat tiedot: alkuperä (keräyspaikka), pH, rakenne (hiukkaskokojakauma) ja orgaanisen aineksen pitoisuus. Maannoksen maaperäluokituksen mukainen tyyppi ja nimi mainitaan myös, jos nämä ovat tiedossa, eikä maa-aineksessa saa olla minkäänlaisia epäpuhtauksia. Jos testikemikaali on metalli tai organometalli, on luonnonmaalle

▼M6

määritettävä myös kationinvaihtokyky (CEC). Erityistä huomiota on kiinnitettävä hyväksyttävyyskriteerien täyttymiseen, sillä luonnonmaasta on tyypillisesti saatavan vähän taustatietoa.

11. Maan kuivat ainesosat sekoitetaan perusteellisesti (esimerkiksi suurella laboratoriosekoittimella). pH-arvon määrittämisessä käytetään seosta, jossa on yksi osa maa-ainesta ja viisi osaa 1 M:n kaliumkloridiliuosta (KCl) tai 0,01 M:n kalsiumkloridiliuosta ($CaCl_2$) (ks. (14) ja lisäys 3). Jos maa-aines on vaadittua vaihteluväliä happamampaa (ks. 10 kohta), happamuutta voidaan säätää lisäämällä tarvittava määrä $CaCO_3$:a. Jos maa-aines on liian emäksistä, happamuutta voidaan säätää lisäämällä ensimmäistä kolmea ainesosaa sisältävää, 10 kohdassa mainittua seosta, mutta jättämällä pois $CaCO_3$.

12. Keinomaan enimmäisvedenpidätyskyky (WHC) määritetään lisäyksessä 2 kuvattujen menetelmien mukaisesti. Kahdesta seitsemään vuorokautta ennen testin aloittamista kuiva keinomaa esikostutetaan lisäämällä tislattua tai deionisoitua vettä noin puoleen lopullisesta vesipitoisuudesta eli 40–60 prosenttiin enimmäisvedenpidätyskyvystä. Kosteuspitoisuus säädetään 40–60 prosenttiin enimmäisvedenpidätyskyvystä lisäämällä testikemikaalia liuoksena ja/tai lisäämällä tislattua tai deionisoitua vettä (ks. 16-18 kohdat). Maa-aineksen kosteuspitoisuus on vielä tarkistettava likimääräisesti puristamalla maa-ainesta varovasti kädessä. Sormien välistä pitäisi tihkua pieniä vesipisaroita, jos kosteuspitoisuus on oikea.

13. Maaperän kosteuspitoisuus määritetään testin alussa ja lopussa kuivaamalla maa-aines vakiopainoon 105 °C:ssa standardin ISO 11465 (17) ja määrittämällä maa-aineksen pH-arvo lisäyksen 3 tai standardin ISO 10390 (14) mukaisesti. Nämä mittaukset tehdään myös ylimääräisissä näytteissä, joissa ei ole punkkeja ja jotka on otettu kontrollimaa-aineksesta sekä jokaisesta maaperän testipitoisuudesta. Maa-aineksen pH-arvoa ei saa säätää happamia tai emäksisiä kemikaaleja testattaessa. Kosteuspitoisuutta on seurattava koko testin ajan punnitsemalla astiat säännöllisesti (ks. 20 ja 24 kohta).

Koe-eläinten valinta ja valmistelu

14. Testissä käytettävä laji on *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Testin aloittamiseen tarvitaan synkronisoidusta kohortista peräisin olevia täysikasvuisia naaraspunkkeja. Punkit otetaan testiin noin 7–14 vuorokautta sen jälkeen, kun niistä on tullut täysikasvuisia ja 28–35 vuorokautta sen jälkeen, kun muninta on alkanut synkronoinnissa (ks. 3 kohta ja lisäys 4). Tiedot punkkien alkuperästä tai toimittajasta sekä laboratorioviljelmän ylläpidosta kirjataan muistiin. Jos punkkeja pidetään laboratorioviljelmässä, punkkien laji olisi syytä varmistaa vähintään kerran vuodessa. Tunnistuslomake on lisäyksessä 6.

Testipitoisuuksien valmistelu

15. Testikemikaali lisätään maa-ainekseen. Orgaanisten liuottimien, joilla helpotetaan maa-aineksen käsittelyä testikemikaalilla, valintaperusteena on vähäinen myrkyllisyys punkeille. Testijärjestelyyn sisällytetään sopiva liuotinkontrolli (ks. 29 kohta).

Vesiliukoinen testikemikaali

16. Testikemikaalista ja deionisoidusta vedestä valmistetaan sellainen määrä liuosta, joka riittää yhden testipitoisuuden kaikkiin neljään rinnakkaisnäytteeseen. Suositeltavaa on käyttää vettä riittävästi, jotta saavutetaan tarvittava kosteuspitoisuus, eli 40–60 prosenttia enimmäisvedenpidätyskyvystä (ks. 12 kohta). Kukin testikemikaaliliuos sekoitetaan perinpohjaisesti yhteen erään esikostutettua maata, ennen kuin se laitetaan testiastiaan.

▼M6

Veteen liukenematon testikemikaali

17. Jos käytettävä kemikaali ei ole vesiliukoista, mutta liukenee orgaaniseen liuottimeen, se voidaan liuottaa pienimpään mahdolliseen määrään sopivaa kantoainetta (esimerkiksi asetonia). Ainoastaan haihtuvia liuottimia saa käyttää. Tällaista kantoainetta käytettäessä kaikissa testipitoisuuksissa ja kontrollissa on oltava sama vähimmäismäärä kantoainetta. Kantoaine sekoitetaan pieneen määrään (esimerkiksi 10 g) hienoa kvartsihiekkaa tai ruiskutetaan sen päälle. Substraatin kokonaishiekkapitoisuutta säädetään tämän määrän mukaan. Kantoaine poistetaan haihduttamalla hiekkaa vetokaapissa vähintään tunnin ajan. Kvartsihiekan ja testikemikaalin seos lisätään esikostutettuun maahan ja sekoitetaan huolellisesti sopivaan määrään deionisoitua vettä, jotta saadaan tarvittava kosteuspitoisuus. Lopullinen seos siirretään testiastioihin. Huomaa, että jotkin liuottimet voivat olla myrkyllisiä punkeille. Tämän vuoksi on suositeltavaa käyttää ylimääräistä vesikontrollia, jossa ei käytetä kantoainetta, jos liuottimen myrkyllisyyttä punkeille ei tunneta. Vesikontrolli voidaan jättää pois, jos on riittävällä tavalla osoitettu, että liuottimella ei (testissä käytettyinä pitoisuuksina) ole vaikutuksia punkeille.

Huonosti veteen ja orgaanisiin liuottimiin liukeneva testikemikaali

18. Jos kemikaali liukenee heikosti veteen ja orgaanisiin liuottimiin, haluttu testipitoisuus saadaan sekoittamalla testikemikaaliin 2,5 grammaa vastaava määrä hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa testiastiaa kohden (esimerkiksi 10 grammaa hienoa kvartsihiekkaa neljää rinnakkaisnäytettä kohti). Substraatin kokonaishiekkapitoisuutta säädetään tämän määrän mukaan. Tämä kvartsihiekan ja testikemikaalin seos lisätään esikostutettuun maahan ja sekoitetaan hyvin sopivaan määrään deionisoitua vettä, jotta saadaan tarvittava kosteuspitoisuus. Lopullinen seos jaetaan testiastioihin. Menettely toistetaan jokaisen testipitoisuuden yhteydessä, ja myös asianmukainen kontrolli valmistellaan.

MENETTELY

Testi- ja kontrolliryhmät

19. Suositeltavaa on sijoittaa jokaiseen kontrolli- ja käsittelyastiaan kymmenen täysikasvuista naarasta ja 20 grammaa keinomaata (kuivapaino). Testiorganismit on lisättävä kahden tunnin kuluttua lopullisen testisubstraatin valmistamisesta (eli testin kohteen lisäämisestä). Erityistapauksissa, esimerkiksi silloin, kun ikääntyminen katsotaan ratkaisevaksi tekijäksi, lopullisen testisubstraatin valmistamisen ja punkkien lisäämisen välistä aikaa voidaan pidentää (ikääntymisestä tarkemmin ks. (18)). Näissä tapauksissa on kuitenkin esitettävä tieteelliset perustelut sille, miksi näin toimittiin.

20. Kun punkit on lisätty maa-ainekseen, niille annetaan ruokaa, ja jokaisen testiastian alkupaino mitataan, jotta sitä voidaan käyttää vertailuarvona maa-aineksen kosteuspitoisuuden seurannassa koko testin ajan 24 kohdassa kuvatulla tavalla. Tämän jälkeen testiastiat peitetään, kuten 8 kohdassa on kuvattu, ja sijoitetaan testikammioon.

21. Jokaista testikemikaalin 15–18 kohdassa kuvattua applikointimenetelmää varten valmistetaan sopiva kontrollinäyte. Kontrollien valmistuksessa noudatetaan sopivia kuvattuja menetelmiä, mutta testikemikaalia ei lisätä. Kontrolleihin lisätään siis tarvittaessa orgaanisia liuottimia, kvartsihiekkaa tai muuta kantoainetta samana pitoisuutena tai saman verran kuin käsittelyihin. Jos testikemikaalin lisäämisessä käytetään liuotinta tai muuta kantoainetta ja liuottimen myrkyllisyyttä ei tunneta, on lisäksi valmistettava kontrolli, jossa ei käytetä kantoainetta tai testikemikaalia (ks. 17 kohta).

▼M6

Testiolosuhteet

22. Testauslämpötilan on oltava 20 °C ± 2 °C. Lämpötila kirjataan vähintään kerran päivässä ja sitä säädetään tarvittaessa. Testi toteutetaan valoisaa ja pimeää aikaa säätelemällä (mieluiten 16 tuntia valoisaa ja 8 tuntia pimeää). Testiastioiden lähellä on oltava 400–800 luksin valaistus. Testien vertailukelpoisuuden vuoksi olosuhteet ovat samanlaiset kuin muissa maaperän ympäristömyrkyllisyyttä koskevissa testeissä (esim. (15)).

23. Kaasujen vaihtumisesta huolehditaan tuulettamalla testiastiat vähintään kahdesti viikossa, jos käytössä on kierrekannet. Harsokansia käytettäessä on kiinnitettävä erityistä huomiota maa-aineksen kosteuspitoisuuden ylläpitämiseen (ks. 8 ja 24 kohta).

24. Testiastioissa olevan maa-ainessubstraatin vesipitoisuutta pidetään yllä koko testin ajan punnitsemalla testisäiliöt säännöllisesti (esimerkiksi kerran viikossa) ja lisäämällä vettä tarvittaessa. Hävikki korvataan tarpeen mukaan deionisoidulla vedellä. Kosteuspitoisuus testin aikana saa poiketa aloitusarvosta enintään 10 prosenttia.

Ruokinta

25. Sopivaksi ravinnonlähteeksi on todettu *Tyrophagus putrescentiae* -laji (Schrank, 1781). Muita sopivia ravinnonlähteitä ovat esimerkiksi pienet hyppyhäntäiset (esimerkiksi *Folsomia candida* -lajin (Willem, 1902) tai *Onychiurus fimatus* -lajin poikaset (19), (20)), änkyrimadot (esimerkiksi *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992)) tai sukkulamadot (esimerkiksi *Turbatrix silusiae* (de Man, 1913)). On suositeltavaa tarkistaa ravinto ennen kuin sitä käytetään testissä. Ravinnon tyyppi ja määrä olisi oltava sellainen, jota käyttämällä tuotetaan riittävästi poikasia, jotta testin hyväksyttävyyskriteerit täyttyvät (6 kohta). Saaliseläimiä valitessa on otettava huomioon myös testin kohteen vaikutustapa (esimerkiksi punkkimyrkky saattaa olla myrkyllistä myös ruokana käytettäville punkeille; ks. 26 kohta).

26. Ruokaa annetaan *ad libitum* (eli lastan kärjellä pieni määrä kerrallaan). Tässä voidaan käyttää myös hyppyhäntäisillä tehtävässä testissä esitettyä pienitehoista imuria tai hienoa sivellintä. Yleensä riittää, kun ruokaa annetaan testin alussa ja sen jälkeen 2–3 kertaa viikossa. Jos on syytä epäillä, että testin kohde on myrkyllinen saaliseläimille, on harkittava, pitääkö ruokaa antaa useammin tai ravinnonlähdettä vaihtaa.

Testipitoisuuksien valinta

27. Sopivien testipitoisuuksien valinnassa auttaa testikemikaalin myrkyllisyydestä saatu aiempi tieto, joka on peräisin esimerkiksi pitoisuusalueen määritystutkimuksista. Tarvittaessa voidaan tehdä pitoisuusalueen määritystesti, jossa käytetään viittä testikemikaalin pitoisuutta vaihteluvälillä 0,1–1 000 mg yhdessä kilogrammassa kuivaa maa-ainesta, ja käsittelyille ja kontrollille käytetään ainakin yhtä rinnakkaisnäytettä. Pitoisuusalueen määritystesti kestää 14 vuorokautta, minkä jälkeen todetaan täysikasvuisten punkkien kuolleisuus ja poikasten määrä. Varsinaisessa testissä käytettävä pitoisuusalue valitaan mieluiten siten, että siihen sisältyvät myös pitoisuudet, joissa poikasiin kohdistuu jo vaikutuksia, mutta emosukupolveen ei. Tämä ei kuitenkaan ole välttämättä mahdollista kemikaaleille, joilla on tappavia ja subletaaleja vaikutuksia lähes samoina pitoisuuksina. Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. EC_{50}, EC_{25} tai EC_{10}) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testikemikaalin kannalta. Ekstrapolointia huomattavasti alle pienimmän testiorganismeihin vaikuttavan pitoisuuden tai yli suurimman testattavan pitoisuuden kannattaa käyttää vain poikkeustapauksissa, ja näin toimiminen on perusteltava testiraportissa.

Testijärjestely

Annosvastetestit

28. Änkyrimatojen lisääntymistestiä koskevan toisen yhteistutkimuksen johdosta tehtyjen suositusten perusteella esitetään kolmea mahdollista testijärjestelyä

▼M6

(22). Kaikkien järjestelyjen yleinen soveltuvuus on todettu *H. aculeifer* -lajilla tehdyn validoinnin tuloksista.

29. Pitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Jotta EC_x-arvo voidaan määrittää (esimerkiksi EC_{10}, EC_{50}), tulee testata 12 pitoisuutta. Jokaista testipitoisuutta kohti suositellaan vähintään kahta rinnakkaisnäytettä ja kuutta kontrollirinnakkaisnäytettä. Porrastuskerroin voi vaihdella ja olla enintään 1,8 odotetulla vaikutusalueella sekä yli 1,8 tätä suuremmilla ja pienemmillä pitoisuuksilla.

— NOEC-arvoa määritettäessä testataan vähintään viisi pitoisuutta geometrisessa sarjassa. Jokaista testipitoisuutta kohti suositellaan neljää rinnakkaisnäytettä ja kahdeksaa kontrollia. Pitoisuudet on porrastettava kertoimella, joka saa olla enintään 2,0.

— Yhdistetty lähestymistapa mahdollistaa sekä NOEC- että EC_x-arvon määrittämisen. Tällöin käytetään kahdeksaa käsittelypitoisuutta geometrisessa sarjassa. Jokaista käsittelyä kohti suositellaan neljää rinnakkaisnäytettä ja kahdeksaa kontrollia. Pitoisuudet on porrastettava kertoimella, joka saa olla enintään 1,8.

Raja-annostesti

30. Jos pitoisuusalueen määritystestissä ei havaita vaikutuksia suurimmalla pitoisuudella (esimerkiksi 1 000 mg/kg kuivaa maa-ainesta), varsinainen lisääntymistesti voidaan toteuttaa raja-annostestinä käyttäen testipitoisuutta 1 000 mg/kg kuivaa maa-ainesta. Raja-annostestin avulla voidaan osoittaa, että lisääntymisen NOEC- tai EC_{10}-arvo on rajapitoisuutta korkeampi, mutta samalla testissä käytettyjen punkkien määrä voidaan pitää mahdollisimman pienenä. Sekä käsitellyn maa-aineksen että kontrollin osalta tulee käyttää kahdeksaa rinnakkaisnäytettä.

Testin kesto ja mittaukset

31. Muistiin on kirjattava kaikki havaitut erot kontrolli- ja käsittelyastioissa olevien punkkien käyttäytymisessä ja morfologiassa.

32. Päivänä 14 loput elossa olevat punkit otetaan talteen maa-aineksesta lämpö- tai valoerotuksella tai jollakin muulla sopivalla menetelmällä (ks. lisäys 5). Poikaset (toukat, protonymfit ja deutonymfit) ja täysikasvuiset yksilöt lasketaan erikseen. Täysikasvuiset punkit, joita ei tässä yhteydessä löydetä, on kirjattava kuolleiksi, sillä oletuksena on, että ne ovat kuolleet ja maatuneet ennen arviointia. Talteenottamisen tehokkuus on todennettava 1–2 kertaa vuodessa kontrolleilla, joissa täysikasvuisten yksilöiden ja poikasten lukumäärä tunnetaan. Kaikkia kehitysvaiheita yhdessä koskevan keskimääräisen tehokkuuden on oltava vähintään 90 prosenttia (ks. lisäys 5). Täysikasvuisten ja poikasten lukumäärää ei oikaista tehokkuutta arvioitaessa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

33. Tietoa tilastollisista menetelmistä, joita voidaan käyttää testitulosten analysoinnissa, on 36–41 kohdissa. Lisäksi on syytä tutustua OECD:n julkaisuun (Document 54) ”Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application” (31).

34. Testin pääasiallinen mitattava ominaisuus on lisääntymiskyky eli tässä rinnakkaisnäyteastiaa kohti tuotettujen poikasten lukumäärä, kun astiaan on

▼M6

sijoitettu alun perin 10 täysikasvuista naarasta. Tilastollinen analyysi edellyttää, että jokaiselle käsittelylle ja kontrollille lasketaan lisääntymiskyvyn aritmeettinen keskiarvo (X) sekä varianssi (s^2). X:ää ja s^2:a käytetään ANOVA-menettelyissä, esimerkiksi Studentin t-testissä, Dunnettin testissä tai Watsonin-Williamsin testissä sekä 95 prosentin luottamusvälien laskemisessa.

Huomautus: Testin pääasiallinen mitattava ominaisuus on sama kuin hedelmällisyys, jota mitataan testin aikana tuotettujen elävien poikasten määrällä jaettuna testin alussa astiaan sijoitettujen emoeläinten lukumäärällä.

35. Käsittelemättömissä kontrolleissa eloonjääneiden naaraiden määrä on keskeinen hyväksyttävyyskriteeri, ja se on dokumentoitava. Pitoisuusalueen määrittämistestin tavoin kaikki muut merkit kemikaalin vaarallisuudesta on kirjattava loppuraporttiin.

EC_x

36. EC_x-arvot, mukaan lukien niitä koskevat 34 kohdassa kuvatun parametrin 95 prosentin luottamusvälit, lasketaan sopivien tilastollisten menetelmien avulla (esimerkiksi tilastollinen koestus, logistinen funktio tai Weibullin funktio, viritetty Spearmanin ja Kärberin menetelmä tai yksinkertainen interpolointi). EC_x saadaan lisäämällä yhtälöön kontrollin keskiarvon x prosenttia vastaava arvo. Jos halutaan laskea EC_{50} tai jokin muu EC_x-arvo, käsittelyä edeltävälle keskiarvolle (X) olisi tehtävä regressioanalyysi.

NOEC/LOEC

37. Jos tilastollisella analyysilla on tarkoitus määrittää NOEC/LOEC-arvo, astiakohtaiset tilastot (yksittäisiä astioita pidetään rinnakkaisnäytteinä) ovat tarpeen. Asianmukaisia tilastomenetelmiä tulee käyttää ekotoksisuustietojen tilastollisessa analyysissa sovellettavia nykyisiä lähestymistapoja koskevan OECD:n asiakirjan nro 54 mukaan (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application). Yleensä testin kohteen haitallisia vaikutuksia verrattuna kontrolliin tutkitaan käyttämällä yksisuuntaista (pienempää) hypoteesitestausta, jossa $p \leq 0,05$. Esimerkkejä annetaan seuraavissa kappaleissa.

38. Datan normaalijakaumaa voidaan testata esimerkiksi Kolmogorov-Smirnovin sopivuustestillä, vaihteluvälin ja normaalijakauman suhdetta mittaavalla R/s-testillä tai Shapiro-Wilk-testillä (kaksisuuntainen, $p \leq 0,05$). Cochranin testiä, Levenen testiä tai Bartlettin testiä (kaksisuuntainen, $p \leq 0,05$) voidaan käyttää varianssin homogeenisuuden testaamiseen. Jos parametritestimenetelmien edellytykset (normaalius, varianssin homogeenisuus) täyttyvät, voidaan tehdä yksisuuntainen varianssianalyysi (ANOVA) sekä tämän jälkeen monivertailutestejä. Monivertailuja (esimerkiksi Dunnettin testiä) tai alaspäin askeltavia trenditestejä (esimerkiksi Williamsin testiä, jos annosvastesuhde on monotoninen) voidaan käyttää sen laskemiseen, onko kontrollien ja testin kohteen eri pitoisuuksien välillä merkitseviä eroja ($p \leq 0,05$) (suositellun testin valinta OECD:n ohjeasiakirjan nro 54 mukaan (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application)). Muutoin NOEC- ja LOEC-arvojen määrittämisessä käytetään parametrittomia menetelmiä (esimerkiksi Bonferroni-U-testiä Holmin mukaan tai Jonckheere-Terpstran trenditestiä).

Raja-annostesti

39. Jos raja-annostesti (kontrollin ja vain yhden käsittelyn vertailu) on tehty ja jos parametristen testimenetelmien vaatimukset (normaalius, homogeenisuus) täyttyvät, metrisiä vasteita voidaan arvioida Studentin testillä (t-testillä). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia (Welchin t-testi) tai parametritonta testiä, kuten Mann-Whitney-U-testiä.

40. Kontrollien välisten (kontrolli ja liuotinkontrolli) merkitsevien erojen määrittämiseksi jokaisen kontrollin rinnakkaisnäytteet voidaan testata raja-annoksen yhteydessä kuvatulla tavalla. Jos näissä testeissä ei havaita

▼M6

merkitseviä eroja, kaikki kontrolli- ja liuotinkontrollirinnakkaisnäytteet voidaan yhdistää. Muussa tapauksessa kaikkia käsittelyjä tulee vertailla liuotinkontrolliin.

Testiraportti

41. Testiraportin on sisällettävä vähintään seuraavat tiedot:

— *Testikemikaali*

— testikemikaalin tunnistetiedot, nimi, erät, CAS-numero, puhtaus

— testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (esimerkiksi log K_{ow}, vesiliukoisuus, höyrynpaine, Henryn vakio (H) sekä mielellään myös tiedot testikemikaalin kulkeutumisesta maaperässä).

— *Testiorganismit*

— testiorganismien tunnistetiedot ja toimittaja, kuvaus kasvatusolosuhteista

— testiorganismien ikä.

— *Testiolosuhteet*

— kuvaus kokeen rakenteesta ja menettelyistä

— testimaa-aineksen valmistelutiedot; yksityiskohtainen erittely, jos käytetään luonnonmaata (alkuperä, historia, hiukkaskokojakauma, pH, orgaanisen aineksen pitoisuus sekä maalajiluokitus, jos sellainen on käytettävissä)

— maa-aineksen enimmäisvedenpidätyskyky

— kuvaus tekniikasta, jolla testikemikaali on applikoitu maa-ainekseen

— tiedot kemikaalin annostelussa käytetyistä kemiallisista apuaineista

— testiastioiden koko ja astiaa kohti annostellun testimaa-aineksen kuivamassa

— testiolosuhteet: valoteho, valoisien ja pimeiden jaksojen kesto, lämpötila

— kuvaus eläinten ruokinnasta; testissä käytetyn ruoan tyyppi ja määrä, ruokintapäivämäärät

— maa-aineksen pH ja vesipitoisuus testin alussa ja testin aikana (kontrolli ja jokainen käsittely)

— yksityiskohtainen kuvaus talteenottomenetelmästä ja talteenottamisen tehokkuudesta.

— *Testitulokset*

— jokaisesta testiastiasta tavattujen poikasten määrä testin lopussa

— jokaisesta testiastiasta tavattujen täysikasvuisten naaraiden määrä sekä täysikasvuisten kuolleisuus (%) testin lopussa

— kuvaus selvistä oireista tai selkeistä muutoksista käyttäytymisessä

— vertailutestikemikaalista saadut tulokset

— yhteenvetotilastot (EC_x- ja/tai NOEC-arvo), mukaan lukien 95 prosentin luottamusvälit sekä kuvaus laskentamenetelmästä

▼**M6**

— pitoisuusvastesuhdetta esittävä käyrä

— poikkeukset tässä testimenetelmässä kuvatuista menettelyistä ja kaikki testin aikana ilmenneet epätavallisuudet.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21–46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259–274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS – Journal of Soils and Sediments 3, 73–77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition. Teoksessa: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 s.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). Teoksessa: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487–492

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: s. 241–249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: s. 621–628.

(8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. Teoksessa: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, s. 239–251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. Teoksessa: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 s.

(10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395–433.

(11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413–433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154–7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95–122.

(14) International Organisation for Standardization (ISO) (1994). Soil Quality – Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

▼**M6**

(15) Tämän liitteen luku C.8. Myrkyllisyystutkimus madoilla.

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195–209.

(17) International Organisation for Standardization (ISO) (1993). Soil Quality –Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122–125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395–433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130–135.

(22) Tämän liitteen luku C.32 (Änkyrimatojen lisääntymistesti).

(23) International Organisation for Standardization (ISO) (1994). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 s.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 s.

(26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with ”good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581–583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103–107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11–59.

(30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647–658.

(31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä sovelletaan seuraavia määritelmiä (tässä testissä kaikki vaikuttavat pitoisuudet ilmaistaan testikemikaalin massana testimaan kuivamassaa kohti):

Kemikaali: aine tai seos.

NOEC (no observed effect concentration = pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta): testikemikaalin pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia. Tässä testissä NOEC-arvoa vastaavalla pitoisuudella ei ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta ($p < 0,05$) tietyn altistusajan kuluessa kontrolliin verrattuna.

LOEC (lowest observed effect concentration = pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla on tilastollisesti merkitsevä vaikutus ($p < 0,05$) tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna.

ECx (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia): pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC_{50} on pitoisuus, jolla arvioidaan testin lopussa olevan 50 prosentin vaikutus altistuksen kohteeksi joutuneeseen populaatioon määritellyn altistusajan kuluessa.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M6

Lisäys 2

Maan enimmäisvedenpidätyskyvyn määrittäminen

Seuraavan menetelmän, jolla määritetään maan enimmäisvedenpidätyskyky, on havaittu olevan tarkoituksenmukainen. Se on kuvattu saasteiden vaikutuksia lieroille koskevan ISO DIS 11268-2 (Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Method for determination of effects on reproduction (23)) -standardin liitteessä C.

Kerää tietty määrä (esimerkiksi viisi grammaa) testimaasubstraattia sopivalla näytteenottovälineellä (kierrekairalla tms.). Aseta kierrekairaputken pohjalle pala märkää suodatinpaperia, ja laita se sitten telineessä vesiastiaan. Putki upotetaan veteen vähitellen, kunnes vedenpinta on maanäytteen yläpuolella. Sen jälkeen näytettä pidetään vedessä noin kolme tuntia. Kaikkea maa-aineksen kapillaareihin imeytynyttä vettä ei pystytä pidättämään, minkä vuoksi maanäytettä valutetaan kahden tunnin ajan asettamalla putki hyvin märkään kerrokseen hienojakoista kvartsihiekkaa, joka on laitettu suljettuun astiaan (kuivumisen estämiseksi). Sen jälkeen näyte punnitaan ja kuivataan pysyvään massaan 105 °C:ssa. Vedenpidätyskyky (WHC) lasketaan seuraavasti:

$$\text{WHC (prosenttiosuus kuivamassasta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

jossa:

S = vesikyllästetty substraatti + putken massa + suodatinpaperin massa

T = taara (putken massa + suodatinpaperin massa)

D = substraatin kuivamassa.

▼**M6**

Lisäys 3

Maan pH:n määrittäminen

Seuraava menetelmä, jolla määritetään maan pH-arvo, perustuu maan laatua koskevassa standardissa ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH (16) olevaan kuvaukseen.

Tietyn määrän maata annetaan kuivua huoneenlämmössä vähintään 12 tunnin ajan. Sen jälkeen maasta valmistetaan suspensio (joka sisältää vähintään viisi grammaa maata), jonka tilavuus on viisinkertainen joko analyyttista laatua olevaan 1 M:n kaliumkloridiliuoksen (KCl) tilavuuteen tai analyyttista laatua olevaan 0,01 M:n kalsiumkloridiliuokseen ($CaCl_2$) nähden. Sen jälkeen suspensiota ravistetaan perinpohjaisesti viisi minuuttia, ja sen annetaan asettua vähintään kaksi mutta enintään 24 tuntia. Nestefaasin pH-arvo mitataan pH-mittarilla, joka kalibroidaan ennen jokaista mittausta käyttämällä asianmukaisia puskuriliuoksia (esimerkiksi pH 4,0 ja 7,0).

▼M6

Lisäys 4

***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* -lajin (petopunkki) kasvatus ja viljelmän synkronointi**

***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* -lajin kasvatus:**

Viljelmiä voidaan pitää muoviastioissa tai lasipurkeissa, jotka on täytetty kipsi- ja hiilijauheen seoksella (sekoitussuhde 9:1). Kipsi saadaan pidettyä kosteana lisäämällä tarvittaessa muutama pisara tislattua tai deionisoitua vettä. Ihanteellinen kasvatuslämpötila on 20 ± 2 °C. Valoisan ja pimeän ajan vaihtelulla ei ole tälle lajille merkitystä. Saaliseläimenä voivat olla lajeihin *Typrophagus putrescentiae* tai *Caloglyphus sp.* kuuluvat punkit (ravintona käytettäviä punkkeja on käsiteltävä varoen, sillä ne saattavat aiheuttaa allergiaa ihmisillä), mutta sopivia saaliseläimiä ovat myös sukkulamadot, änkyrimadot ja hyppyhäntäiset. Saaliseläinten lähteen on oltava tiedossa. Populaation kasvattaminen voidaan aloittaa yhdestä naaraasta, sillä koiraat kehittyvät hedelmöittymättömistä munista. Sukupolvet ovat suurelta osin päällekkäisiä. Naaras voi elää vähintään 100 päivää ja tuottaa elinaikanaan noin 100 munaa. Muninta on kiivaimmillaan 10–40 päivän iässä (täysikasvuiseksi tulon jälkeen), jolloin tuotettujen munien määrä on 2,2 munaa naarasta kohti päivässä. Kehittymisaika munasta täysikasvuiseksi naaraaksi on noin 20 päivää 20 °C:ssa. Etukäteen kannattaa ylläpitää useampaa kuin yhtä viljelmää.

***Typrophagus putrescentiae* -lajin kasvatus:**

Punkkeja pidetään lasiastiassa, joka on täytetty hienolla leivontahiivajauheella ja joka sijoitetaan KNO_3-liuoksella täytettyyn muoviämpäriin, jotta punkit eivät pääse pois astiasta. Punkit asetetaan jauheen päälle. Myöhemmin ne sekoitetaan huolellisesti lastalla jauheeseen, joka on vaihdettava kahdesti viikossa.

Viljelmän synkronointi:

Testissä käytettävien yksilöiden on oltava suunnilleen samanikäisiä (seitsemän päivää aikuisvaiheen saavuttamisesta). Kasvatuslämpötilassa 20 °C tämä saavutetaan seuraavasti:

Naaraat siirretään puhtaaseen kasvatusastiaan ja lisätään riittävästi ruokaa

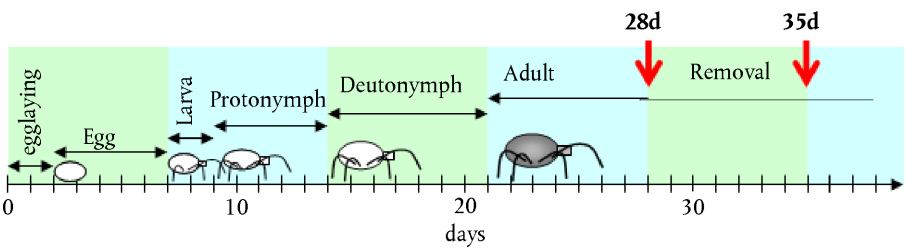
— Muninta-aikaa annetaan 2–3 vuorokautta, minkä jälkeen naaraat poistetaan

— Täysikasvuiset naaraat otetaan testiin päivinä 28–35 sen jälkeen, kun täysikasvuiset naaraat siirrettiin puhtaisiin kasvatusastioihin.

Täysikasvuiset naaraat on helppo erottaa koiraista ja muista kehitysvaiheista, sillä ne ovat kooltaan suurempia ja muodoltaan paisuneita ja niillä on ruskea selkäpanssari. Koiraat ovat hoikempia ja ohuita, ja nuoret yksilöt ovat valkoisia tai kermanvärisiä. Punkkien kehitys 20 °C:n lämpötilassa on suurin piirtein seuraavan kuvion mukainen (kuva): Muna 5 vrk, toukka 2 vrk, protonymfi 5 vrk, deutonymfi 7 vrk, naaraan munintaa edeltävä vaihe 2 vrk. Tämän jälkeen punkit ovat täysikasvuisia.

Kuva

Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer -lajin kehittyminen 20 °C:n lämpötilassa. (Poistaminen = naaraat käytetään testiin.)



▼**M6**

Täysikasvuiset koe-eläimet poistetaan synkronoidusta viljelmästä ja siirretään testiastioihin 28.–35. päivänä sen jälkeen, kun emoeläimet ovat aloitttaneet munimisen (7–14 vuorokautta sen jälkeen, kun niistä on tullut täysikasvuisia). Näin varmistetaan, että koe-eläimet eivät enää ole munintaa edeltävässä vaiheessa ja ne ovat pariutuneet kasvatusastiassa olevien koiraiden kanssa. Laboratorioviljelmistä tehtyjen havaintojen perusteella on syytä olettaa, että naaraat pariutuvat heti tai pian täysikasvuiseksi tulemisensa jälkeen, jos läsnä on koiraita (Ruf, Vanninen, henkilökohtaiset havainnot). Seitsemän vuorokauden jakso on valittu siksi, että se helpottaa integroimista laboratorion rutiineihin ja toimii puskurina punkkien yksilöllisille kehityseroille. Munintavaihe aloitetaan vähintään samalla määrällä naaraita, joka tarvitaan myöhemmin testiin. (Jos testiä varten tarvitaan esimerkiksi 400 naarasta, vähintään 400 naaraan annetaan munia 2–3 vuorokauden ajan.) Synkronoidun populaation alussa munia on oltava vähintään 1 200 (naaraiden ja koiraiden välinen suhde noin 0,5, kuolleisuus noin 0,2). Samassa astiassa on suositeltavaa pitää enintään 20–30 munivaa naarasta, jotta eläimet eivät ala syödä toisiaan.

▼**M6**

Lisäys 5

Talteenottomenetelmät

Lämpöerottaminen on sopiva menetelmä mikroniveljalkaisten erottamiseen maa-aineksesta/substraatista (ks. oheinen kuva). Menetelmä perustuu organismien aktiivisuudelle, jolloin vain liikkuvat yksilöt tulevat kirjatuiksi. Lämpöerottamisen periaatteena on, että näytteessä olevien organismien olosuhteita heikennetään asteittain, jolloin ne poistuvat substraatista ja putoavat kiinnitysnesteeseen (esimerkiksi etanoliin). Ratkaisevia kohtia ovat talteenottoprosessin kesto sekä nopeus, jolla olosuhteet muuttuvat organismien kannalta hyvistä siedettävien kautta huonoiksi. Ympäristömyrkyllisyyttä testattaessa talteenottamisen täytyy tapahtua mahdollisimman nopeasti, sillä populaation kasvu talteenoton aikana vääristää tuloksia. Toisaalta näytteen lämpötila- ja kosteusolosuhteiden on aina oltava sellaisia, että punkit voivat liikkua. Maa-ainesnäytteen kuumentaminen saa substraatin kuivumaan. Jos kuivuminen tapahtuu liian nopeasti, osa punkeista saattaa myös kuivua ennen kuin ne ehtivät päästä pois.

Tämän vuoksi esitetään seuraavaa menettelyä (24), (25).

Laitteisto: Berlese-Tullgrenin suppilo tai vastaava menetelmä, esimerkiksi McFadyenin kehittämä (lämmitetään ylhäältäpäin, näyte laitetaan suppiloon)

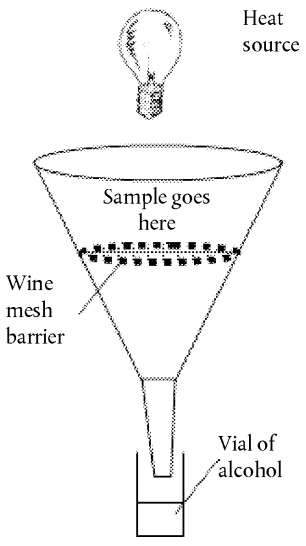
Lämmityksen eteneminen: 25 °C 12 tunnin ajan, 35 °C 12 tunnin ajan, 45 °C 24 tunnin ajan (yhteensä 48 h). Lämpötila mitataan substraatista.

Kiinnitysneste: 70-prosenttinen etanoli

Ohjeet: Ota testissä käytetty lasipurkki. Poista kansi ja kääri suuaukon ympärille pala verkkoa tai kangasta. Kankaan silmäkoon on oltava 1,0–1,5 mm. Kiinnitä kangas paikalleen kumirenkaalla. Käännä lasipurkki varovasti ylösalaisin ja laita se talteenottolaitteeseen. Kangas estää substraattia valumasta kiinnitysnesteeseen, mutta päästää punkit pois näytteestä. Kun kaikki lasipurkit ovat erotuslaitteissa, aloita lämmittäminen. Lopeta talteenotto 48 tunnin kuluttua. Poista kiinnitysainetta sisältävät ampullit ja laske punkit preparointimikroskoopin avulla.

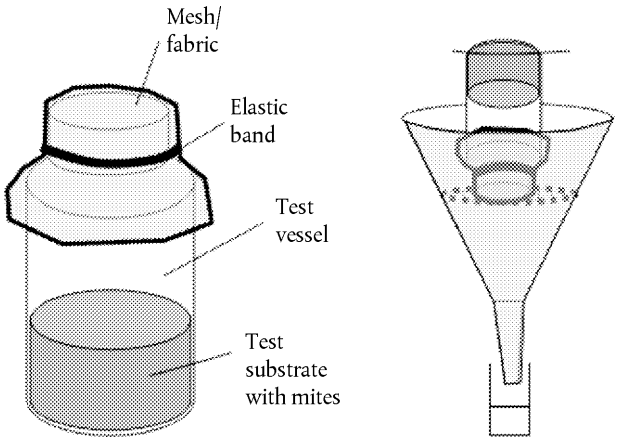
Valitun menetelmän tehokkuus talteenottamisessa on osoitettava 1–2 kertaa vuodessa käyttämällä astioita, joissa on tunnettu määrä poikasia ja täysikasvuisia punkkeja käsittelemättömässä testisubstraatissa. Kaikkia kehitysvaiheita yhdessä koskevan keskimääräisen tehokkuuden on oltava ≥ 90 prosenttia.

Berlese-Tullgrenin suppilon tyyppinen talteenottolaite



▼**M6**

Testipurkin valmistelu testin päättymisen jälkeen ennen talteenoton aloittamista



▼**M6**

Lisäys 6

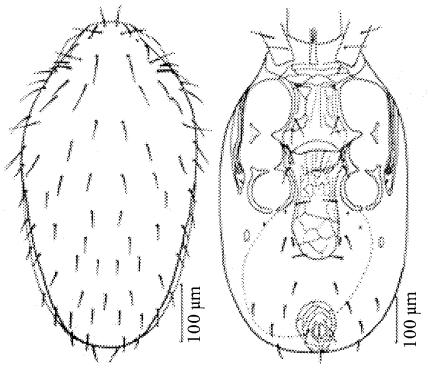
***Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* -lajin tunnistaminen**

Alaryhmä/lahko/alalahko:	Heimo:	Suku/alasuku/laji:
Punkit/Loispunkit/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

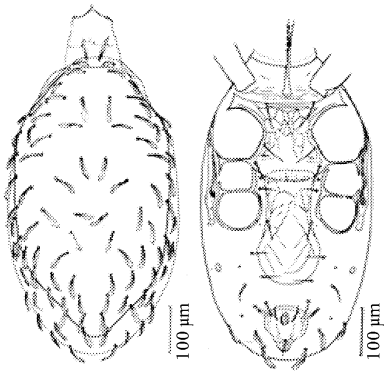
Laatija ja päivämäärä:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23.1.2007

Käytetty kirjallisuus:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1–523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 s. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 s.

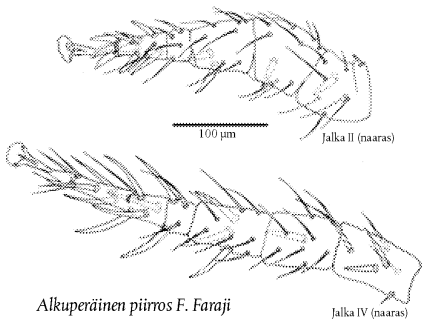
Tunnusomaiset ominaisuudet:	Tectumissa pyöristynyt, hammastettu reuna; hypostomaalipainaumissa yli 6 pientä uloketta; Z4:n hännänpuoleiset selkäsuat eivät erityisen pitkät; setiformiset selkäsuat; genitaalipanssari normaali, ei kovin suurentunut eikä ulotu peräpanssariin saakka; selkäpanssarin taaemmaisessa osassa ei parittomia sukia; jaloissa II ja IV paksuja makrosukia; selkäsuka Z5 noin kaksi kertaa pitempi kuin J5; saksien kiinteässä haarassa 12–14 hammasta ja liikkuvassa haarassa 2 hammasta; idiosoman pituus 520–685 µm. *Hypoaspis miles* -lajia käytetään myös biologisessa torjunnassa, ja se saatetaan sekoittaa *H. aculeiferiin*. Tärkein ero on seuraava: *H. miles* kuuluu *Cosmolaelaps*-alasukuun ja sen selkäsuat ovat veitsimäiset, kun taas *H. aculeifer* kuuluu *Geolaelaps*-alasukuun ja sen selkäsuat ovat setiformiset.



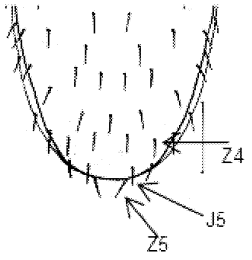
Hypoaspis aculeifer Hughesin (1976) mukaan



Hypoaspis miles Hughesin (1976) mukaan



Alkuperäinen piirros F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
selkäpanssari, jossa lajille tyypilliset suat

▼**M6**

Lisäys 7

Perustietoa *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* -lajin biologiasta

Hypoaspis aculeifer kuuluu sukuun Lealapidae, lahkoon Acari (punkit), luokkaan Arachnida, pääjaksoon niveljalkaiset. Ne elävät kaikentyyppisessä maa-aineksessa ja käyttävät ravinnokseen muita punkkeja, sukkulamatoja, änkyrimatoja ja hyppyhäntäisiä (26). Jos ravinnosta on pulaa, nämä punkit alkavat syödä toisiaan. Petopunkkien osat ovat idiosoma ja gnathosoma. Idiosoma ei jakaannu selvästi päähän (prosoma) ja muuhun vartaloon (opisthosoma). Gnathosomassa on syömiseen tarvittavat välineet, kuten tuntokarvat ja sakset. Sakset ovat kolmihaaraiset ja niissä on erikokoisia hampaita. Syömisen lisäksi koiraat käyttävät saksiaan pääasiassa spermapakettien siirtämiseen naaraisiin. Selkäpanssari peittää idiosoman lähes täysin. Suuren osa naaraan idiosomasta vievät lisääntymiselimet, jotka ovat erityisen helposti erotettavissa hieman ennen munien laskemista. Vatsapuolella erottuu kaksi panssaria, rintalasta sekä genitaalipanssari. Kaikissa raajoissa on harjaksia ja piikkejä. Harjaksia eläin käyttää ankkureina liikkuessaan maassa tai sen pinnalla. Ensimmäistä raajaparia käytetään lähinnä tuntosarvina. Toista raajaparia käytetään paitsi liikkumiseen, myös saaliiseen tarttumiseen. Neljännen raajaparin piikit ovat suojaamista varten, mutta, muodostavat myös eräänlaisen liikemoottorin. Koiraat ovat 0,55–0,65 mm pitkiä ja painavat 10–15 µg. Naaraat ovat 0,8–0,9 mm pitkiä ja painavat 50–60 µg (8) (kuva 1).

Kuva 1

***H. aculeifer* -lajin naaras, koiras, protonymfi ja toukkia.**



Naaraspunkit tulevat sukukypsiksi 23 °C:ssä 16 vuorokaudessa ja koiraat 18 vuorokaudessa (6). Naaraat kantavat siittiösoluja solenostomissa, mistä ne siirretään kohtuun. Siittiösoluja säilytetään kohdussa, jossa ne kypsyvät. Hedelmöittyminen tapahtuu vasta, kun siittiösolut ovat kypsyneet kohdussa. Naaraat laskevat hedelmöityneet tai hedelmöittymättömät munat rykelminä tai erikseen mieluiten pieniin rakosiin. Paritelleet naaraat voivat tuottaa molempia sukupuolia olevia poikasia, mutta parittelemattomien naaraiden munista kuoriutuu vain koiraita. Täysikasvuiseksi kehittyessään punkki käy läpi neljä kehitysvaihetta: muna–toukka, toukka–protonymfi, protonymfi–deutonymfi, deutonymfi–täysikasvuinen.

Muna on maidonvalkoinen, soikea, läpinäkyvä, noin 0,37 mm pitkä ja siinä on kiinteä vaippa. Kirjallisuuslähteen (8) mukaan toukkien koko on 0,42–0,45 mm. Toukilla on vain kolme raajaparia. Pään alueelle kehittyvät tuntokarvat ja sakset. Saksissa on muutama pieni hammas, ja niitä käytetään apuna munasta kuoriutumisessa. Ensimmäisen nahanluonnin jälkeen 1–2 vuorokauden kuluttua kuoriutumisesta kehittyvät protonymfit. Nekin ovat valkoisia ja kooltaan 0,45–0,62 mm (8), ja niillä on neljä raajaparia. Saksissa on jo kaikki hampaat. Tästä vaiheesta lähtien punkit alkavat saalistaa. Saaliseläimen kutikula lävistetään saksilla ja saaliseläimeen eritetään ruoansulatusnestettä. Lopuksi punkki imee muhentuneen ruokansa. Saksia voidaan käyttää myös suuren ravinnon paloittelemiseen (28). Seuraavan nahanluonnin jälkeen kehittyvät deutonymfit. Ne ovat kooltaan 0,60–0,80 mm

▼**M6**

ja väriltään keltaisesta vaaleanruskeaan. Tästä vaiheesta lähtien naaras- ja koiraspunkit voi erottaa toisistaan. Nahka luodaan vielä kerran noin 14 vuorokauden iässä. Nahanluonnin aikana eläin on liikkumaton ja sille kehittyy ruskea panssari. Tämän jälkeen punkit ovat täysikasvuisia (28), (29), (30). Punkit elävät 48–100 vuorokautta 25 °C:n lämpötilassa (27).

▼**M6**

Lisäys 8

Yhteenveto tärkeimmistä *hypoaspis*-testissä tehtävistä toimenpiteistä ja eri tehtävien aikataulu

Aika (vuorokausina) testin aloittaminen = päivä 0	Tehtävä tai toimenpide
Päivät – 35 … – 28	Naaraat siirretään kantaviljelmästä puhtaisiin astioihin synkronoinnin aloittamista varten 2 päivää myöhemmin naaraat poistetaan 2–3 kertaa viikossa: annetaan riittävästi ruokaa
Päivä – 5 (± 2)	Keinomaa valmistetaan
Päivä – 4 (± 2)	Keinomaan vedenpidätyskyky todetaan Kuivatus yön yli Seuraavana päivänä: näytteet punnitaan ja vedenpidätyskyky lasketaan
Päivä – 4 (± 2)	Keinomaa esikostutetaan 20–30 prosenttiin vedenpidätyskyvystä
Päivä 0	Testi aloitetaan: testikemikaali lisätään keinomaahan Jokaiseen rinnakkaisnäytteeseen siirretään 10 naarasta Rinnakkaisnäytteet punnitaan Perustetaan abioottiset kontrollit kosteuspitoisuuden ja pH-arvon mittaamista varten; 2 rinnakkaisnäytettä jokaiselle käsittelylle Kosteuspitoisuuden kontrolleja kuivatetaan yön yli Seuraavana päivänä: kosteuspitoisuuden kontrollit punnitaan Seuraavana päivänä: kuivattujen abioottisten kontrollien pH-arvo mitataan
Päivä 3, 6, 9, 12 (noin)	Jokaiseen rinnakkaisnäytteeseen laitetaan riittävästi saalisorganismeja Kaikki rinnakkaisnäytteet punnitaan ja tarvittaessa korvataan haihtunut vesi
Päivä 14	Testi lopetetaan ja punkit otetaan talteen kaikista rinnakkaisnäytteistä sekä talteenoton tehokkuuden kontrolleista Vesipitoisuuden kontrolleja kuivatetaan yön yli Seuraavana päivänä: vesipitoisuuden kontrollit punnitaan Seuraavana päivänä: kuivattujen kontrollien pH-arvo mitataan
Päivä 16	Talteenotto lopetetaan
Päivä 16 +	Talteenotettujen täysikasvuisten yksilöiden ja poikasten lukumäärä kirjataan muistiin Tulokset raportoidaan mallitaulukoita käyttämällä Testauksessa käytetty menetelmä raportoidaan testipöytäkirjalomakkeita käyttämällä.

▼M6

C.37. 21PÄIVÄN MITTAINEN SEULONTATUTKIMUS KALOILLA: LYHYTAIKAINEN ESTROGEENI- JA ANDROGEENIAKTIIVISUUTEEN SEKÄ AROMATAASIN ESTOON KOHDISTUVA SEULONTA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 230 (2009). Tarve kehittää ja validoida kalatutkimus, jolla pystytään havaitsemaan tiettyjä hormonitoimintaan vaikuttavia kemikaaleja, perustuu siihen, että kemikaalien ympäristöpitoisuuksista saattaa aiheutua haittavaikutuksia sekä ihmisille että eläimille kemikaalien ja hormonijärjestelmän välisen vuorovaikutuksen vuoksi. Vuonna 1998 OECD aloitti tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien ohjeiden uudistuksen ja uusien ohjeiden laatimisen mahdollisten hormonitoimintaa häiritsevien aineiden seulontaa ja testausta varten. Yksi toimenpiteen osa oli laatia testiohjeet kalojen hormonijärjestelmään vaikuttavien kemikaalien seulontaan. Kahdenkymmenenyhden päivän mittainen kalojen hormonijärjestelmään kohdistuva seulontatutkimus käsiteltiin laaja-alaisessa validointiohjelmassa. Siihen sisältyi laboratorioiden välisiä tutkimuksia tietyillä kemikaaleilla, ja tutkimusten tavoitteena oli osoittaa määritysmenetelmän tarkkuus ja luotettavuus estrogeenia ja aromataasia estävien kemikaalien havaitsemisessa (1, 2, 3, 4, 5) kolmella tutkitulla kalalajilla (rasvapäämutu, medaka ja seeprakala). Tutkimukset osoittivat, että androgeeninen aktiivisuus oli mahdollista osoittaa rasvapäämutussa ja medakassa, mutta ei seeprakalassa. Tällä testimenetelmällä ei voida havaita antiandrogeenisesti vaikuttavia kemikaaleja. Validoinnin vertaisarvioi asiantuntijaryhmä, jonka nimittivät testiohjeohjelman kansalliset koordinaattorit (6). Määritysmenetelmää ei ole tarkoitettu hormonitoimintaa häiritsevien tiettyjen mekanismien tunnistamiseen, sillä koe-eläimillä on ehjä hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli (HPG-akseli), joka saattaa reagoida kemikaaleihin, jotka vaikuttavat HPG-akseliin eri pitoisuuksilla. Kalojen lyhytaikaiseen lisääntymistutkimukseen (OECD TG 229) sisältyy rasvapäämutun hedelmällisyys ja tarvittaessa sukupuolirauhasten histopatologia sekä kaikki tähän testimenetelmään kuuluvat tutkittavat ominaisuudet. OECD TG 229 -testiohje koskee niiden kemikaalien seulontaa, jotka vaikuttavat lisääntymiseen eri mekanismeilla, mukaan luettuina hormonijärjestelmään kohdistuvat vaikutustavat. Tämä on otettava huomioon ennen sopivimman testimenetelmän valintaa.

2. Tässä testimenetelmässä kuvataan *in vivo* -seulontamenetelmä, jossa sukukypsiä koiraskaloja ja kutevia naaraskaloja pidetään yhdessä ja altistetaan kemikaalille tietyn ajan niiden elinkaaresta (21 päivää). Kahdenkymmenenyhden päivän pituisen altistusjakson lopussa koirailta ja naarailta mitataan yksi tai kaksi biomarkkeriominaisuutta (käytetyn lajin mukaan), joita pidetään indikaattoreina testikemikaalin estrogeeni- ja androgeeniaktiivisuudesta sekä aromataasin estosta. Nämä ominaisuudet ovat vitellogeniini ja sekundaariset sukupuoliominaisuudet. Vitellogeniini mitataan rasvapäämutulta, medakalta ja seeprakalalta, kun taas sekundaariset sukupuoliominaisuudet mitataan vain rasvapäämutulta ja medakalta.

3. Tämä biologinen testi toimii tiettyjen hormonijärjestelmään kohdistuvien vaikutustapojen *in vivo* -seulontamenetelmänä, ja sitä sovellettaessa on otettava huomioon asiakirjaan ”OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (28) (hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva toimintamalli) liittyvä konteksti.

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

4. Munimalla lisääntyvien selkärankaisten naaraiden maksa tuottaa yleensä vitellogeniinia verenkierrossa olevan endogeenisen estrogeenin avulla. Se on munankeltuaisen proteiinien esiaste, ja kun maksa on tuottanut sitä, se kulkeutuu verenkierrossa munasarjoihin, joissa kehittyvät munasolut ottavat sen sisäänsä ja muokkaavat sitä. Epäkypsien naaras- ja koiraskalojen plasmassa vitellogeniinia on lähes mahdoton havaita, koska niillä ei ole riittävästi estrogeenia verenkierrossaan. Maksa voi kuitenkin syntetisoida ja erittää vitellogeniinia eksogeenisen estrogeenistimulaation avulla.

▼**M6**

5. Vitellogeniinin mittauksella voidaan havaita kemikaaleja, joilla on erilaisia estrogeeniin liittyviä vaikutustapoja. Estrogeeniin vaikuttavien kemikaalien havaitseminen on mahdollista mittaamalla vitellogeniinin indusointia koiraskaloilla, ja sitä on dokumentoitu runsaasti tieteellisessä vertaisarvioidussa kirjallisuudessa (esimerkiksi (7)). Vitellogeniinin indusointi on osoitettu myös aromatisoituville androgeeneille altistumisen jälkeen (8, 9). Kun naaraskalojen verenkierron estrogeenipitoisuus pienentyy esimerkiksi estämällä aromataasia muuntamasta endogeenista androgeenia luonnolliseksi estrogeeniksi, 17β-estradioliksi, myös aromataasia estäviä ominaisuuksia sisältävien kemikaalien havaitsemisessa käytettävän vitellogeniinin pitoisuus pienenee (10, 11). Estrogeenin/aromataasin estämisen aiheuttaman vitellogeniinivasteen biologinen merkityksellisyys on osoitettu ja se on dokumentoitu laajalti. On kuitenkin mahdollista, että vitellogeniinin tuotantoon naarailla voivat vaikuttaa myös yleinen myrkyllisyys ja muuhun kuin hormonijärjestelmään kohdistuvat myrkylliset vaikutustavat (esimerkiksi hepatotoksisuus).

6. Useita mittausmenetelmiä on kehitetty onnistuneesti, ja ne on myös vakioitu rutiinikäyttöön. Esimerkkinä tästä ovat lajikohtaiset entsyymivälitteiset immunosorbenttimääritysmenetelmät (ELISA), joissa käytetään immunokemiaa kvantifioitaessa vitellogeniinia yksittäisiltä kaloilta otetuista veri- tai maksanäytteistä (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Rasvapäämutun verestä, seeprakalan verestä tai pään/pyrstön homogenaatista sekä medakan maksasta otetaan näytteitä vitellogeniinin mittausta varten. Medakalla verestä ja maksasta mitattujen vitellogeniiniarvojen välinen korrelaatio on hyvä (19). Lisäyksessä 6 on esitetty suositeltavat näytteenottomenetelmät vitellogeniinianalyysia varten. Vitellogeniinin mittaukseen tarkoitettuja testipaketteja on saatavilla laajalti, ja niiden on perustuttava validoituun lajikohtaiseen ELISA-menetelmään.

7. Tiettyjen lajien koiraskaloilla sekundaariset sukupuoliominaisuudet ovat ulkoisesti näkyviä, ja ne ovat kvantifioitavissa ja vastaavat verenkierron endogeenisten androgeenien pitoisuutta rasvapäämutulla ja medakalla mutta eivät seeprakalalla, koska sillä ei ole kvantifioitavia sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Naarailla on kyky kehittää koiraan sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, kun ne altistuvat androgeenisesti vaikuttaville kemikaaleille vedessä. Tieteellisessä kirjallisuudessa on useita tutkimuksia, joissa dokumentoidaan tämäntyyppisestä vasteesta rasvapäämutulla (20) ja medakalla (21). Koiraskalojen sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien vähenemisen tulkinnassa on syytä olla varovainen heikon tilastollisen voiman takia, ja sen on perustuttava asiantuntijan arvioon ja näyttöön perustuvaan toimintatapaan. Seeprakalan käyttöön tässä määrityksessä liittyy rajoituksia, koska sillä ei ole kvantifioitavia sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, jotka reagoivat androgeenisesti vaikuttaviin kemikaaleihin.

8. Rasvapäämutulla eksogeenisen androgeenialtistuksen pääindikaattori on naaraskalan kuonossa sijaitsevien kutukyhmyjen lukumäärä. Medakalla tärkein merkki eksogeenisesta altistumisesta androgeenisesti vaikuttaville kemikaaleille on naaraskalojen sukuelinpapillien lukumäärä. Lisäyksissä 5A ja 5B esitetään suositeltavat menetelmät rasvapäämutun ja medakan sukupuoliominaisuuksien arvioimiseksi.

9. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ovat lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

10. Määrityksessä lisääntymistilassa olevat koiras- ja naaraskalat altistetaan yhdessä testiastiassa. Kumpikin sukupuoli voidaan erottaa selvästi aikuisuuden ja lisääntymistilan perusteella, joten kukin tutkittava ominaisuus voidaan analysoida sukupuolikohtaisesti, ja myös sukupuolikohtainen herkkyys eksogeenisille kemikaaleille voidaan selvittää varmasti. Testin päätteeksi sukupuoli vahvistetaan sukupuolirauhasten makroskooppisella tutkimuksella,

▼M6

joka tehdään avaamalla kalan maha saksilla ventraalisesti. Yhteenveto oleellisista biologisen testin olosuhteista on lisäyksessä 2. Yleensä testi aloitetaan kalalla, joka on otettu kutuikäisestä populaatiosta; vanhoja kaloja ei tule käyttää. Ohjeita kalan iän ja lisääntymistilan selvittämiseen on Kalan valinta -kohdassa. Testi tehdään käyttäen kolmea kemikaalialtistuksen pitoisuutta ja vesikontrollia sekä tarvittaessa liuotinkontrollia. Medakan ja seeprakalan kanssa käytetään kahta astiaa tai rinnakkaisnäytettä käsittelykertaa kohti (kukin astia sisältää viisi koirasta ja viisi naarasta), kun taas rasvapäämutun kanssa käytetään neljää astiaa tai rinnakkaisnäytettä käsittelykertaa kohti (kukin astia sisältää kaksi koirasta ja neljä naarasta). Tällä tavalla voidaan mukauttaa rasvapäämutukoiraan reviirikäyttäytyminen ja samalla säilyttää testin riittävä voima. Altistusta jatketaan 21 päivää, ja kaloista otetaan näytteet altistuksen päivänä 21.

11. Päivänä 21 tehtävän näytteenoton yhteydessä kalat lopetetaan inhimillisellä tavalla. Sekundaariset sukupuoliominaisuudet mitataan rasvapäämutulta ja medakalta (ks. lisäykset 5A ja 5B). Verinäytteet vitellogeniinin määrittämiseksi otetaan seeprakalalta ja rasvapäämutulta; vaihtoehtoisesti seeprakalalta voidaan ottaa pää/pyrstö vitellogeniinin määrittämistä varten (lisäys 6). Medakalta otetaan maksa vitellogeniinianalyysia varten (lisäys 6).

TESTIN HYVÄKSYTTÄVYYSKRITEERIT

12. Testitulokset ovat hyväksyttäviä, jos seuraavat ehdot täyttyvät:

— kuolleisuus vesi- (tai liuotin)kontrolleissa on enintään 10 prosenttia altistusjakson lopussa.

— liuenneen hapen pitoisuus on vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko altistusjakson ajan.

— veden lämpötila testiastioiden välillä vaihtelee enintään ± 1,5 °C milloin tahansa testin aikana ja poikkeaa enintään 2 °C siitä lämpötila-alueesta, joka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäys 2).

— saatavilla on oltava näyttöä, joka osoittaa, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

13. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

a) happi- ja pH-mittarit

b) laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen

c) asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan

d) säiliöitä, jotka ovat kemiallisesti inerttiä materiaalia ja riittävän suuria suhteessa suositeltuun lastaus- ja varastotiheyteen (ks. lisäys 2)

e) kutualusta rasvapäämutulle ja seeprakalalle; tarkemmat tiedot ovat lisäyksessä 4

f) riittävän tarkka vaaka (ts. tarkkuus ±0,5 mg).

▼M6

Vesi

14. Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji selviytyy ja kasvaa riittävän pitkän ajan. Veden laadun pitäisi pysyä vakiona testin ajan. Veden pH:n on oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella minkään testin aikana enempää kuin 0,5 pH-yksikköä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta), näytteitä on otettava säännöllisin väliajoin analyyseja varten. Raskasmetallit (esimerkiksi Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esimerkiksi Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ja SO_4^{2-}), torjunta-aineet (esimerkiksi orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esimerkiksi kuuden kuukauden välein). Lisäyksessä 3 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia.

Testiliuokset

15. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuos valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittamista tai ultraääntä). Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimen käyttöä kantoaineena ei suositella. Jos liuotin on kuitenkin tarpeen, rinnalla on käytettävä liuotinkontrollia, ja liuotinpitoisuuden on oltava sama kuin kemikaalilla käsittelyissä. Vaikeasti testattavien testikemikaalien yhteydessä liuotin voi olla teknisesti paras ratkaisu, mutta tällöin tulee noudattaa OECD:n ohjeasiakirjaa ”OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” (22) (vaikeasti testattavien aineiden ja seosten vesiympäristölle myrkyllisyyden testaus). Liuottimen valinta määräytyy kemikaalin kemiallisten ominaisuuksien perusteella. OECD:n ohjeasiakirjassa enimmäispitoisuudeksi suositellaan 100 µl/l, mikä tulee ottaa huomioon. Hiljattain julkaistussa katsauksessa (23) kuitenkin korostettiin lisähuolenaiheita, joita syntyy, kun hormonijärjestelmään kohdistuvia vaikutuksia testattaessa käytetään liuottimia. Sen vuoksi on suositeltavaa, että liuottimen pitoisuus pidetään tarvittaessa mahdollisimman pienenä, jos se on teknisesti toteutettavissa (testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan).

16. Testissä käytetään läpivirtaustestijärjestelmää. Tällainen järjestelmä annostelee ja laimentaa testiaineen varastoliuosta jatkuvasti (esimerkiksi annostelupumpulla, laimentimella, kyllästävällä järjestelmällä) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saa vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Heikkolaatuisten muoviletkujen tai muiden sellaisten materiaalien, jotka saattavat sisältää biologisesti aktiivisia kemikaaleja, käyttämistä on pyrittävä välttämään. Kun valitaan materiaalia läpivirtausjärjestelmään, testikemikaalin mahdollinen imeytyminen tähän materiaaliin on otettava huomioon.

Kalojen hoito

17. Testikalat on valittava yhdestä laboratoriopopulaatiosta, mieluiten samasta poikueesta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuisessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä. On tärkeää, että kalojen lastaustiheys ja varastotiheys (ks. määritelmät lisäyksestä 1) ovat asianmukaiset käytettyjen testilajien kannalta (ks. lisäys 2).

18. Kuolleiden kalojen määrä kirjataan 48 tunnin alkutotuttelun jälkeen, jonka jälkeen noudatetaan seuraavia periaatteita:

▼M6

— Jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa, koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on välillä 5–10 prosenttia populaatiosta, totuttautumista jatketaan seitsemän päivää lisää; jos kuolleisuus on yli 5 prosenttia näiden toisten seitsemän päivän aikana, koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on alle 5 prosenttia populaatiosta seitsemän vuorokauden aikana, koko erä hyväksytään.

19. Kalat eivät saa saada hoitoa sairauteen totuttelujakson, esialtistusjakson tai altistusjakson aikana.

Esialtistus ja kalojen valinta

20. Yhden viikon esialtistusjakso on suositeltavaa, ja siinä eläimet sijoitetaan samanlaisiin astioihin kuin varsinaisessa testissä. Kaloja on ruokittava *ad libitum* koko hoitojakson ja altistusjakson ajan. Altistusjakso aloitetaan lisääntymiskypsiin koe-eläimiin kuuluvalla dimorfisella aikuisella kalalla (ts. jonka sekundaariset sukupuoliominaisuudet ovat rasvapäämutulla ja medakalla selvästi näkyvillä), joka kutee aktiivisesti. Rasvapäämutujen osalta yleinen ohje (jonka lisäksi on tarkkailtava tietyn kalaerän varsinaista lisääntymistilaa) on se, että niiden iän on oltava 20 (± 2) viikkoa, kun oletetaan, että niitä on kasvatettu 25 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan. Medakojen iän on oltava 16 (± 2) viikkoa, kun oletetaan, että niitä on kasvatettu 25 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan. Seeprakalojen iän on oltava 16 (± 2) viikkoa, kun oletetaan, että niitä on kasvatettu 26 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan.

TESTISUUNNITELMA

21. Testissä käytetään kolmea pitoisuutta testikemikaalista, yhtä kontrollia (vettä) ja tarvittaessa yhtä liuotinkontrollia. Tiedot voidaan analysoida käsittely- ja kontrollivasteiden välisten, tilastollisesti merkitsevien erojen määrittämiseksi. Näistä analyyseista saadaan tietoa siitä, onko kemikaalin pidempiaikainen lisätestaus haittavaikutusten osalta (eloonjääminen, kehitys, kasvu ja lisääntyminen) tarpeen sen sijaan, että näitä tietoja käytettäisiin riskinarvioinnissa (24).

22. Kokeen päivänä 21 kummankin käsittelytason (viisi koirasta ja viisi naarasta kummassakin rinnakkaisnäytteessä) seeprakala- ja medakakoirailta ja -naarailta ja verrokkiryhmän (-ryhmien) kaloilta otetaan näytteet vitellogeniinin ja sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien mittaamista varten, mikäli tarpeen. Kokeen päivänä 21 rasvapäämutukoirailta ja -naarailta (kaksi koirasta ja neljä naarasta kaikissa neljässä rinnakkaisnäytteessä) ja verrokkiryhmän (-ryhmien) kaloilta otetaan näytteet vitellogeniinin ja sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien mittaamista varten.

Testipitoisuuksien valinta

23. Tässä testissä suurimmaksi testipitoisuudeksi on valittava annostason määrittämistutkimuksista tai muista myrkyllisyystiedoista saatu suurin siedetty pitoisuus (MTC-arvo), tai 10 mg/l tai enimmäisliukoisuus vedessä sen mukaan, mikä arvo on pienin. MTC-arvo on kemikaalin suurin testauspitoisuus, jonka aiheuttama kuolleisuus on alle 10 prosenttia. Tässä lähestymistavassa oletetaan, että käytettävissä on empiiristä tietoa välittömästä myrkyllisyydestä tai muita myrkyllisyystietoja, joiden perusteella MTC-arvo voidaan arvioida. MTC-arvon arviointi voi olla epätarkkaa, ja siinä tarvitaan yleensä asiantuntijan näkemystä.

▼M6

24. Testissä tarvitaan siis kolme testipitoisuutta, pitoisuusvälin vakiokerroin, joka saa olla enintään 10, sekä laimennusvesikontrolli (ja tarvittaessa liuotinkontrolli). Pitoisuusvälin kertoimen vaihteluvälin suositellaan olevan 3,2–10.

MENETTELY

Kalojen valinta ja punnitus

25. On tärkeää minimoida kalojen painon vaihtelu testin alussa. Lisäyksessä 2 mainitaan, minkälainen kokovaihtelu sopii tähän testiin suositelluille eri lajeille. Testissä käytetyssä koko kalaerässä koiras- ja naaraskalojen yksilöllisten painojen vaihteluväli testin alussa tulee mahdollisuuksien mukaan pitää ± 20 prosentissa saman sukupuolen painon aritmeettisesta keskiarvosta. Suositellaan, että osa erän kaloista punnitaan keskimääräisen painon arvioimiseksi.

Altistumisolosuhteet

Kesto

26. Testi kestää 21 päivää esialtistusjakson jälkeen. Suositeltu esialtistusjakso on yksi viikko.

Ruokinta

27. Kaloja on ruokittava *ad libitum* sopivalla ravinnolla (lisäys 2) riittävän usein, jotta ne pysyvät hyvässä kunnossa. On varottava, ettei vedessä kasva mikrobeja eikä se samennu. Yleisohjeena mainittakoon, että päivittäinen annos voidaan jakaa kahteen tai kolmeen yhtä suureen annokseen, kun ruokintakertoja on useampia päivässä, ja ruokintakertojen välillä on oltava vähintään kolme tuntia aikaa. Suurempi kerta-annos on hyväksyttävää antaa etenkin viikonloppuisin. Kalat on pidettävä ravinnotta 12 tuntia ennen näytteenottoa/ruumiinavausta.

28. Kalanruoka on tarkastettava mahdollisten kontaminanttien, kuten orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden, polysyklisten aromaattisten hiilivetyjen (PAH-yhdisteiden) ja polykloorattujen bifenyylien (PCB-yhdisteiden) varalta. Paljon fytoestrogeeneja sisältävää ruokaa on vältettävä, koska se heikentää testivastetta tunnetulle estrogeeniagonistille (ts. 17-beetaestradiolille).

29. Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet on poistettava testiastioista vähintään kaksi kertaa viikossa; kunkin säiliön pohja on esimerkiksi puhdistettava huolellisesti käyttämällä lappoa.

Valo ja lämpötila

30. Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan pitää olla sopivia käytetylle testilajille (lisäys 2).

Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus

31. Ennen altistusjakson aloittamista on varmistettava, että kemikaalin annostelujärjestelmä toimii asianmukaisesti. Kaikki analyysimenetelmät on määritettävä, ja kemiallisesta stabiiliudesta testijärjestelmässä on oltava riittävästi tietoa. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin seuraavasti: laimentimen ja myrkyllisen aineen varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava mieluiten päivittäin mutta vähintään kahdesti viikossa, ja ne saavat vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Varsinaiset testikemikaalin pitoisuudet suositellaan mitattavan kaikista astioista testin alussa ja sen jälkeen viikon välein.

32. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testiaineen pitoisuus pysyy kuitenkin tyydyttävästi 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia.

33. Näytteet on mahdollisesti suodatettava (esim. 0,45 μm:n huokoskoon suotimella) tai sentrifugoitava. Mikäli se on tarpeen, sentrifugointi on suositeltava menetelmä. Jos testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää.

▼M6

34. Testin aikana kaikista testiastioista on mitattava liuennut happi, lämpötila ja pH vähintään kerran viikossa. Kokonaiskovuus ja alkalisuus on mitattava kontrolleista ja suurimman pitoisuuden astiasta vähintään kerran viikossa. Lämpötilaa olisi mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

Havainnot

35. Monia yleisiä (esimerkiksi eloonjääneisyyttä) ja keskeisiä biologisia vasteita (kuten vitellogeniiniarvot) arvioidaan testin kuluessa tai sen päättyessä. Näiden ominaisuuksien mittaamista ja arviointia sekä tulosten käyttökelpoisuutta kuvataan jäljempänä.

Eloonjääneisyys

36. Kalat on tutkittava päivittäin testijakson aikana. Kuolleisuus on kirjattava ja kuolleet kalat on poistettava testiastiasta mahdollisimman pian. Kuolleiden kalojen tilalle ei tule vaihtaa eläviä sen pikemmin kontrolli- kuin käsittelyastioihinkaan. Testin aikana kuolleiden kalojen sukupuoli on määritettävä sukupuolirauhasten makroskooppisella tutkimuksella.

Käyttäytyminen ja ulkonäkö

37. Kaikenlainen poikkeava käyttäytyminen (kontrolleihin nähden) on kirjattava muistiin. Siitä osoituksena voivat olla yleisen myrkyllisyyden merkit, kuten hyperventilaatio, koordinoimaton uinti, tasapainon menetys sekä epätyypillinen liikkumattomuus tai syöminen. Myös muut ulkoiset poikkeavuudet (kuten verenvuoto tai värimuutokset) on merkittävä muistiin. Tällaisia myrkyllisyyden merkkejä on tulkittava varovasti tietoja analysoitaessa, koska ne voivat viitata pitoisuuksiin, joiden yhteydessä hormonijärjestelmään kohdistuviin vaikutuksiin liittyvät biomarkkerit eivät ole luotettavia. Näistä käyttäytymiseen liittyvistä havainnoista voidaan saada myös hyödyllistä laadullista tietoa mahdollisista tulevista kaloilla testausta koskevista vaatimuksista. Esimerkiksi rasvapäämutuilla on havaittu androgeenialtistuksen yhteydessä reviiriin liittyvää aggressiivisuutta normaaleilla koirailla tai maskulinisoituneilla naarailla, kun taas seeprakaloilla estrogeeni- tai antiandrogeenialtistuksen on havaittu vähentävän lajityypillistä parittelu- ja kutemiskäyttäytymistä tai estävän sen keinovalon syttyessä.

38. Koska jotkin ulkonäköön liittyvät seikat (pääasiassa väri) voivat muuttua nopeasti käsittelyn yhteydessä, on tärkeää, että laadulliset havainnot tehdään ennen kuin eläimet poistetaan testijärjestelmästä. Rasvapäämutuista tähän saakka karttunut kokemus viittaa siihen, että jotkin hormonijärjestelmään vaikuttavat kemikaalit voivat aluksi aiheuttaa muutoksia seuraavissa ulkoisissa ominaisuuksissa: kalan väri (vaalea tai tumma), värityksen kuviot (pystysuorien raitojen ilmaantuminen) ja kalan muoto (pään ja rinnan alue). Sen vuoksi kalan fyysisestä ulkonäöstä on tehtävä havaintoja testin kuluessa ja tutkimuksen päättyessä.

Kalojen lopettaminen inhimillisesti

39. Päivänä 21 eli altistuksen päättyessä kalat on lopetettava tarkoituksenmukaisella määrällä trikaiinia (trikaiinimetaanisulfonaatti, Metacain MS-222 (CAS 886-86-2), 100–500 mg/l, puskuroitu 300 mg/l:n vahvuisella $NaHCO_3$:lla (natriumbikarbonaatti, CAS 144-55-8), limakalvoärsytyksen vähentämiseksi. Sen jälkeen kaloilta otetaan veri- tai kudosnäytteet vitellogeniinimääritystä varten, kuten vitellogeniinia koskevassa kohdassa on selitetty.

▼**M6**

Sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien havainnointi

40. Jotkin hormonijärjestelmään vaikuttavat kemikaalit voivat aiheuttaa muutoksia tietyissä erikoistuneissa sekundaarisissa sukupuoliominaisuuksissa (kutukyhmyjen lukumäärä rasvapäämutukoirailla ja sukuelinpapillien lukumäärä medakakoirailla). Tämä johtuu siitä, että kemikaalit, joilla on tiettyjä vaikutustapoja, voivat aiheuttaa sen, että vastakkaisen sukupuolen eläimillä esiintyy sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Esimerkiksi androgeenireseptorin agonistit, kuten trenboloni, metyylitestosteroni ja dihydrotestosteroni, voivat aiheuttaa korostuneiden kutukyhmyjen kehittymisen rasvapäämutunaaraille tai sukuelinpapillien kehittymisen medakanaaraille (11, 20, 21). On myös raportoitu, että estrogeenireseptorin antagonistit saattavat vähentää kutukyhmyjen määrää ja pienentää selänpuoleista niskakyhmyä aikuisilla koirailla (25, 26). Näistä morfologisista havainnoista voidaan saada myös hyödyllistä laadullista ja määrällistä tietoa mahdollisista tulevista kaloilla testausta koskevista vaatimuksista. Rasvapäämutun kutukyhmyjen ja medakan sukuelinpapillien lukumäärä ja koko voidaan määrittää suoraan tai käytännöllisemmin preparoiduilta yksilöiltä. Suositellut menetelmät rasvapäämutun ja medakan sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien arvioimiseen on esitetty lisäyksessä 5A ja lisäyksessä 5B.

Vitellogeniini (VTG)

41. Verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriitti-kapillaariputkeen tai vaihtoehtoisesti sydänpunktiolla, joka tehdään ruiskulla. Kerättävän veren määrä vaihtelee kalan koon mukaan yleensä välillä 5–60 µl rasvapäämutuyksilöä kohti ja välillä 5–15 µl seeprakalayksilöä kohti. Plasma erotetaan verestä sentrifugoimalla, ja sitä säilytetään proteaasin estäjien kanssa – 80 °C:ssa vitellogeniinin analysointiin saakka. Toinen vaihtoehto on se, että vitellogeniinin määrityksen kudoslähteenä käytetään medakan maksaa ja seeprakalan pää-/pyrstöhomogenaattia (lisäys 6). Vitellogeniinin mittauksen on perustuttava validoituun yhdenmukaiseen ELISA-menetelmään, jossa käytetään yhdenmukaista vitellogeniinistandardia ja yhdenmukaisia vasta-aineita. On suositeltavaa käyttää sellaista menetelmää, jolla pystytään havaitsemaan jopa niin pieniä vitellogeniinipitoisuuksia kuin vain muutama ng/ml plasmassa (tai ng/mg kudoksessa), mitä pidetään altistumattomien koiraskalojen taustapitoisuutena.

42. Vitellogeniinianalyysin laatu varmistetaan käyttämällä standardeja, nollakokeita ja vähintään kaksinkertaista analyysia. Jokaisen ELISA-menetelmän yhteydessä on tehtävä matriisivaikutustesti (vaikutus näytteen laimentumiseen), jotta voidaan määrittää näytteen vähimmäislaimennuskerroin. Kuhunkin vitellogeniinianalyysissa käytettävään ELISA-levyyn tulee sisältyä seuraavat kontrollinäytteet: vähintään kuusi kalibrointistandardia, jotka kattavat odotettujen vitellogeniinipitoisuuksien vaihteluvälin, ja vähintään yksi ei-spesifinen sitoutumismääritys -nollakoe (kaksinkertainen analyysi). Näissä nollakokeissa absorbanssin tulee olla alle viisi prosenttia kalibrointistandardin enimmäisabsorbanssista. Jokaisesta näytelaimennoksesta analysoidaan vähintään kaksi alikvoottia (kaksi rinnakkaiskuoppaa). Rinnakkaiskuopat, joiden arvot eroavat toisistaan yli 20 prosenttia, on analysoitava uudelleen.

43. Kalibrointikäyrien korrelaatiokertoimen (R^2) on oltava yli 0,99. Suuri korrelaatio ei kuitenkaan yksinään riitä takaamaan pitoisuuden asianmukaista ennustamista kaikissa vaihteluväleissä. Sen lisäksi, että korrelaatio kalibrointikäyrään on riittävän suuri, kunkin standardin pitoisuus – kalibrointikäyrästä laskettuna – on asetuttava välille 70–120 prosenttia sen nimellispitoisuudesta. Jos nimellispitoisuuksissa on havaittavissa kalibroinnin regressiolinjasta poispäin suuntautuva trendi (esimerkiksi pienemmillä pitoisuuksilla), voi olla tarpeen jakaa kalibrointikäyrä alempaan ja ylempään vaihteluväliin

▼M6

tai käyttää epälineaarista mallia, jotta absorbanssitiedot saadaan sovitettua asianmukaisesti. Jos käyrä jaetaan, kummankin linjan segmentin R^2 on oltava > 0,99.

44. Havaitsemisrajaksi (LOD) määritetään pienimmän määritysstandardin pitoisuus, ja määritysrajaksi (LOQ) määritetään pienimmän määritysstandardin pitoisuus kerrottuna pienimmällä laimennuskertoimella.

45. Niinä päivinä, kun tehdään vitellogeniinimäärityksiä, analysoidaan myös rikastusnäyte käyttämällä määritysten välistä vertailuainetta (lisäys 7). Odotuksenmukaisen pitoisuuden ja mitatun pitoisuuden välinen suhde ilmoitetaan kyseisenä päivänä tehtyjen määritysten tulosten mukana.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Biomarkkerivasteiden arviointi varianssianalyysilla (ANOVA)

46. Jotta voidaan tunnistaa kemikaalin mahdollinen hormonijärjestelmään kohdistuva vaikutus, käsittely- ja kontrolliryhmien vasteita verrataan käyttämällä varianssianalyysia (ANOVA). Jos käytetään liuotinkontrollia, on tehtävä asianmukainen tilastollinen testi laimennusvesi- ja liuotinkontrollien välillä kunkin tutkittavan ominaisuuden osalta. Ohjeita siitä, miten laimennusvesi- ja liuotinkontrolleja koskevia tietoja käsitellään tilastollisessa analyysissa, on OECD:n asiakirjassa 2006c (27). Kaikki tiedot biologisesta vasteesta on analysoitava ja raportoitava kummastakin sukupuolesta erikseen. Jos parametristen menetelmien edellyttämät vaatimukset eivät täyty – epänormaali jakauma (esimerkiksi Shapiro-Wilkin testi) tai heterogeeninen varianssi (Bartlettin testi tai Levenen testi) – on harkittava mittaustulosten muuntamista varianssien homogenisoimiseksi ennen ANOVA-analyysiä tai painotetun ANOVAn tekemistä. Monivertailuihin liittyvää Dunnettin testiä (parametrinen) tai Mann-Whitneyn testiä ja Bonferronin korjausta (ei-parametrinen) voidaan käyttää ei-monotonisten annosvasteiden yhteydessä. Muita tilastollisia testejä voidaan käyttää (esimerkiksi Jonckheere-Terpstran testi tai Williamsin testi), jos annosvaste on jotakuinkin monotoninen. Lisäyksessä 8 on tilastollinen vuokaavio, joka on tarkoitettu avuksi, kun päätetään, mikä on tarkoituksenmukaisin tilastollinen testi käytettäväksi. Lisätietoja on myös OECD:n asiakirjassa ”Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (27) (ekotoksisuustietojen tilastollisessa analyysissa sovellettavia nykyisiä lähestymistapoja koskeva asiakirja).

Testitulosten raportointi

47. Tutkimustietojen tulee sisältää seuraavat seikat:

Testauslaitos:

— Vastuuhenkilöt ja heidän tutkimukselliset vastuualueensa

— Jokaisen laboratorion on täytynyt osoittaa pätevyytensä käyttää monenlaisia edustavia kemikaaleja

Testikemikaali:

— Testikemikaalin luonnehdinta

— Fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

▼**M6**

— Testipitoisuuksien valmistuksen menetelmä ja yleisyys

— Tiedot stabiiliudesta ja biohajoavuudesta

Liuotin:

— Liuottimen luonnehdinta (tyyppi, käytetty pitoisuus)

— Liuottimen valinnan perustelut (jos se on muu kuin vesi)

Koe-eläimet:

— Laji ja kanta

— Toimittaja ja sen toimipaikka

— Kalan ikä testin alussa ja sen lisääntymis-/kututila

— Tarkat tiedot eläinten totuttelumenetelmästä

— Kalan paino altistuksen alussa (kalaerän osan punnituksen perusteella)

Koeolosuhteet:

— Käytettävä testimenetelmä (testin tyyppi, kalojen lastaustiheys, varastotiheys jne.)

— Varastoliuosten valmistelumenetelmä ja virtausnopeus

— Nimellistestipitoisuudet, testiliuosten viikoittain mitatut pitoisuudet ja käytetyt analyysimenetelmät, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat testiastioissa ja todisteet siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuuksia todellisessa liuoksessa

— Laimennusveden ominaisuudet (mukaan luettuina pH, kovuus, alkalisuus, lämpötila, liuennen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet, orgaanisen hiilen kokonaismäärä, suspendoituneet kiinteät aineet ja muut tehdyt mittaukset)

— Testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus

— Tarkat tiedot ruokinnasta (esimerkiksi ruoan (ruokien) tyyppi, lähde, annettu määrä ja antotiheys) sekä analyysit merkittävistä kontaminanteista, mikäli saatavilla (esimerkiksi PCB-yhdisteet, PAH-yhdisteet ja orgaanista klooria sisältävät torjunta-aineet)

Tulokset

— Todisteet siitä, että kontrollit täyttävät testin hyväksyttävyyskriteerit

— Tiedot testipitoisuuksiin ja kontrolleihin liittyvistä kuolemista

— Käytetyt tilastolliset analyysitekniikat, aineiston käsittely ja käytettyjen tekniikoiden perustelut

— Tiedot selvistä morfologiaa koskevista biologisista havainnoista, mukaan luettuina sekundaariset sukupuolio minaisuudet ja vitellogeniini

▼**M6**

— Tulokset aineiston analyyseista mieluiten taulukkoina ja graafisessa muodossa

— Tiedot kalojen mahdollisista epätavallisista reaktioista ja testikemikaalin aiheuttamista mahdollisista näkyvistä vaikutuksista

TESTITULOSTEN TULKINTAA JA HYVÄKSYMISTÄ KOSKEVAT OHJEET

48. Tämä kohta sisältää joitakin seikkoja, jotka on otettava huomioon eri mitattuja ominaisuuksia koskevia testituloksia tulkittaessa. Tuloksia on tulkittava varoen, jos testikemikaali vaikuttaa aiheuttavan liiallista myrkyllisyyttä tai vaikuttavan koe-eläimen yleiskuntoon.

49. Testipitoisuuksien vaihteluvälin asettamisessa on varottava ylittämästä suurinta siedettyä pitoisuutta, jotta aineiston järkevä tulkinta on mahdollista. On tärkeää, että testissä on vähintään yksi käsittely, jossa ei ilmene merkkejä myrkyllisistä vaikutuksista. Sairauden ja myrkyllisten vaikutusten merkit on arvioitava ja raportoitava perinpohjaisesti. On kuitenkin mahdollista, että naarailla vitellogeniinin tuotantoon voivat vaikuttaa myös yleinen myrkyllisyys ja muuhun kuin hormonijärjestelmään kohdistuvat myrkylliset vaikutustavat (esimerkiksi hepatotoksisuus). Vaikutusten tulkintaa voidaan kuitenkin vahvistaa muilta käsittelytasoilta saaduilla tuloksilla, joita ei voida perustella systeemisellä myrkyllisyydellä.

50. Testituloksen hyväksyttävyyden kannalta on niin ikään otettava huomioon muutamia seikkoja. Perusohje on se, että kontrolliryhmien koiraiden ja naaraiden vitellogeniinipitoisuudet on esitettävä selvästi. Rasvapäämutulta ja seeprakalalta ne on eriteltävä noin kolmeen suuruusluokkaan ja medakalta noin yhteen suuruusluokkaan. Esimerkkejä kontrolli- ja käsittelyryhmistä saatujen arvojen vaihteluvälistä on validaatioraporteissa (1, 2, 3, 4). Kontrolliryhmän koirailla tavatut suuret vitellogeniiniarvot voivat heikentää testin herkkyyttä ja sen kykyä havaita heikkoja estrogeeniagonisteja. Kontrolliryhmän naarailla tavatut pienet vitellogeniiniarvot voivat niin ikään heikentää testin herkkyyttä ja sen kykyä havaita aromataasin estäjiä ja estrogeeniantagonisteja. Nämä ohjeet laadittiin validointitutkimusten perusteella.

51. Jos laboratorio ei ole tehnyt määritystä aikaisemmin tai jos on tehty huomattavia muutoksia (esimerkiksi kalakannan tai toimittajan vaihto), on syytä tehdä tekninen pätevyystutkimus. On suositeltavaa, että siinä käytetään kemikaaleja, joilla on monenlaisia vaikutustapoja tai jotka vaikuttavat lukuisiin testissä tutkittaviin ominaisuuksiin. Käytännössä jokaista laboratoriota kehotetaan keräämään omat historialliset kontrollitiedot koiraista ja naaraista sekä käyttämään positiivista kontrollikemikaalia estrogeeniaktiivisuuden osalta (esimerkiksi 17β-estradioli pitoisuudella 100 ng/l tai tunnettu heikko agonisti), jolloin koiraskalojen vitellogeniinipitoisuus kasvaa, positiivista kontrollikemikaalia aromataasin eston osalta (esimerkiksi fadrotsoli tai prokloratsi pitoisuudella 300 µg/l), jolloin naaraskalojen vitellogeniinipitoisuus pienenee, ja positiivista kontrollikemikaalia androgeeniaktiivisuuden osalta (esimerkiksi 17β-trenboloni pitoisuudella 5 µg/l), jolloin rasvapäämutu- ja medakanaaraille alkaa kehittyä sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Kaikkia näitä tietoja voidaan verrata validointitutkimuksista (1, 2, 3) saatuihin tietoihin, jotta laboratorion pätevyys saadaan varmistettua.

52. Yleensä vitellogeniinimittauksia tulee pitää positiivisina, jos koiraiden vitellogeniinipitoisuus lisääntyy tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,05$), tai jos naaraiden vitellogeniinipitoisuus vähenee tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,05$) ainakin suurimman testatun annoksen yhteydessä kontrolliryhmään verrattuna, ja jos merkkejä yleisestä myrkyllisyydestä ei ole. Positiivista tulosta tukee myös se, että annoksen ja vastekäyrän välillä voidaan osoittaa olevan biologisesti todennäköinen suhde. Kuten aiemmin on mainittu, vitellogeniinin vähentyminen ei välttämättä johdu pelkästään hormonijärjestelmästä, mutta positiivinen tulos on yleensä kuitenkin tulkittava todisteeksi hormonijärjestelmään kohdistuvasta vaikutuksesta *in vivo,* minkä perusteella tulisi ryhtyä toimiin lisäselvyyden saamiseksi.

▼**M6**

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OECD (2007). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Vaihe 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (viitattu 18.9.2008).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173–178 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277–91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3–4):343–52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences;67(1):121–30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11–21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113–25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Pakoll. Biochem. Phys. C 129 (3): 217–232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119–131.

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17β-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Pakoll. Biochem. Physiol. C. 131: 531–539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699–1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301–308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350–60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774–81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris.

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Tarkistus. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as ”signposts,” not ”traffic lights,” in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106–14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Meth. 47, 129–145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Health Perspect. Meth. Toxicol. 27, 478–488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18.

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22.

▼**M6**

Lisäys 1

Lyhenteet ja määritelmät

Kemikaali: aine tai seos.

CV: variaatiokerroin.

ELISA: entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys.

Täyttöaste: kalojen märkäpaino tilavuusyksikköä kohti.

Varastotiheys: kalojen lukumäärä tilavuusyksikköä kohti.

VTG (vitellogeniini): fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisen esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

HPG-akseli: hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli.

MTC: suurin siedetty pitoisuus, noin 10 prosenttia LC_{50}-arvosta.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼**M6**

Lisäys 2

Kalojen hormonijärjestelmään kohdistuvan seulontatutkimuksen koeolosuhteet

1. Suositeltu laji	**Rasvapäämutu** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Seeprakala** (*Danio rerio*)
2. Testityyppi	Läpivirtaus	Läpivirtaus	Läpivirtaus
3. Veden lämpötila	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Valaistus	Loistelamppu (laajakirjoinen)	Loistelamppu (laajakirjoinen)	Loistelamppu (laajakirjoinen)
5. Valovoima	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)
6. Valoisa aika (valoisan ja pimeän väliset siirtymät valinnaisia, niitä ei kuitenkaan pidetä tarpeellisina)	16 h valoisaa, 8 h pimeää	12–16 h valoisaa, 8 h pimeää	12–16 h valoisaa, 8 h pimeää
7. Lastaustiheys	< 5 g litraa kohti	< 5 g litraa kohti	< 5 g litraa kohti
8. Testiastian koko	10 l (vähintään)	2 l (vähintään)	5 l (vähintään)
9. Testiliuoksen tilavuus	8 l (vähintään)	1,5 l (vähintään)	4 l (vähintään)
10. Testiliuosten tilavuuden muutokset	Vähintään kuusi päivässä	Vähintään viisi päivässä	Vähintään viisi päivässä
11. Testiorganismien ikä	Katso edellä kohta 20.	Katso edellä kohta 20.	Katso edellä kohta 20.
12. Täysikasvuisen kalan arvioitu märkäpaino (g)	Naaraat: 1,5 ± 20 % Koiraat: 2,5 ± 20 %	Naaraat: 0,35 ± 20 % Koiraat: 0,35 ± 20 %	Naaraat: 0,65 ± 20 % Koiraat: 0,4 ± 20 %
13. Kalojen lkm. testiastiaa kohti	6 (2 koirasta ja 4 naarasta)	10 (5 koirasta ja 5 naarasta)	10 (5 koirasta ja 5 naarasta)
14. Käsittelyjen lkm.	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)
15. Astioiden lkm. käsittelyä kohti	Vähintään 4	Vähintään 2	Vähintään 2
16. Kalojen lkm. testipitoisuutta kohti	16 täysikasvuista naarasta ja 8 koirasta (4 naarasta ja 2 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa)	10 täysikasvuista naarasta ja 10 koirasta (5 naarasta ja 5 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa)	10 täysikasvuista naarasta ja 10 koirasta (5 naarasta ja 5 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyte-astiassa)
17. Ruokinta	Eläviä tai pakastettuja täysikasvuisia suolalehtijalkaisia tai niiden nauplius-toukkia 2–3 kertaa päivässä (ad libitum), kaupallisesti saatavaa ruokaa tai edellisten yhdistelmä	Suolalehtijalkaisia tai niiden nauplius-toukkia 2–3 kertaa päivässä (ad libitum), kaupallisesti saatavaa ruokaa tai edellisten yhdistelmä	Suolalehtijalkaisia tai niiden nauplius-toukkia 2–3 kertaa päivässä (ad libitum), kaupallisesti saatavaa ruokaa tai edellisten yhdistelmä

▼**M6**

18. Ilmastus	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta
19. Laimennusvesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi
20. Esialtistusjakso	Suositus 7 päivää	Suositus 7 päivää	Suositus 7 päivää
21. Kemikaalialtistuksen kesto	21 pv	21 pv	21 pv
22. Biologiset ominaisuudet	eloonjääneisyys käyttäytyminen sekundaariset sukupuoliominaisuudet VTG	eloonjääneisyys käyttäytyminen sekundaariset sukupuoliominaisuudet VTG	eloonjääneisyys käyttäytyminen VTG
23. Testin hyväksyttävyys	Liuennut happi >60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 25 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.	Liuennut happi >60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 24 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.	Liuennut happi >60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 26 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.

▼**M6**

Lisäys 3

Joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia

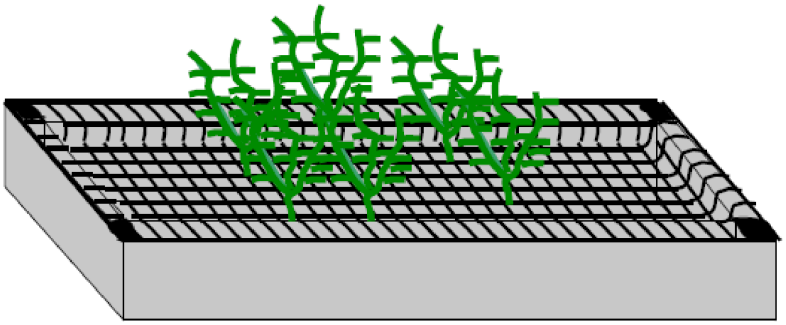
Osatekijä	Pitoisuudet
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼M6

Lisäys 4A

Seeprakalojen kutualusta

Kutulevy: Lasinen instrumenttitarjotin (koko esimerkiksi 22 × 15 × 15,5 cm (p × l × s)), jonka päällä irrotettava ruostumaton teräsristikko (silmäkoko 2 mm). Ristikon tulee peittää instrumenttitarjotin hieman reunojen alapuolelta.



Kutualusta on kiinnitettävä ristikkoon. Siitä on muodostuttava rakenne, johon kalat voivat siirtyä. Sopivia rakenteita ovat esimerkiksi vihreästä muovimateriaalista valmistetut keinotekoiset akvaariokasvit (huom. testikemikaalin adsorptoituminen muovimateriaaliin on muistettava ottaa huomioon). Muovimateriaalia on huuhdeltava runsaassa lämpimässä vedessä riittävän kauan, jotta varmistetaan, ettei testiveteen joudu kemikaaleja. Lasimateriaaleja käytettäessä on varmistettava, etteivät kalat vahingoitu ja että niillä on riittävästi tilaa rajuihinkin liikkeisiin.

Tarjottimen ja lasilevyjen välisen etäisyyden on oltava vähintään kolme senttimetriä sen varmistamiseksi, ettei kuteminen tapahdu tarjottimen ulkopuolella. Tarjottimelle lasketut mätimunat putoavat ristikon läpi, ja ne voidaan kerätä näytteenottoa varten 45–60 minuutin kuluttua valojen sytyttämisestä. Läpinäkyvät mätimunat eivät ole tahmeita, ja ne on helppo laskea poikittaisvalossa. Kun astiassa on viisi naarasta, kahtakymmentä munaa päivässä voidaan pitää pienenä määränä, sataa munaa kohtalaisena määränä ja yli sataa munaa suurena määränä. Kutualusta on poistettava astiasta ja munat on kerättävä joko mahdollisimman myöhään illalla tai varhain aamulla, ja alusta on laitettava sen jälkeen takaisin testiastiaan. Alusta on laitettava takaisin astiaan tunnin kuluessa sen poisottamisesta, sillä muutoin kutualusta saattaa houkutella kalat parittelemaan tai kutemaan yksilöllisesti epätavallisiin aikoihin. Jos tilanne vaatii kutualustan laittamista takaisin myöhemmin, se on tehtävä vähintään yhdeksän tunnin kuluttua valojen sytyttämisestä. Niin myöhäiseen vuorokaudenaikaan se ei aiheuta enää kutemista.

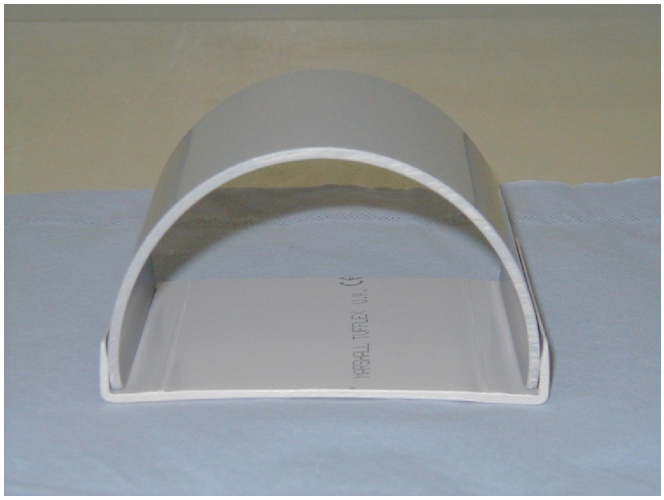
▼**M6**

Lisäys 4B

Rasvapäämutun kutualusta

Jokaiseen testiastiaan asetetaan kaksi tai kolme muovista/keramiikasta/lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettua kutulaattaa ja -levyä (esimerkiksi 80 mm pitkä harmaa puoliympyrän muotoinen katos 130 mm pitkän huulletun levyn päälle) (ks. kuva). Asianmukaisesti katetut PVC- tai keramiikkalaatat ovat osoittautuneet sopiviksi kutualustoiksi (Thorpe *et al.*, 2007).

Laattoja kannattaa karhentaa hieman, jotta munat kiinnittyvät niihin paremmin. Tarjotin on suojattava siten, etteivät kalat pääse laskettujen mätimunien luokse, ellei ole osoitettu, että munat kiinnittyvät käytettyyn alustaan pitävästi.



Pohja on suunniteltu siten, että kaikki munat, jotka eivät kiinnity laatan pintaan, putoavat astian pohjalle (tai ne munat, jotka lasketaan suoraan sileälle muovipinnalle). Kaikkia kutualustoja on huuhdeltava vähintään 12 tuntia laimennusvedessä ennen käyttöä.

VIITTEET

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

Lisäys 5A

Rasvapäämutun sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien arviointi tiettyjen hormonijärjestelmään vaikuttavien kemikaalien havaitsemiseksi

Yleistä

Täysikasvuisilla rasvapäämutuilla mahdollisesti tärkeitä fyysiseen ulkonäköön liittyviä piirteitä hormonitoimintaa häiritseviä aineita testattaessa ovat väri (vaalea/tumma), värityskuviot (onko esimerkiksi pystysuoria raitoja vai ei), kalan muoto (pään ja rinnan alueen muoto, vatsan pullistuneisuus) sekä erikoistuneet sekundaariset sukupuoliominaisuudet (kutukyhmyjen lukumäärä ja koko, niskakyhmyn koko, munanasetin).

Kutukyhmyt sijaitsevat sukukypsien rasvapäämutukoiraiden päässä (niskakyhmy), ja ne ovat useimmiten järjestäytyneet molemmin puolin symmetriseksi kuvioksi (Jensen et al. 2001). Kontrollinaarailla sekä nuorilla koirailla ja naarailla kyhmyt eivät ole kehittyneet (Jensen et al. 2001). Koiraiden silmien ympärillä ja sierainten välissä voi olla jopa kahdeksan yksittäistä kyhmyä. Eniten kyhmyjä on kahdella samansuuntaisella viivalla heti sierainten alapuolella ja suun yläpuolella, ja ne ovat myös suurimpia kyhmyjä. Monilla kaloilla kyhmyryhmiä on alaleuan alapuolella. Suuta lähimpänä sijaitsee yleensä yksittäinen kyhmypari, kun taas lähempänä vatsapuolta voi olla jopa neljästä kyhmystä muodostuvia sarjoja. Kyhmyjen todellinen määrä on harvoin yli 30 (vaihteluväli 18–28; Jensen et al. 2001). Useimmat kyhmyt (määrän kannalta) ovat yksittäisiä, pyöreähköjä rakenteita, joiden korkeus vastaa suurin piirtein niiden sädettä. Useimmilla sukukypsillä koirailla on ainakin joitakin kyhmyjä, jotka ovat siinä määrin laajentuneita ja korostuneita, ettei niistä voi erottaa yksittäisiä rakenteita.

Tietyntyyppiset hormonitoimintaa häiritsevät kemikaalit voivat aiheuttaa sen, että tiettyjä sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia alkaa esiintyä vastakkaisella sukupuolella. Esimerkiksi androgeenireseptorin agonistit, kuten 17β-metyylitestosteroni tai 17β-trenboloni, voivat aiheuttaa kutukyhmyjen kehittymisen rasvapäämutunaaraille (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), kun taas estrogeenireseptorin agonistit saattavat vähentää koiraiden kutukyhmyjen määrää tai pienentää niiden kokoa (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Jäljempänä on kuvaus rasvapäämutujen kutukyhmyjen luonnehdinnasta. Kuvaus perustuu menetelmiin, joita käytetään Yhdysvaltojen ympäristönsuojelulaboratoriossa (Duluth, MN). Tietyt tuotteet ja/tai laitteet voidaan korvata saatavilla olevilla samantyyppisillä materiaaleilla.

Kalojen tutkimisessa on parhainta käyttää valollista suurennuslasia tai valollista disksektiomikroskooppia (3X). Tutki kalaa selkäpuolelta ja etuosa eteenpäin (pää tutkijaa kohti).

a) Aseta kala pieneen petrimaljaan (halkaisija esimerkiksi 100 mm) etuosa eteenpäin ja vatsapuoli alaspäin. Tarkenna etsintä, jotta pystyt tunnistamaan kyhmyt. Käännä kalaa varovasti ja hitaasti puolelta toiselle kyhmyalueiden tunnistamiseksi. Laske ja pisteytä kyhmyt.

b) Tutki myös pään pinta vatsapuolelta asettamalla kala petrimaljaan selkäpuoli alaspäin etuosa eteenpäin.

c) Jokaisen kalan tutkimus tulisi saada tehtyä kahdessa minuutissa.

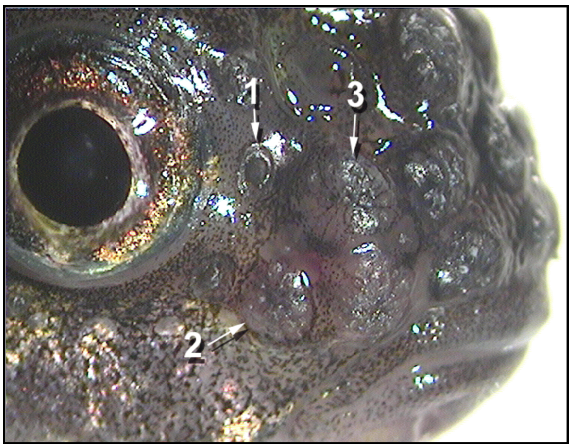
▼M6

Kyhmyjen laskeminen ja arviointi

Täysikasvuisilta rasvapäämutuilta on tunnistettu kuusi aluetta, joilta kyhmyjen esiintymistä ja kehittymistä voidaan arvioida. On laadittu myös malli, johon kyhmyjen sijainti ja lukumäärä voidaan merkitä (ks. tämän lisäyksen loppu). Kyhmyjen lukumäärä merkitään muistiin, ja niiden kokoa voidaan arvioida määrällisesti seuraavasti: 0 – ei kyhmyjä, 1 – kyhmyjä, 2 – laajentuneita kyhmyjä ja 3 – korostuneita kyhmyjä kunkin organismin osalta (kuva 1).

Luokka 0 – kyhmyjä ei ole. Luokka 1 – kyhmyjä: Tähän luokkaan kuuluvat kaikki kyhmyt, joissa on yksi piste, jonka korkeus on miltei sama kuin sen säde (halkaisija). Luokka 2 – laajentuneita kyhmyjä: Tähän luokkaan kuuluu sellainen kudos, jonka ulkonäkö muistuttaa asteriskia. Tällaisessa kyhmyssä on yleensä laaja säteittäinen pohja, jossa on keskeltä reunoille päin suuntautuvia uria tai vakoja. Kyhmyn korkeus on usein muita epätasaisempi, mutta joskus se voi olla myös hieman pyöristynyt. Luokka 3 – korostunut: Tähän luokkaan kuuluvat kyhmyt ovat tavallisesti varsin suuria ja pyöreitä, ja niiden rakenne on muita epäselvempi. Toisinaan tällaiset kyhmyt yhtyvät muodostaen yhtenäisen massan yhdelle alueelle tai useammalle alueelle (B, C ja D, kuvattu jäljempänä). Kyhmyjen väri ja muoto vastaavat luokkaa 2, mutta joskus ne ovat melko epämääräisiä. Tätä arviointimenetelmää käyttämällä kyhmyjen kokonaispistemäärä on yleensä < 50 normaalilla kontrollikoiraalla, jolla on 18–20 kutukyhmyä (Jensen et al. 2001).

Kuva 1



Joidenkin kalojen kutukyhmyjen todellinen määrä voi olla suurempi kuin mallin ruuduissa (lisäys A) tietyllä pisteytysalueella. Jos näin on, pisteytysnumeroita voi lisätä laatikon oikealle tai vasemmalle puolelle. Mallin ei siis tarvitse näyttää symmetriseltä. Toinen tapa merkitä muistiin parilliset kyhmyt tai sellaiset kyhmyt, jotka ovat yhtyneet pystysuunnassa yhteen suun vaakasuuntaista tasoa pitkin, on merkitä yhteen ruutuun kahdet arviointipisteet.

Merkitsemisalueet:

A – Silmän ympärillä sijaitsevat kyhmyt. Merkitään selkäpuolelta vatsan puolelle silmän etureunan ympäriltä. Sukukypsillä kontrollikoirailla näitä on tavallisesti useita; kontrollinaarailla näitä ei ole; androgeeneille altistuneilla naarailla on yleensä yksi pari kyhmyjä (yksi kummankin silmän lähellä) tai yksittäinen kyhmy.

B – Sierainten (aistikanavahuokosten) välissä sijaitsevat kyhmyt. Kontrollikoirailla yleensä parilliset, kehitys ylemmän luokituksen (2 – laajentuneet kyhmyt tai 3 – korostuneet kyhmyt) mukaan. Kontrollinaarailla näitä kyhmyjä ei ole; androgeeneille altistuneilla naarailla niitä voi esiintyä ja kehittyä jonkin verran.

C – Sierainten edessä suun vieressä sijaitsevat kyhmyt. Sukukypsillä kontrollikoirailla yleensä laajentuneet tai korostuneet. Nuoremmilla koirailla tai androgeenikäsitellyillä naarailla näitä esiintyy, voivat olla laajentuneita.

▼M6

D – Suulinjan suuntaisesti sijaitsevat kyhmyt. Arvioidaan yleensä kehittyneiksi kontrollikoirailla. Näitä kyhmyjä ei ole kontrollinaarailla, kun taas androgeeneille altistuneilla naarailla niitä on.

E – Alaleuassa suun lähellä sijaitsevat kyhmyt, yleensä pieniä ja tavallisesti pareittain. Esiintyvät vaihtelevasti kontrollikoirailla tai käsitellyillä koirailla sekä käsitellyillä naarailla.

F – Alaleuassa selkäpuolella sijaitsevat kyhmyt. Yleensä pieniä ja parillisia. Esiintyy kontrollikoirailla ja androgeeneille altistuneilla naarailla.

VIITTEET

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276–1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350–1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003–3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127–141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515–523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129–145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031–1038.

Kyhmyjen kirjaamismalli	**Numeerinen pisteytys**
ID _____	1 – kyhmyjä
Päivämäärä _____	2 – laajentuneita kyhmyjä
Kokonaispisteet _____	3 – korostuneita kyhmyjä

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
				E	**X1**	**X1**					
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						

▼M6

Lisäys 5B

Medakan sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien arviointi tiettyjen hormonijärjestelmään vaikuttavien kemikaalien havaitsemiseksi

Jäljempänä on kuvaus sukuelinpapilleista (*), jotka ovat sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia medakalla (*Oryzias latipes*).

(*) Sukuelinpapilleja on yleensä vain täysikasvuisilla koirailla, ja ne sijaitsevat toisen ja seitsemännen tai kahdeksannen eväpoimun välissä peräevän takapäästä laskettuna (kuvat 1 ja 2). Papilleja on kuitenkin harvoin peräevän takapäästä katsottuna ensimmäisessä eväpoimussa. Tämä menettelytapaohje kattaa ensimmäisessä eväpoimussa olevien papillien mittauksen (tässä ohjeessa eväpoimun numero tarkoittaa poimujen järjestystä peräevän takapäästä katsottuna).

1) Maksan poistamisen (lisäys 6) jälkeen kalan ruumis asetetaan kartiomaiseen putkeen (pää ylöspäin, pyrstö alaspäin), joka sisältää noin 10 ml 10-prosenttista neutraalia puskuroitua formaliinia. Jos sukupuolirauhanen on kiinnitetty muulla kuin 10-prosenttisella neutraalilla puskuroidulla formaliinilla, leikkaa ruumis partaterällä poikittain peräevän etuosan ja peräaukon välistä varovasti, jotta gonopori ja sukupuolirauhanen eivät vaurioidu (kuva 3). Laita kalan ruumiin kallonpuoleinen osa kiinnitysliuokseen sukupuolirauhasen säilömiseksi ja pyrstönpuoleinen osa 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin edellä kuvatun mukaisesti.

2) Kun kalan ruumis on laitettu 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin, tartu peräevän etuosaan pinseteillä ja pidä sitä taitettuna noin 30 sekunnin ajan, jotta peräevä pysyy auki. Kun tartut peräevään pinseteillä, käsittele etuosan tiettyjä eväpoimuja varovasti, jotta sukuelinpapillit eivät vaurioidu.

3) Kun peräevä on ollut auki noin 30 sekunnin ajan, laita kalan ruumis 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin ja säilytä sitä huoneenlämmössä sukuelinpapillien mittaukseen saakka (mittaus on tehtävä vasta sitten, kun kiinnityksestä on kulunut vähintään 24 tuntia).

Mittaus

1) Kun kalan ruumis on ollut kiinnitettynä 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin vähintään 24 tuntia, ota se pois kartiomaisesta putkesta ja pyyhi formaliini suodatinpaperiin (tai paperipyyhkeeseen).

2) Aseta kala pöydälle vatsapuoli ylöspäin. Irrota peräevä varovasti pienillä dissekointisaksilla (peräevä kannattaa leikata siten, että sen mukana tulee myös hieman rintaevän tukiluuta).

3) Tartu irrotetun peräevän etuosaan pinseteillä ja aseta muutamin vesitipoin kostutetulle lasilevylle. Peitä peräevä peitinlasilla. Kun tartut peräevään pinseteillä, ole varovainen, etteivät sukuelinpapillit vaurioidu.

4) Laske niiden liitoslevyjen määrä, joissa on sukuelinpapilleja, käyttämällä biomikroskoopin näytetasoa (pystymikroskooppi tai käänteismikroskooppi). Sukuelinpapillit ovat tunnistettavissa liitoslevyn takaosassa näkyvästä

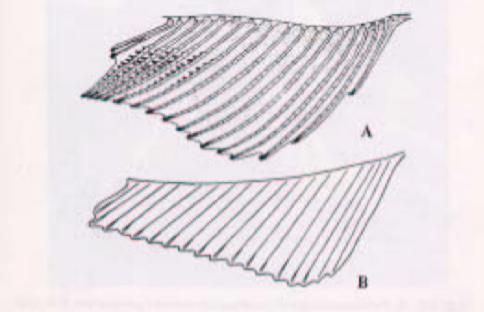
▼M6

pienestä papillimuodostelmasta. Merkitse kunkin eväpoimun liitoslevyssä olevien sukuelinpapillien määrä lomakkeeseen (ts. ensimmäinen eväpoimu: 0, toinen eväpoimu: 10, kolmas eväpoimu: 12 jne.) ja kirjoita kokonaislukumäärä Excel-työkirjaan kunkin yksittäisen kalan osalta. Ota peräevästä tarvittaessa valokuva ja laske siitä niiden liitoslevyjen lukumäärä, joissa on sukuelinpapilleja.

5) Laita peräevä mittauksen jälkeen 1 kohdassa kuvattuun kartioputkeen ja varastoi se.

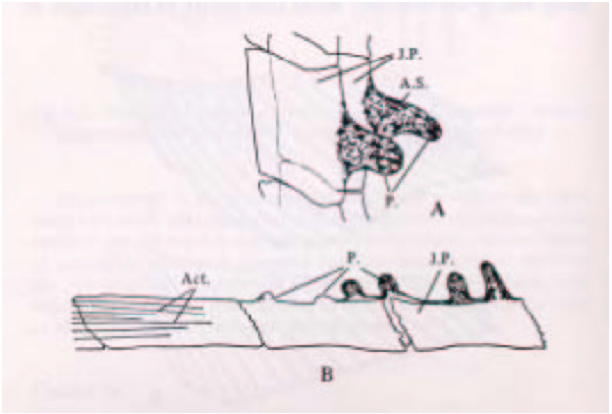
Kuva 1.

Piirros, josta näkee peräevän muotoon ja kokoon liittyvät sukupuolierot. A: koiras, B: naaras. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



Kuva 2.

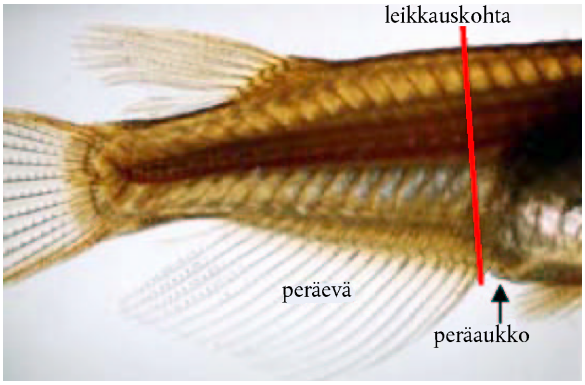
A: Peräevän eväpoimun liitoslevyissä olevia sukuelinpapilleja. J.P., liitoslevy; A.S., aksiaalinen väli; P., papilli. B: Eväpoimun distaalinen pää. Actinotrichium-säikeet (Act.) ovat kärjessä. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



▼**M6**

Kuva 3.

Kuva kalan ruumiista, jossa näkyy leikkauskohta, kun sukupuolirauhanen on kiinnitetty muulla kuin 10-prosenttisella neutraalilla puskuroidulla formaliinilla. Tässä tapauksessa jäljellä oleva ruumis leikataan kahtia peräevän etuosan ja peräaukon välistä partaterällä (punainen viiva). Kalan ruumiin päänpuoleinen osa laitetaan sukupuolirauhasen kiinnitysliuokseen ja pyrstöosa 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin.



▼M6

Lisäys 6

Suositellut näytteenottomenetelmät vitellogeniinianalyysia varten

Näytteenotossa on oltava huolellinen koiraiden ja naaraiden vitellogeniininäytteiden välisen ristikontaminaation välttämiseksi.

Menetelmä 1A; Rasvapäämutu, verinäytteen otto pyrstösuonesta

Nukutuksen jälkeen pyrstö leikataan osittain auki skalpellilla ja verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriittikapillaariputkeen. Kun verinäyte on otettu, plasma eristetään nopeasti sentrifugoimalla näytettä kolme minuuttia 15 000 *g*:ssä (tai 10 minuuttia 15 000 *g*:ssä 4 °C:n lämpötilassa). Haluttaessa hematokriittien prosenttiosuus voidaan määrittää sentrifugoinnin jälkeen. Sen jälkeen plasma poistetaan mikrohematokriittiputkesta ja säilötään sentrifugiputkeen, jossa on 0,13 yksikköä aprotiniinia (proteaasin estäjää) – 80 °C:n lämpötilassa siihen saakka, kunnes vitellogeniinimääritys voidaan tehdä. Rasvapäämutun (sukupuolen mukaan määräytyvän) koon mukaan kerättävä plasmamäärä on yleensä 5–60 mikrolitraa kalaa kohti (Jensen *et al.* 2001).

Menetelmä 1B: Rasvapäämutu, verinäytteen otto sydämestä

Verinäyte voidaan ottaa vaihtoehtoisesti myös sydänpunktiolla, jossa käytetään heparinisoitua ruiskua (1 000 yksikköä hepariinia millilitrassa). Veri siirretään Eppendorf-putkiin (jotka pidetään jäissä) ja sentrifugoidaan (5 minuuttia, 7 000 g, huonelämpötila). Plasma on siirrettävä puhtaisiin Eppendorf-putkiin (alikvooteissa, jos se on plasman tilavuuden perusteella mahdollista) ja jäädytettävä nopeasti – 80 °C:ssä analysointiin saakka (Panter et al., 1998).

Menetelmä 2A: Medaka, maksan poisto

Kalan ottaminen pois testiastiasta

(1) Kala otetaan pois testiastiasta pienen haavin avulla. Ole varovainen, jotta kala ei putoa muihin testiastioihin.

(2) Periaatteessa kalat on otettava pois astioista seuraavassa järjestyksessä: kontrolli, liuotinkontrolli (tarvittaessa), pienin pitoisuus, keskisuuri pitoisuus, suuri pitoisuus ja positiivinen kontrolli. Lisäksi kaikki koiraat on otettava pois yhdestä testiastiasta ennen naaraiden ottamista.

(3) Kunkin kalan sukupuoli on tunnistettavissa ulkoisten sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien (kuten peräevän muodon) perusteella.

(4) Laita kala kuljetussäiliöön ja vie se työpisteeseen, jossa maksan poisto tehdään. Tarkista testiastian ja kuljetussäiliön merkinnät, jotta voit vahvistaa, että testiastiasta otettujen kalojen lukumäärä ja siihen jääneiden kalojen lukumäärä ovat oikeat.

(5) Jos kalan sukupuolta ei voi määrittää sen ulkonäön perusteella, ota kaikki kalat pois testiastiasta. Tässä tapauksessa sukupuoli on määritettävä tutkimalla sukupuolirauhasia tai sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia stereomikroskoopilla.

▼**M6**

Maksan poistaminen

(1) Siirrä kala kuljetussäiliöstä nukutusliuokseen pienen haavin avulla.

(2) Kun kala on nukutettu, siirrä se suodatinpaperin (tai paperipyyhkeen) päälle (tavallisilla) pinseteillä. Tartu pinseteillä kalaan sen pään molemmin puolin, jotta pyrstöosa ei rikkoonnu.

(3) Kuivaa kalan pinta vedestä suodatinpaperiin (tai paperipyyhkeeseen).

(4) Aseta kala pöydälle vatsapuoli ylöspäin. Tee sen jälkeen pieni poikittainen viilto vatsanpuoleisen niskan alueen ja vatsan keskiosan välistä dissektiosaksilla.

(5) Laita dissektiosakset pienen viillon sisään ja avaa vatsa keskiviivaa pitkin kiduskannen pyrstönpuoleisesta päästä peräaukon kallonpuoleiseen päähän. Varo työntämästä saksia liian syvälle, jotta maksa ja sukupuolirauhanen eivät vaurioidu.

(6) Tee seuraavat toimenpiteet stereomikroskoopin avulla.

(7) Laita kala vatsapuoli ylöspäin paperipyyhkeen päälle (myös lasista petrimaljaa tai lasista näytelevyä voi käyttää).

(8) Levitä vatsaontelon seinämiä tarkkuuspinseteillä, jotta saat sisäelimet esiin. Sisäelimet voi ottaa esiin myös poistamalla toisen puolen vatsaontelon seinämästä, jos tarpeen.

(9) Ota maksan ja sappirakon yhtyneet osat esiin käyttämällä toista tarkkuuspinsettiparia. Tartu sappitiehen ja leikkaa sappirakko irti. Ole varovainen, jotta sappirakko ei mene rikki.

(10) Tartu sen jälkeen ruokatorveen ja leikkaa ruoansulatuskanava irti maksasta samalla tavalla. Ole varovainen, jotta ruoansulatuskanavan sisältö ei vuoda ulos. Irrota ruoansulatuskanavan pyrstönpuoleinen osa peräaukosta ja ota kanava pois vatsaontelosta.

(11) Poista rasva ja muut kudokset maksan reunoilta. Varo naarmuttamasta maksaa.

(12) Tartu maksan porttialueeseen tarkkuuspinseteillä ja ota maksa pois vatsaontelosta.

(13) Aseta maksa näytelevylle. Poista maksan pinnalta tarkkuuspinseteillä kaikki mahdollinen rasva ja ulkopuoliset kudokset (esimerkiksi vatsakalvo) tarvittaessa.

(14) Punnitse maksa elektronisella analyysivaa'alla käyttäen 1,5 ml:n mikroputkea taarana. Merkitse paino lomakkeeseen (lukema: 0,1 mg). Varmista, että mikroputken etiketissä on oikeat tiedot.

(15) Sulje maksan sisältävä mikroputki tulpalla. Aseta putki jäähdytystelineeseen (tai jäätelineeseen).

(16) Kun yhdeltä kalalta on poistettu maksa, puhdista dissekointivälineet tai vaihda ne puhtaisiin.

▼M6

(17) Poista maksa kaikilta kuljetussäiliössä olevilta kaloilta edellä kuvatulla tavalla.

(18) Kun kaikilta kuljetussäiliön kaloilta (ts. kaikilta testiastian koirailta tai naarailta) on poistettu maksa, laita kaikki maksanäytteet putkitelineeseen, varmista, että putkissa on tunniste-etiketit ja laita putkiteline sen jälkeen pakastimeen. Jos maksat toimitetaan esikäsittelyyn heti niiden irrottamisen jälkeen, näytteet on kuljetettava seuraavaan työpisteeseen jäähdytystelineessä (tai jäätelineessä).

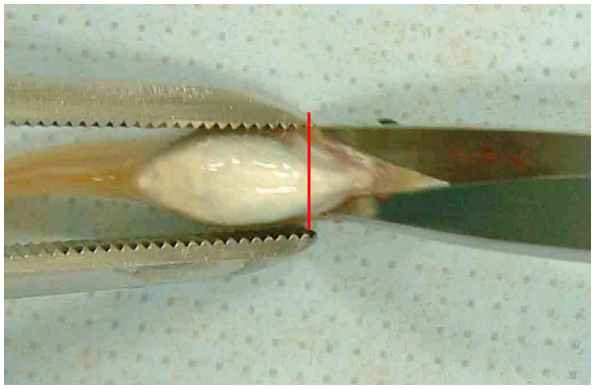
Maksan irrottamisen jälkeen kalan ruumiista voi tutkia sekundaariset sukupuolisominaisuudet.

Näyte

Säilytä kaloilta otetut maksanäytteet ≤ – 70 °C:n lämpötilassa, jos niitä ei käytetä esikäsittelyyn pian irrottamisen jälkeen.

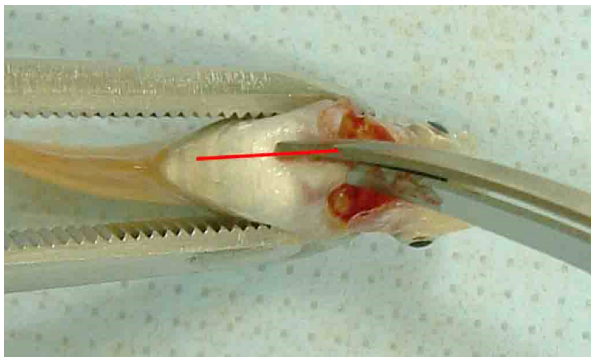
Kuva 1

Viilto tehdään saksilla aivan rintaevien edestä.



Kuva 2

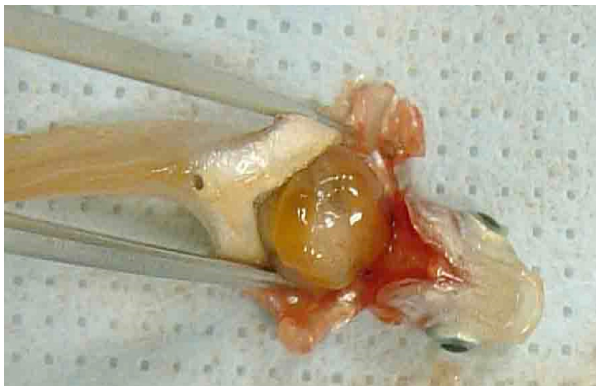
Vatsan keskiviiva leikataan saksilla auki pisteeseen, joka sijaitsee noin kaksi millimetriä kallosta peräaukkoon päin.



▼M6

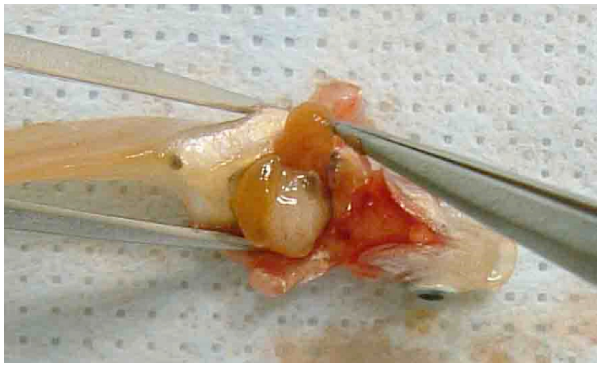
Kuva 3

Vatsaontelon seinämät levitetään pihdeillä, jotta maksa ja muut sisäelimet saadaan esiin. (Vaihtoehtoisesti seinämät voidaan kiinnittää sivuille.)



Kuva 4

Maksa leikataan irti suoraan ja otetaan pois pihdeillä.



Kuva 5

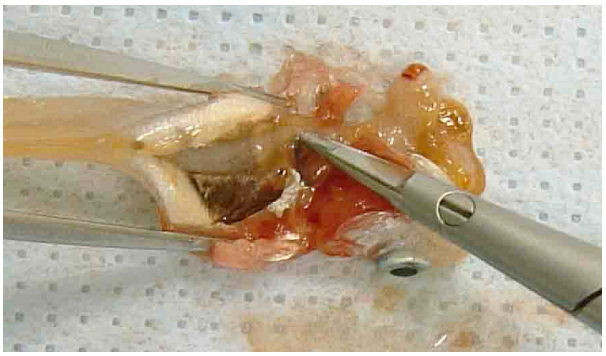
Sisäelimet irrotetaan varovasti pihdeillä.



▼M6

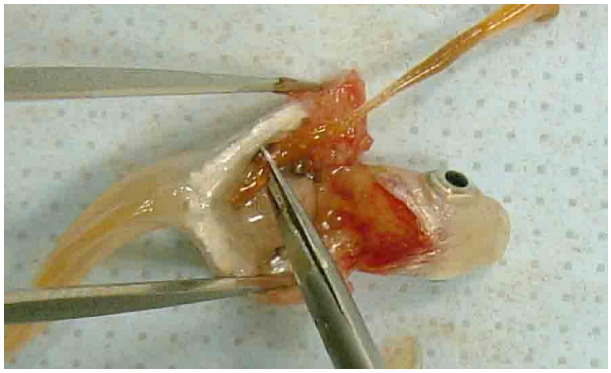
Kuva 6

Sisäelinten molemmat päät ja mahdolliset suoliliepeen kiinnikkeet leikataan irti saksilla.



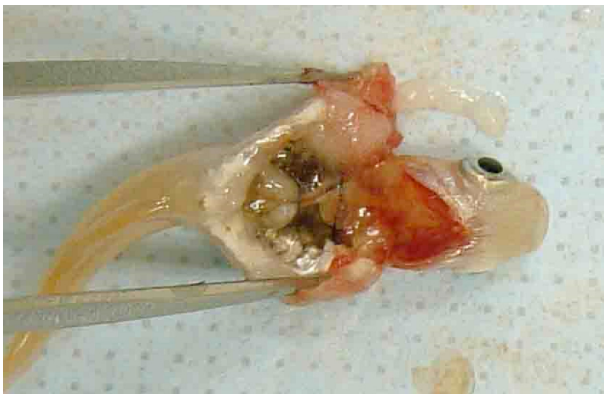
Kuva 7 (naaras)

Menettely on naaraiden osalta samanlainen.



Kuva 8

Valmis toimenpide.



Menetelmä 2B: Medaka (Oryzias latipes), maksan esikäsittely vitellogeniinianalyysia varten

Ota homogenaattipuskuria sisältävä pullo ELISA-pakkauksesta ja jäähdytä se jäämurskalla (liuoksen lämpötila: ≤ 4 °C). Jos käytetään EnBio ELISA -järjestelmän homogenaattipuskuria, sulata liuos huoneenlämmössä ja jäähdytä pullo sen jälkeen jäämurskalla.

▼**M6**

Laske tarvittavan homogenaattipuskurin määrä maksan painon perusteella (lisää 50 µl homogenaattipuskuria maksan painomilligrammaa kohti homogenaattia varten). Esimerkki: jos maksa painaa 4,5 mg, tarvittavan homogenaattipuskurin määrä on 225 µl. Tee luettelo kutakin maksaa varten tarvittavan homogenaattipuskurin määrästä.

Maksan valmistelu esikäsittelyä varten

(1) Ota maksan sisältävä 1,5 ml:n putki pakastimesta vasta vähän ennen esikäsittelyä.

(2) Koiraiden maksojen esikäsittely on tehtävä ennen naaraiden maksojen käsittelyä vitellogeniinikontaminaation välttämiseksi. Lisäksi testiryhmien esikäsittely on tehtävä seuraavassa järjestyksessä: kontrolli, liuotinkontrolli (tarvittaessa), pienin pitoisuus, keskisuuri pitoisuus, suuri pitoisuus ja positiivinen kontrolli.

(3) Pakastimesta ei saa ottaa enempää maksanäytteitä sisältäviä 1,5 ml:n mikroputkia kuin yhdellä kerralla voidaan sentrifugoida.

(4) Laita näytteet sisältävät 1,5 ml:n mikroputket jäätelineeseen näytenumeroiden mukaiseen järjestykseen (maksanäytteitä ei tarvitse sulattaa).

Esikäsittely

1. Homogenointipuskurin lisääminen

(1) Tarkista luettelosta, kuinka paljon homogenaattipuskuria kutakin maksanäytettä kohti on käytettävä ja säädä mikropipetti (tilavuuden vaihteluväli: 100–1 000 µl) tarvittavan määrän mukaisesti. Kiinnitä mikropipettiin puhdas kärki.

(2) Ota homogenaattipuskuri reagenssipullosta ja lisää puskuri maksanäytteen sisältävään 1,5 ml:n mikroputkeen.

(3) Lisää homogenaattipuskuri kaikkiin 1,5 ml:n mikroputkiin, jotka sisältävät maksanäytteen, edellä kuvatun menettelyn mukaisesti. Mikropipettiin ei tarvitse vaihtaa välillä uutta kärkeä. Jos kärki kontaminoituu tai jos epäilet sen kontaminoituneen, se pitää kuitenkin vaihtaa.

2. Maksan homogenisointi

(1) Kiinnitä mikroputkihomogenisaattoriin uusi homogenisointipää.

(2) Työnnä pää 1,5 ml:n mikroputkeen. Pidä homogenisaattoria siten, että maksa puristuu pään pinnan ja 1,5 ml:n mikroputken seinän väliin.

(3) Käytä homogenisaattoria 10–20 sekunnin ajan. Jäähdytä 1,5 ml:n mikroputki jäämurskalla toimenpiteen ajan.

(4) Nosta homogenisointipää 1,5 ml:n mikroputkesta ja anna sen levätä noin 10 sekuntia. Tarkasta suspension tila sen jälkeen silmämääräisesti.

(5) Jos suspensiossa näkyy maksan palasia, toista vaiheet 3 ja 4 hyväksyttävän maksahomogenaatin saamiseksi.

▼**M6**

(6) Jäähdytä suspendoitua maksahomogenaattia jäätelineessä sentrifugointiin saakka.

(7) Vaihda homogenisaattoriin uusi pää jokaista homogenaattia varten.

(8) Homogenisoi kaikki maksat homogenaattipuskurilla edellä kuvatun menetelmän mukaisesti.

3. Suspendoidun maksahomogenaatin sentrifugointi

(1) Tarkista, että jäähdyttävän sentrifugikammion lämpötila on ≤ 5 °C.

(2) Laita suspendoidun maksahomogenaatin sisältävät 1,5 ml:n mikroputket jäähdyttävään sentrifugiin (säädä tasapaino tarvittaessa).

(3) Sentrifugoi suspendoituja maksahomogenaatteja 13 000 *g*:ssa 10 minuuttia ≤ 5 °C:n lämpötilassa. Jos supernatanttien erottelu on kuitenkin riittävä, keskipakoisvoimaa ja sentrifugointiaikaa voi tarvittaessa säätää.

(4) Tarkista sentrifugoinnin jälkeen, että supernatanttien erottelu on riittävä (pintakerros: lipidit, välikerros: supernatantti, pohjakerros: maksakudos). Jos erottelu ei ole riittävä, sentrifugoi suspensio uudestaan samoissa olosuhteissa.

(5) Ota kaikki näytteet pois jäähdyttävästä sentrifugista ja aseta ne jäätelineeseen näytenumeron mukaiseen järjestykseen. Varo suspendoimasta eroteltuja kerroksia uudestaan sentrifugoinnin jälkeen.

4. Supernatantin kerääminen

(1) Laita putkitelineeseen neljä 0,5 ml:n mikroputkea supernatantin säilyttämistä varten.

(2) Ota mikropipetillä 30 µl jokaisesta supernatantista (joka on eroteltu välikerrokseen) ja tyhjennä määrä yhteen 0,5 ml:n mikroputkeen. Varo keräämästä pintakerroksessa olevia lipidejä tai pohjakerroksessa olevaa maksakudosta.

(3) Kerää supernatantti ja tyhjennä se kahteen muuhun 0,5 ml:n mikroputkeen edellä kuvatulla tavalla.

(4) Kerää loput supernatantista mikropipetillä (jos mahdollista: ≥ 100 µl). Tyhjennä tämä määrä neljänteen 0,5 ml:n mikroputkeen. Varo keräämästä pintakerroksessa olevia lipidejä tai pohjakerroksessa olevaa maksakudosta.

(5) Sulje 0,5 ml:n mikroputkien päät tulpalla ja kirjoita supernatantin määrä etikettiin. Jäähdytä mikroputket välittömästi jäätelineessä.

(6) Vaihda mikropipettiin uusi kärki jokaista supernatanttia varten. Jos kärkeen kiinnittyy suuri määrä lipidejä, vaihda se uuteen välittömästi, jotta rasva ei kontaminoi maksanäytettä.

(7) Tyhjennä kaikki sentrifugoidut supernatantit neljään 0,5 ml:n mikroputkeen edellä kuvatulla tavalla.

▼M6

(8) Kun olet tyhjentänyt supernatantin 0,5 ml:n mikroputkiin, laita kaikki etiketöidyt putket putkitelineeseen ja pakasta ne välittömästi. Jos vitellogeniinipitoisuudet mitataan välittömästi esikäsittelyn jälkeen, pidä yksi 0,5 ml:n mikroputki (joka sisältää 30 µl supernatanttia) jäähdytettynä putkitelineessä ja vie se siihen työpisteeseen, jossa ELISA-määritys tehdään. Laita muut mikroputket putkitelineisiin ja pakasta ne.

(9) Hävitä jäämät supernatantin keräämisen jälkeen asianmukaisesti.

Näytteiden säilytys

Säilytä maksahomogenaatin supernatanttia sisältävät 0,5 ml:n mikroputket ≤ – 70 °C:ssa siihen saakka, kun niitä käytetään ELISA-määrityksessä.

Menetelmä 3A: Seeprakala, verinäytteen otto pyrstösuonesta

Pyrstöön tehdään välittömästi nukutuksen jälkeen poikittainen viilto, ja verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriittikapillaariputkeen. Verimäärä vaihtelee välillä 5–15 µl kalan koon mukaan. Mikrokapillaariputkeen lisätään sama määrä aprotiniinipuskuria (6 µgml fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa), ja plasma erotellaan verestä sentrifugoimalla (5 minuuttia 600 g:ssä). Plasma kerätään koeputkiin ja varastoidaan – 20 °C:ssä siihen saakka, kunnes siitä analysoidaan vitellogeniini tai muut tarvittavat proteiinit.

Menetelmä 3B: Seeprakala, verinäytteen otto sydänpunktiolla

Veren koaguloitumisen ja proteiinin hajoamisen välttämiseksi näytteet otetaan fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen, joka sisältää hepariinia (1 000 yksikköä/ml) ja proteaasin estäjää, aprotiniinia (2 TIU/ml). Hepariini-ammoniumsuola ja kylmäkuivattu aprotiniini ovat puskurin suositeltavia ainesosia. Näytteenotossa suositellaan käytettäväksi ruiskua (1 ml) ja kiinteää ohutneulaa (esimerkiksi Braun Omnikan-F). Ruisku on esitäytettävä puskurilla (noin 100 µl), jotta jokaisen kalan pieni verimäärä voidaan eluoida kunnolla. Verinäytteet otetaan sydänpunktiolla. Ensin kala on nukutettava MS-222:lla (100 mg/l). Kun anestesian taso on asianmukainen, näytteenottaja voi erottaa seeprakalan sydämensykkeen. Pidä ruiskun mäntä pienen paineen alaisena, kun punktoit sydäntä. Kerättävän veren määrä on 20–40 mikrolitraa. Sydänpunktion jälkeen veri-puskuriseos on laitettava koeputkeen. Plasma erotellaan verestä sentrifugoimalla (20 minuuttia; 5 000 g), ja sitä tulee säilyttää – 80 °C:ssa analysointiin saakka.

Menetelmä 3C: Menettelytapaohje: Seeprakala, pään ja pyrstön homogenisointi

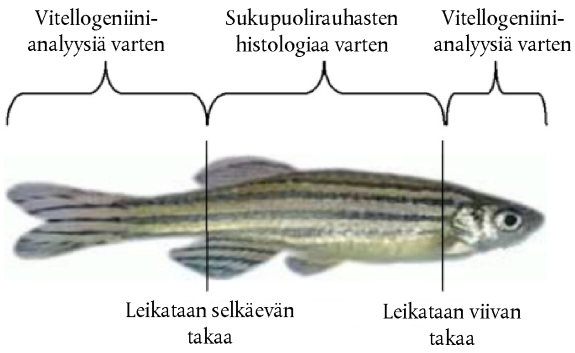
(1) Kalat nukutetaan ja lopetetaan testikuvauksen mukaisesti.

(2) Kalan pää ja pyrstö leikataan kuvassa 1 näkyvällä tavalla.

Tärkeää: Kaikki dissekointivälineet ja leikkauspöytä on huuhdeltava ja puhdistettava kunnolla (esimerkiksi 96-prosenttisella etanolilla) jokaisen kalan käsittelyn jälkeen, jotta naaraiden tai niiden koiraiden, joille kemikaali on aiheuttanut vaikutuksia, vitellogeniini ei saastuta terveitä koiraita.

▼**M6**

Kuva 1



(3) Jokaisen kalan pään ja pyrstön yhteispaino punnitaan lähimpään milligrammaan.

(4) Punnituksen jälkeen kalan osat laitetaan asianmukaisiin putkiin (esimerkiksi 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin) ja jäädytetään – 80 °C:ssa homogenisointiin saakka. Ne voidaan myös homogenisoida suoraan jään päällä kahdella muovisurvimella. (Myös muita menetelmiä voi käyttää, jos ne tehdään jään päällä ja jos lopputuloksena on homogeeninen massa.) Tärkeää: Putket on numeroitava asianmukaisesti, jotta yhden kalan pää ja pyrstö voidaan yhdistää siihen ruumiinosaan, jota käytetään sukupuolirauhasen histologisessa tutkimuksessa.

(5) Kun homogeeninen massa on valmis, siihen lisätään neljä kertaa kudoksen painon verran jääkylmää homogenisointipuskuria (*). Jatka työskentelyä survimilla, kunnes seos on homogeeninen. Tärkeä huomautus: Jokaiselle kalalle käytetään uusia survimia.

(6) Näytteet laitetaan jäähän siihen saakka, kunnes ne sentrifugoidaan 4 °C:ssa (50 000 × g) 30 minuutin ajan.

(7) Laita pipetillä 20 µl:n supernatanttiannoksia vähintään kahteen putkeen upottamalla pipetin kärki pinnan rasvakerroksen läpi ja vetämällä varovasti supernatanttia pipettiin ilman rasva- tai pellettifraktioita.

(8) Putkia säilytetään – 80 °C:ssa siihen saakka, kunnes niitä käytetään.

(*) **Homogenisointipuskuri:**

— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteaasinestäjäsekoitus (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaasinestäjäsekoitus.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), valmistaja esimerkiksi Bie & Berntsen, Tanska.

— Proteaasinestäjäsekoitus: Sigman (nisäkkäiden kudoksille tarkoitettu) tuote nro P 8340.

— *Huomautus:* Homogenisointipuskuri on käytettävä samana päivänä kuin se valmistetaan. Pidä puskuri jään päällä käytön aikana.

▼**M6**

Lisäys 7

Vitellogeniinin rikastusnäytteet ja määritysten välinen vertailuaine

Niinä päivinä, kun tehdään vitellogeniinimäärityksiä, analysoidaan myös rikastusnäyte käyttämällä määritysten välistä vertailuainetta. Määritysten välisen vertailuaineen valmistamisessa käytettävä vitellogeniini on peräisin eri erästä kuin se, jota käytettiin tehtävän määrityksen kalibrointistandardien tekemiseen.

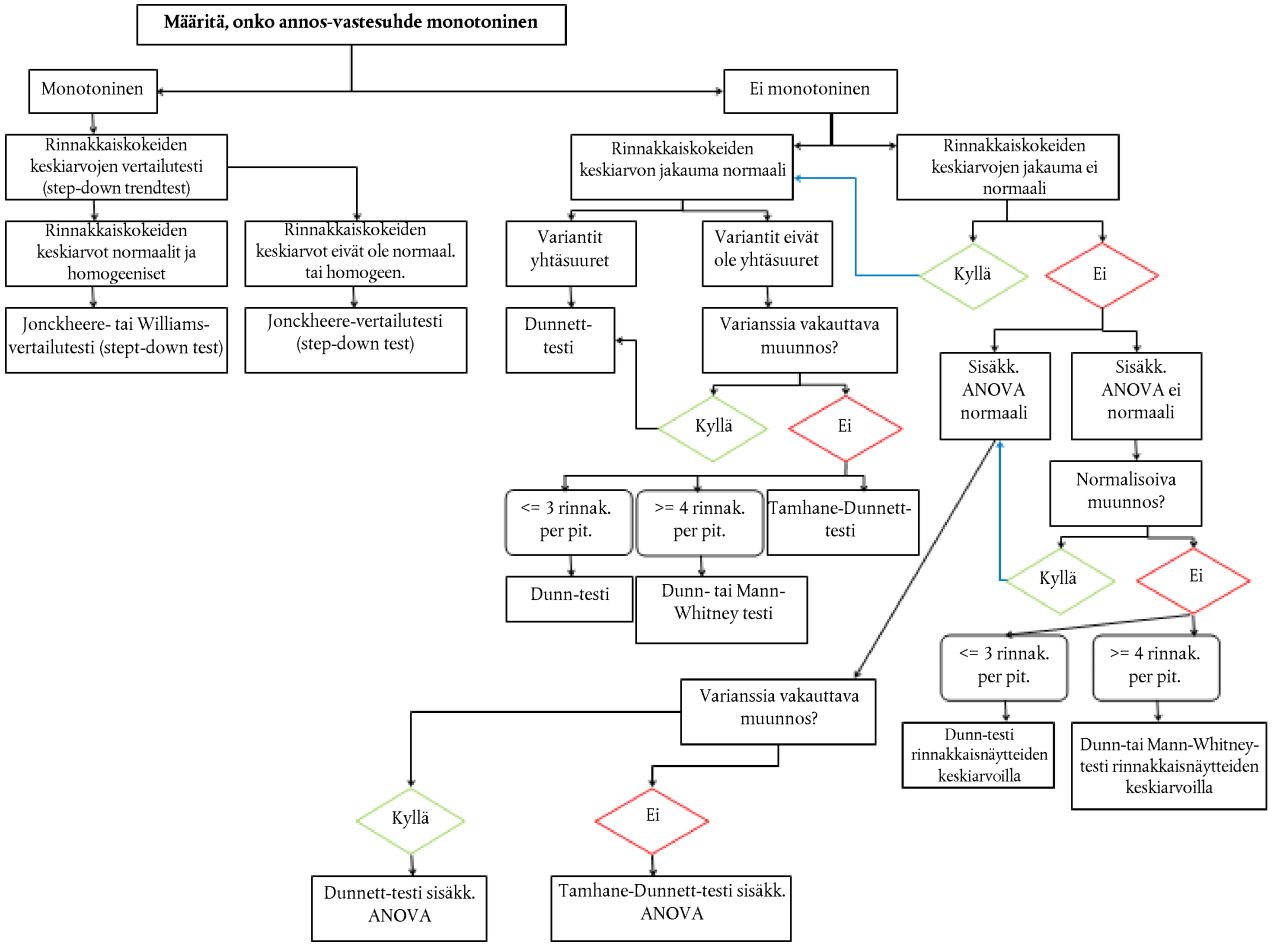
Rikastusnäyte tehdään lisäämällä tunnettu määrä määritysten välistä vertailuainetta kontrolliryhmän koiraan plasmanäytteeseen. Näytettä rikastetaan, jotta saadaan sellainen vitellogeniinipitoisuus, joka on 10–100 kertaa suurempi kuin kontrolliryhmän koiraan odotuksenmukainen vitellogeniinipitoisuus. Rikastettava kontrolliryhmän plasmanäyte voi olla peräisin yksittäiseltä kalalta, tai se voidaan yhdistää useilta kaloilta.

Osanäyte rikastamattomasta kontrolliryhmän koiraan plasmasta analysoidaan vähintään kahdessa rinnakkaisessa kuopassa. Myös rikastettu näyte analysoidaan vähintään kahdessa rinnakkaisessa kuopassa. Vitellogeniinin keskimääräinen määrä kahdessa rikastamattomassa kontrolliryhmän koiraan plasmanäytteessä lisätään siihen vitellogeniinin laskettuun määrään, joka on lisätty näytteiden rikastamiseen, odotuksenmukaisen pitoisuuden määrittämiseksi. Tämän odotuksenmukaisen pitoisuuden ja mitatun pitoisuuden välinen suhde ilmoitetaan kyseisenä päivänä tehtyjen määritysten tulosten mukana.

▼M6

Lisäys 8

Päätöksentekoa tukeva vuokaavio tilastollista analyysia varten



02008R0440 — FI — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

C.38. SAMMAKKOELÄINTEN MUODONVAIHDOSTUTKIMUS (AMA-TUTKIMUS)

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 231 (2009). Tarve kehittää ja validoida tutkimus, jolla pystytään havaitsemaan selkärankaisten lajien kilpirauhasjärjestelmään vaikuttavia kemikaaleja, perustuu huolenaiheisiin, joiden mukaan kemikaalien ympäristöpitoisuuksista saattaa aiheutua haittavaikutuksia sekä ihmisille että eläimille. Vuonna 1998 OECD aloitti tärkeän toimenpiteen, nimittäin olemassa olevien ohjeiden uudistuksen ja uusien ohjeiden laatimisen mahdollisten hormonitoimintaa häiritsevien aineiden seulontaa ja testausta varten. Yksi toimenpiteen osa oli laatia testiohjeet selkärankaisten lajien kilpirauhasjärjestelmään vaikuttavien kemikaalien seulontaan. Sekä jyrsijöillä tehtävän toistetun annoksen 28 päivän myrkyllisyystutkimusta (tämän liitteen luku B.7) että sammakkoeläinten muodonvaihdostutkimusta (Amphibian Metamorphosis Assay, AMA-tutkimus) ehdotettiin parannettavaksi. Parannettu testimenetelmä B.7 validoitiin, ja tarkistettu testimenetelmä on sittemmin julkaistu. AMA-tutkimus validoitiin kattavasti. Siihen sisältyi laboratorioiden sisäisiä ja välisiä tutkimuksia, joilla osoitettiin tutkimuksen merkityksellisyys ja luotettavuus (1, 2). Lopuksi riippumattomista asiantuntijoista koostuva ryhmä vertaisarvioi tutkimuksen validoinnin (3). Tämä testimenetelmä perustuu kilpirauhasjärjestelmään vaikuttavien kemikaalien havaitsemista koskevien validointitutkimusten aikana karttuneeseen kokemukseen sekä muualla OECD:n jäsenvaltioissa tehtyyn tutkimukseen.

TESTIN PERIAATE

2. AMA-tutkimus on seulontatutkimus, jonka tavoitteena on tunnistaa empiirisesti sellaiset kemikaalit, jotka voivat häiritä hypotalamus-aivolisäke-kilpirauhasakselin (HPT-akselin) toimintaa. AMA on siinä mielessä yleispätevä selkärankaismalli, että se perustuu HPT-akselin säilöttyihin rakenteisiin ja toimintoihin. Se on tärkeä tutkimus, koska sammakon muodonvaihdos on hyvin tutkittu kilpirauhasesta riippuva prosessi, joka reagoi HPT-akseliin vaikuttaviin kemikaaleihin, ja se on ainoa olemassa oleva tutkimus, jolla voidaan havaita kilpirauhaseen kohdistuvia vaikutuksia morfologisessa kehitysvaiheessa olevalla eläimellä.

3. Testissä vaiheessa 51 olevia *Xenopus laevis* -sammakonpoikasia altistetaan kolmelle eri pitoisuudelle testikemikaalia ja laimennusvesikontrollille 21 päivän ajan. Jokaisesta käsittelystä tehdään neljä rinnakkaistestiä. Testin alussa toukkien tiheys on 20 sammakonpoikasta testiastiaa kohti kaikissa käsittelyryhmissä. Tutkittavat ominaisuudet ovat takajalan pituus, kuonon ja peräaukon välinen pituus, kehitysvaihe, märkäpaino, kilpirauhasen histologia sekä päivittäiset havainnot kuolleisuudesta.

MENETELMÄN KUVAUS

Testilajit

4. *Xenopus laevis* -lajia kasvatetaan yleisesti laboratorioissa kaikkialla maailmassa, ja sitä saa helposti kaupallisilta toimittajilta. Tässä lajissa lisääntyminen saadaan helposti aikaan kaikkina vuodenaikoina käyttämällä ihmisen koriongonadotropiini- eli hCG-injektioita, ja näin syntyvistä toukista voidaan kasvattaa suuri määrä tiettyihin kehitysvaiheisiin, jolloin voidaan käyttää kehitysvaihekohtaisia testisuunnitelmia. Tutkimuksessa on ensisijaisesti käytettävä laboratorion aikuisista sammakoista peräisin olevia toukkia. Vaihtoehtoisesti – joskaan tämä ei ole suositeltavaa – munat tai alkiot

▼M6

voidaan lähettää laboratorioon, jossa testi tehdään, jolloin on huolehdittava totutteluvaiheesta. Sen sijaan toukkavaiheessa olevien sammakonpoikasten lähettäminen testissä käytettäväksi ei ole hyväksyttävää.

Laitteet ja tarvikkeet

5. Tässä tutkimuksessa tarvitaan seuraavat laitteet ja tarvikkeet:

a) altistusjärjestelmä (ks. jäljempänä oleva kuvaus)

b) lasisia tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja akvaarioita (ks. jäljempänä oleva kuvaus)

c) lisääntymissäiliöitä

d) lämpötilan valvontalaitteet (ts. lämmittimet tai jäähdyttimet (säädettävä lämpötila 22 ± 1 °C))

e) lämpömittari

f) kaksiokulaarinen dissektiomikroskooppi

g) digitaalikamera, jonka tarkkuus on vähintään neljä megapikseliä ja jossa on mikrotoiminto

h) kuvien digitointiohjelmisto

i) petrimalja (esimerkiksi 100 × 15 mm) tai vastaavankokoinen läpinäkyvä muovimalja

j) analyysivaaka, jonka tarkkuus on kolme desimaalia (mg)

k) liuenneen hapen mittari

l) pH-mittari

m) valotehon mittari, jossa mittayksikkönä luksi

n) erilaisia laboratoriolaseja ja -instrumentteja

o) säädettäviä pipettejä (10–5 000 µl) tai valikoima vastaavankokoisia pipettejä

p) tutkimuksen tekemiseen riittävä määrä testikemikaalia mieluiten yhdestä erästä

q) testattavalle kemikaalille sopivat analyysilaitteet tai sopimusperusteiset analyysipalvelut.

Kemikaalin testattavuus

6. AMA perustuu vesialtistukseen, jossa testikemikaalia johdetaan testiastioihin läpivirtausjärjestelmän kautta. Läpivirtausjärjestelmissä on kuitenkin kemikaalin fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin perustuvia rajoituksia sille, minkätyyppisiä kemikaaleja voidaan testata. Ennen tämän tutkimuksen tekemistä kemikaalista on hankittava perustiedot, joiden perusteella testattavuus voidaan määrittää. Lisäksi on tutustuttava vaikeasti testattavia kemikaaleja koskevaan OECD:n testiohjeeseen ”Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures” (4). Sellaisia ominaisuuksia, jotka viittaavat siihen, että kemikaalia voi olla vaikea testata vesijärjestelmissä, ovat

▼M6

seuraavat: suuret oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen (log K_{ow}), suuri haihtuvuus, hydrolyysiherkkyys ja fotolyysiherkkyys laboratorion valaistusolosuhteissa. Myös muilla tekijöillä voi olla merkitystä testattavuuden määrittämisessä, ja ne on otettava huomioon tapauskohtaisesti. Jos kemikaalia ei voida testata onnistuneesti läpivirtausjärjestelmää käyttäen, voidaan käyttää staattista järjestelmää, jossa testiliuos ei vaihdu. Jos testikemikaalia ei voida mukauttaa kumpaankaan järjestelmään, kemikaalia ei tule testata tämän suunnitelman mukaisesti.

Altistusjärjestelmä

7. Mieluiten on käytettävä läpivirtauslaimenninjärjestelmää, jos mahdollista; toissijainen menetelmä on staattinen järjestelmä, jossa testiliuos ei vaihdu. Jos jonkin testikemikaalin fysikaaliset ja/tai kemialliset ominaisuudet eivät sovellu läpivirtauslaimenninjärjestelmään, voidaan käyttää vaihtoehtoista altistusjärjestelmää (ts. staattista järjestelmää). Järjestelmän veden kanssa kosketuksiin joutuvien osien tulee olla lasia, ruostumatonta terästä ja/tai polytetrafluoroetyleeniä. Muitakin sopivia muoveja voi käyttää, jos ne eivät vaaranna tutkimusta. Altistussäiliöinä tulee käyttää lasisia tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja akvaarioita. Niissä on oltava nousuputket, joilla säiliön vesimääräksi saadaan noin 4,0–10,0 litraa, ja veden vähimmäissyvyyden tulee olla 10–15 cm. Järjestelmässä on voitava käyttää kaikkia altistuspitoisuuksia ja kontrollia sekä neljää rinnakkaisnäytettä käsittelyä kohti. Jokaisen säiliön virtausnopeuden on oltava tasainen, kun otetaan huomioon sekä biologisten olosuhteiden ylläpitäminen että kemikaalialtistus (esimerkiksi 25 ml/min). Käsittelysäiliöt on laitettava altistusjärjestelmään sattumanvaraisiin paikkoihin, jotta mahdolliset sijainnista johtuvat vaikutukset voidaan minimoida. Tämä koskee myös lämpötilan, valotehon jne. vaihteluita. Tilassa on käytettävä loisteputkivalaistusta. Valoisan ajan kesto on 12 h ja pimeän ajan kesto 12 h, ja valoteho saa vaihdella 600–1 200 luksin (luumenia/m^2) välillä veden pinnalla. Veden lämpötila on pidettävä arvossa 22 ± 1 °C; pH-arvo saa olla 6,5–8,5, ja liuenneen hapen (DO) pitoisuus saa olla > 3,5 mg/l (> 40 prosenttia ilman kyllästysarvosta) jokaisessa testisäiliössä. Viikoittain tulee mitata vähintään veden lämpötila, pH ja liuennut happi. Lämpötilaa on mitattava mieluiten jatkuvasti ainakin yhdestä testiastiasta. Lisäyksessä 1 on esitetty koeolosuhteet, joissa testi on toteutettava. Lisätietoja läpivirtausaltistusjärjestelmien ja/tai staattisten järjestelmien rakentamisesta on ASTM:n oppaassa ”Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians” (5) ja yleisissä myrkyllisyyttä vesieliöille koskevissa testeissä.

Veden laatu

8. Tutkimuksessa voi käyttää mitä tahansa paikallisesti saatavaa vettä (esimerkiksi lähdevettä tai hiilisuodatettua vesijohtovettä), jossa *X. laevis* -sammakonpoikaset voivat kasvaa ja kehittyä normaalisti. Koska paikallisen veden laatu voi vaihdella huomattavasti alueelta toiselle, veden laatu on analysoitava etenkin silloin, jos saatavilla ei ole aiempia tietoja veden käyttökelpoisuudesta *Xenopus*-lajin kasvattamisessa. Erityisesti on varmistettava, ettei vedessä ole kuparia, klooria eikä kloramiineja, koska ne kaikki ovat myrkyllisiä sammakoille ja sammakonpoikasille. Lisäksi vedestä on suositeltavaa analysoida fluoridin, perkloraatin ja kloraatin (juomaveden desinfioinnista syntyvät sivutuotteet) taustapitoisuudet, koska

▼M6

kaikki nämä anionit ovat kilpirauhasen jodin kuljetusproteiinin substraatteja, ja kaikkien niiden kohonneet pitoisuudet voivat vaikuttaa tutkimustuloksiin. Analyysi on tehtävä ennen testauksen aloittamista. Yleensä testivedessä ei ole näitä anioneja.

Testiveden jodipitoisuus

9. Jotta kilpirauhanen voi syntetisoida tyroksiinihormonia, toukkien on saatava vedestä ja ravinnosta riittävästi jodia. Tällä hetkellä empiirisesti johdettuja ohjeita vähimmäisjodipitoisuuksista ei ole. Jodin saatavuus voi kuitenkin vaikuttaa siihen, miten kilpirauhasjärjestelmä reagoi kilpirauhaseen vaikuttaviin aineisiin, ja sen tiedetään muokkaavan kilpirauhasen perustoimintaa. Tämä seikka on syytä ottaa huomioon kilpirauhasen histopatologisia tuloksia tulkittaessa. Tämän vuoksi testivedestä mitatut jodipitoisuudet on ilmoitettava. Validointitutkimuksista saatujen tutkimusten perusteella tutkimuksen on osoitettu toimivan hyvin, kun testiveden jodin (I^-) pitoisuudet vaihtelivat välillä 0,5–10 μg/l. Ihannetapauksessa testiveden vähimmäisjodipitoisuuden tulisi olla 0,5 μg/l. Jos testivesi valmistetaan deionisoidusta vedestä, jodia on lisättävä sen verran, että vähimmäispitoisuudeksi tulee 0,5 μg/l. Jos testiveteen lisätään jodia tai muita suoloja, siitä on mainittava tutkimusraportissa.

Eläinten hoito

Aikuisten eläinten hoito ja lisääntyminen

10. Aikuisten eläinten hoidossa ja lisääntymisessä sovelletaan vakio-ohjeita. Lukijaa kehotetaan lukemaan tarkempia tietoja sammakon alkion teratogeneettista tutkimusta (FETAX) (6) koskevista vakio-ohjeista. Nämä vakio-ohjeet ovat yksi esimerkki asianmukaisista hoito- ja lisääntymismenetelmistä, mutta niitä ei kuitenkaan tarvitse noudattaa tiukasti. Lisääntymistä varten aikuisista naaraista ja koiraista koostuviin pareihin injektoidaan ihmisen koriongonadotropiinia (hCG:tä). Naaraisiin injektoidaan noin 800–1 000 IU ja koiraisiin 600–800 IU 0,6–0,9-prosenttiseen suolaliuokseen liuotettua hCG:tä. Parit, joiden on määrä lisääntyä, pidetään suurissa säiliöissä häiriöittä ja staattisissa olosuhteissa, jotta eläimet hakeutuvat paritteluasentoon helpommin. Jokaisessa lisääntymissäiliössä tulee olla ruostumattomasta teräksestä tai muoviverkosta valmistettu valepohja, jotta munamassa laskeutuu säiliön pohjalle. Sammakot, joille injektio annetaan myöhään iltapäivällä, laskevat valtaosan munistaan yleensä seuraavan aamupäivän puolivälissä. Kun munia on laskettu riittävästi ja kun ne on hedelmöitetty, aikuiset eläimet on otettava pois lisääntymissäiliöstä.

Toukkien hoito ja valinta

11. Kun eläimet on otettu pois lisääntymissäiliöistä, munat kerätään ja niiden kehityskelpoisuus arvioidaan käyttämällä edustavaa alaryhmää kaikista lisääntymissäiliöistä peräisin olevista alkioista. Parhaat yksittäiset mädit (mätien laadun arviointiin suositellaan kahta tai kolmea mätiä) tulee säilyttää alkioiden kehityskelpoisuuden ja riittävän alkiomäärän (vähintään 1 500) perusteella. Kaikkien tutkimuksessa käytettävien organismien on oltava peräisin yhdeltä kutukerralta (ts. mätejä ei saa sekoittaa keskenään). Alkiot siirretään suureen laakeaan astiaan, ja kaikki selvästi kuolleet tai poikkeavat munat (ks. määritelmä lähdeviitteestä (5)) poistetaan pipetillä tai vastaavalla instrumentilla. Jokaisen kolmen mädin hyväkuntoiset alkiot siirretään kolmeen erilliseen hautomisastiaan. Kun mäti on ollut neljä päivää hautomisastiassa, valitaan kehityskelpoisuuden ja hautomisen onnistumisen perusteella paras mäti, ja toukat siirretään niin moneen kasvatussäiliöön kuin on

▼M6

tarpeen (lämpötila 22 ± 1 °C). Lisäksi muutamia toukkia siirretään ylimääräisiin säiliöihin, ja niillä korvataan kasvatussäiliöissä ensimmäisen viikon aikana mahdollisesti kuolevat toukat. Tässä menetelmässä organismin tiheys pysyy vakiona, mikä vähentää yksittäisestä mädistä koostuvan kohortin sisäisiä kehityksellisiä eroavuuksia. Kaikki kasvatussäiliöt on puhdistettava lapolla päivittäin. Varotoimenpiteenä suositellaan käytettäväksi vinyyli- tai nitriilikäsineitä lateksikäsineiden sijasta. Kuolleet toukat on poistettava säiliöstä päivittäin, ja niiden tilalle on lisättävä korvaavia toukkia, jotta organismin tiheys pysyy samana ensimmäisen viikon ajan. Toukkia on ruokittava vähintään kahdesti päivässä.

12. Esialtistusvaiheen aikana sammakonpoikaset totutetaan varsinaisen altistusvaiheen olosuhteisiin, mukaan luettuina tyypillinen ruoka, lämpötila, valoisan ja pimeän vaihteluväli sekä kasvatusalusta. Sen vuoksi on suositeltavaa, että esialtistusvaiheessa ja altistusvaiheessa käytetään samaa kasvatus-/laimennusvettä. Jos sammakonpoikasten ylläpitämisessä käytetään esialtistusvaiheessa staattista kasvatusjärjestelmää, kasvatusalusta on vaihdettava kokonaan vähintään kahdesti viikossa. Esialtistusvaiheen aikaisesta suuresta toukkatiheydestä johtuvaa tungosta on vältettävä, koska siihen liittyvät seikat saattavat vaikuttaa merkittävästi sammakonpoikasten kehitykseen myöhemmässä testausvaiheessa. Siksi kasvatustiheys ei saa olla enempää kuin noin neljä sammakonpoikasta litrassa kasvatusalustaa (staattinen altistusjärjestelmä) tai kymmenen sammakonpoikasta litrassa kasvatusalustaa (kun virtausnopeus esialtistus- tai kasvatusjärjestelmässä on esimerkiksi 50 ml/min). Tällaisissa olosuhteissa sammakonpoikasten tulisi kehittyä vaiheista 45/46 vaiheeseen 51 kahdentoista päivän kuluessa. Tätä varastopopulaatiota edustavien sammakonpoikasten kehitysvaihe on tutkittava päivittäin, jotta voidaan arvioida, milloin on sopiva ajankohta altistuksen aloittamiselle. Stressin ja traumojen aiheuttamista sammakonpoikasille on pyrittävä välttämään etenkin toukkien liikuttamisen ja käsittelyn sekä akvaarioiden puhdistamisen aikana. Stressaavia olosuhteita ja toimenpiteitä on vältettävä. Sellaisia ovat esimerkiksi kova ja/tai jatkuva melu, akvaarioihin koputtelu, akvaarioihin kohdistuva tärinä, liiallisen vilkas toiminta laboratoriossa sekä ympäristön muutokset (valaistus, lämpötila, pH, liuennut happi, veden virtausnopeudet jne.). Jos sammakonpoikaset eivät kehity vaiheeseen 51 seitsemäntoista päivän kuluessa hedelmöittymisestä, liiallinen stressi on otettava huomioon mahdollisena syynä.

Toukkien kasvatus ja ruokinta

13. Sammakonpoikasia ruokitaan esimerkiksi kaupallisesti saatavalla, validointitutkimuksissa käytetyllä sammakonpoikasten ravinnolla koko esialtistusvaiheen ajan (Nieuwkoopin ja Faberin (NF) vaiheen 45/46 (8)) jälkeen) ja koko 21 päivän mittaisen testausvaiheen ajan. Myös muuta ravintoa voidaan käyttää, kunhan on osoitettu, että AMA-tutkimuksen suorituskyky pysyy sen avulla yhtä hyvänä. Ravinnon annostelua esialtistusvaiheen aikana on mukautettava huolellisesti, jotta se täyttää kehittyvien sammakonpoikasten tarpeet. Toisin sanoen hiljattain kehittyneille sammakonpoikasille on annettava pieniä annoksia ravintoa useita kertoja päivässä (ainakin kahdesti). On vältettävä antamasta ravintoa liikaa, jotta *i)* veden laatu pysyy hyvänä ja *ii)* jotta ruokahiukkaset ja jätökset eivät tuki suodattimia. Validointitutkimuksissa käytetyn sammakonpoikasten ravinnon osalta päivittäisiä ruoka-annoksia tulee suurentaa sammakonpoikasten kasvaessa siten, että annos on 30 mg/eläin/päivä hieman ennen tutkimuksen aloittamista. Validointitutkimuksissa tämän kaupallisesti saatavilla olevan ravinnon on osoitettu tukevan *X. laevis* -lajin sammakonpoikasten kasvua ja kehitystä asianmukaisesti. Kyseessä on hienojakoinen aines, joka pysyy

▼M6

suspendoituneena vesipatsaassa pitkän aikaa, ja se huuhtoutuu pois vedenvirtauksen mukana. Siksi ravinnon päivittäinen kokonaismäärä on jaettava pienempiin annoksiin, ja ne on annettava eläimille vähintään kahdesti päivässä. Tämän ravinnon annosteluohje on taulukossa 1. Ruokintakerrat on merkittävä muistiin. Ravinto voidaan antaa kuivana tai laimennusvedestä valmistettuna varastoliuoksena. Tuoretta varastoliuosta on valmistettava joka päivä, ja sitä on säilytettävä 4 °C:ssa, kun sitä ei käytetä.

Taulukko 1.

***X. laevis* -lajin sammakonpoikasia koskevissa validointitutkimuksissa käytetyn kaupallisesti saatavan sammakonpoikasten ruoan annosteluohje, AMA-tutkimuksen elossa-osuus, läpivirtausolosuhteet**

Tutkimuspäivä	Ruoka-annos (mg ruokaa eläintä kohti päivässä)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Analyyttinen kemia

14. Ennen tutkimuksen tekemistä testikemikaalin stabiilius on arvioitava sen liukoisuudesta, hajoavuudesta ja haihtuvuudesta saatavilla olevien tietojen perusteella. Jokaisesta rinnakkaistestisäiliön testausliuoksesta ja jokaisesta pitoisuudesta on otettava näyte analyyttisen kemian analyyseja varten testin alkaessa (päivänä 0), ja testin aikana on otettava vähintään neljä näytettä viikoittain. On myös suositeltavaa, että jokainen testipitoisuus analysoidaan järjestelmän valmistelun aikana ennen testin aloittamista järjestelmän tehokkuuden varmentamiseksi. Lisäksi varastoliuokset on suositeltavaa analysoida, kun ne vaihdetaan, etenkin jos varastoliuoksen tilavuudessa ei ole tavanomaisten näytteenottojaksojen ajaksi riittäviä määriä kemikaalia. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joita ei voida havaita joissakin tai kaikissa testissä käytetyissä pitoisuuksissa, varastoliuokset on mitattava ja järjestelmän virtausnopeudet kirjattava muistiin, jotta nimellispitoisuudet voidaan laskea.

Kemikaalin annostelujärjestelmä

15. Menetelmä, jolla testikemikaali annostellaan järjestelmään, voi vaihdella kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Vesiliukoiset kemikaalit voidaan liuottaa testausveden alikvootteihin sellaisena pitoisuutena, jolla saadaan aikaiseksi testin tavoitepitoisuus läpivirtausjärjestelmässä. Kemikaalit, jotka ovat nestemäisiä huonelämpötilassa ja jotka liukenevat heikosti veteen, voidaan annostella käyttämällä neste-nestekyllästinmenetelmiä. Kemikaalit, jotka ovat kiinteitä huonelämpötilassa ja jotka liukenevat heikosti veteen, voidaan annostella käyttämällä lasivillaisia kyllästinkolonneja. Ensisijaisesti tulee käyttää kantoaineetonta testausjärjestelmää. Eri testikemikaaleilla on kuitenkin erilaisia fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, jotka todennäköisesti edellyttävät eri toimintatapoja kemikaalialtistusveden valmistamiselle. Liuottimia ja kantoaineita on syytä välttää

▼M6

seuraavista syistä: *i)* tietyt liuokset voivat olla myrkyllisiä ja/tai aiheuttaa ei-toivottuja tai odottamattomia hormonijärjestelmän reaktioita, *ii)* kemikaalien testaaminen niiden vesiliukoisuuden yläpuolella (kuten voi usein käydä liuottimia käytettäessä) voi johtaa siihen, että vaikuttavat pitoisuudet määritetään epätarkasti ja *iii)* liuottimien käyttö pidempiaikaisissa testeissä voi aiheuttaa huomattavaa biokalvojen muodostumista, joka liittyy mikrobien toimintaan. Vaikeasti testattavien testikemikaalien yhteydessä liuotinta voidaan käyttää viimesijaisena keinona, ja tällöin paras menetelmä on määritettävä OECD:n ohjeasiakirjan ”OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures” perusteella. Liuottimen valinta määräytyy kemikaalin kemiallisten ominaisuuksien perusteella. Sellaisia liuottimia, joiden on todettu olevan tehokkaita vesieliöihin kohdistuvaa myrkyllisyyttä testattaessa, ovat asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Jos kantoaineena käytetään liuotinta, liuotinpitoisuuksien on oltava pienempiä kuin pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC). OECD:n ohjeasiakirjassa suositeltu enimmäispitoisuus on 100 µl/l, ja hiljattain tehdyssä tarkistuksessa käytettäväksi suositellaan pitoisuutta, joka on 20 µl/l laimennusvedestä (12). Jos kantoaineina käytetään liuottimia, myös asianmukaiset liuotinkontrollit (puhdas vesi) on arvioitava muiden kuin liuotinkontrollien lisäksi. Jos kemikaalia ei voi annostella veden kautta joko fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien (heikon liukenevuuden) vuoksi tai siksi, että kemikaalin saatavuus on rajallista, sen annostelua ravinnon kautta voidaan harkita. Ravintoaltistusten parissa on tehty alustavia tutkimuksia, mutta tätä altistusreittiä ei yleensä käytetä. Menetelmän valinta on dokumentoitava ja vahvistettava analyyttisesti.

Testipitoisuuksien valinta

Suuren testipitoisuuden määrittäminen

16. Tämän testin tarkoituksia varten suurimmaksi testipitoisuudeksi on asetettava testikemikaalin liukoisuusraja; suurin siedetty pitoisuus (MTC) välittömästi myrkyllisten kemikaalien osalta; tai 100 mg/l sen mukaan, mikä arvo on pienin.

17. MTC-arvo on kemikaalin suurin testauspitoisuus, jonka aiheuttama välitön kuolleisuus on alle 10 prosenttia. Tässä lähestymistavassa oletetaan, että välittömästä myrkyllisyydestä on käytettävissä empiirisiä tietoja, joiden perusteella MTC-arvo voidaan arvioida. MTC-arvon arviointi voi olla epätarkkaa, ja siinä tarvitaan yleensä asiantuntijan näkemystä. Vaikka regressiomallien käyttö voi olla teknisesti paras tapa arvioida MTC-arvo, olemassa olevista välitöntä myrkyllisyyttä koskevista tiedoista voidaan johtaa siitä käyttökelpoinen arvio käyttämällä kolmasosaa (1/3) välittömästä LC_{50}-arvosta. Välitöntä myrkyllisyyttä koskevia tietoja ei kuitenkaan välttämättä ole saatavilla testattavasta lajista. Jos lajikohtaisia tietoja välittömästä myrkyllisyydestä ei ole saatavilla, voidaan tehdä 96 tunnin LC_{50}-testi niillä sammakonpoikasilla, jotka ovat AMA-tutkimuksessa testattaviin sammakonpoikasiin nähden edustavia (eli samassa kehitysvaiheessa). Jos saatavilla on tietoja muista vesieliölajeista (ts. LC_{50}-tutkimuksia, jotka on tehty kaloilla tai muilla sammakkolajeilla), voidaan haluttaessa käyttää myös asiantuntijan näkemystä, kun arvioidaan todennäköinen MTC-arvo lajienvälisen ekstrapolaation perusteella.

18. Jos kemikaali ei ole välittömästi myrkyllinen ja jos sen liukoisuus on yli 100 mg/l, suurimpana testipitoisuutena tulee vaihtoehtoisesti pitää arvoa 100 mg/l, koska tätä pitoisuutta pidetään yleensä ”käytännössä myrkyttömänä”.

▼M6

19. Myös staattisia menetelmiä, joissa testiliuos ei vaihdu, voidaan käyttää – vaikka niiden käyttöä ei suositella –, jos läpivirtausmenetelmät ovat epätarkoituksenmukaiset MTC-arvon määrittämisessä. Jos käytetään staattisia menetelmiä, testikemikaalin pitoisuuden stabiilius on dokumentoitava, ja sen on pysyttävä vaadituissa rajoissa. Vaihtoväliksi suositellaan kahtakymmentäneljää tuntia. Yli 72 tunnin vaihtovälit eivät ole hyväksyttäviä. Lisäksi jokaisen vaihtovälin lopussa on mitattava veden laatua koskevat parametrit (ts. liuennut happi, lämpötila, pH jne.) välittömästi ennen vaihtoa.

Testipitoisuuden vaihteluväli

20. Vähimmäisvaatimus on kolme testipitoisuutta ja puhdas vesi -kontrolli (ja kantaja-ainekontrolli, jos tarpeen). Suurimman ja pienimmän testipitoisuuden vähimmäiseron on oltava noin yksi suuruusluokka. Annoksen erottelussa enimmäisarvo on 0,1 ja vähimmäisarvo 0,33.

MENETTELY

Testin aloittaminen ja tekeminen

Päivä 0

21. Altistus tulee aloittaa, kun riittävä määrä esialtistuksen varastopopulaation sammakonpoikasista on saavuttanut kehitysvaiheen 51 (Nieuwkoopin ja Faberin (8) mukaan) ja kun niiden ikä hedelmöittymisen jälkeen on jotakuinkin tai täsmälleen 17 päivää. Koe-eläimiksi valitaan varastopopulaatiosta terveitä ja normaalin näköisiä sammakonpoikasia. Ne on laitettava yhteen astiaan, joka sisältää asianmukaisen määrän laimennusvettä. Jotta kehitysvaihe voidaan määrittää, sammakonpoikaset on otettava yksitellen pois yhteissäiliöstä käyttämällä pientä haavia tai siivilää, ja ne on siirrettävä läpinäkyvään mittausastiaan (esimerkiksi 100 mm:n petrimaljaan), joka sisältää laimennusvettä. Kehitysvaiheen määrittämisessä ei suositella käyttämään nukutusta, mutta sammakonpoikaset voi nukuttaa yksitellen trikaiinimetaanisulfonaatilla (esimerkiksi MS-222:lla) (100 mg/l), joka on puskuroitu asianmukaisesti natriumbikarbonaatilla (pH 7,0) ennen käsittelyä. Jos koe-eläimet nukutetaan, asianmukainen menetelmä, jolla esimerkiksi MS-222:ta käytetään nukuttamiseen, on pyydettävä laboratorioista, joissa siitä on kokemusta, ja menetelmä on ilmoitettava testitulosten yhteydessä. Eläimiä on käsiteltävä tämän siirtymän aikana varovasti, jotta käsittelystä aiheutuu mahdollisimman vähän stressiä ja jotta kaikki mahdolliset vammat vältetetään.

22. Eläinten kehitysvaihe määritetään käyttämällä kaksiokulaarista dissektiomikroskooppia. Jotta kehitysvaiheen vaihtelu voidaan pitää mahdollisimman pienenä, on tärkeää, että tämä määritys tehdään niin tarkasti kuin mahdollista. Nieuwkoopin ja Faberin (8) mukaan ensisijainen kehityksellinen tunnusmerkki, jonka perusteella vaiheessa 51 olevat organismit valitaan, on takajalan morfologia. Takajalkojen morfologiset ominaisuudet on tutkittava mikroskoopilla. Vaikka Nieuwkoopin ja Faberin (8) oppaan täydellisestä versiosta saa tarkat tiedot sammakonpoikasten kehitysvaiheista, vaiheen voi kuitenkin määrittää luotettavasti selvien morfologisten tunnusmerkkien perusteella. Seuraavassa taulukossa kehitysvaiheet on esitetty yksinkertaisesti ja vakioidusti, ja sitä voi käyttää koko tutkimuksen ajan, kun tavoitteena on tunnistaa eri kehitysvaiheisiin liittyvät selvät morfologiset tunnusmerkit, olettaen, että kehitys on normaalia.

▼M6

Taulukko 2.

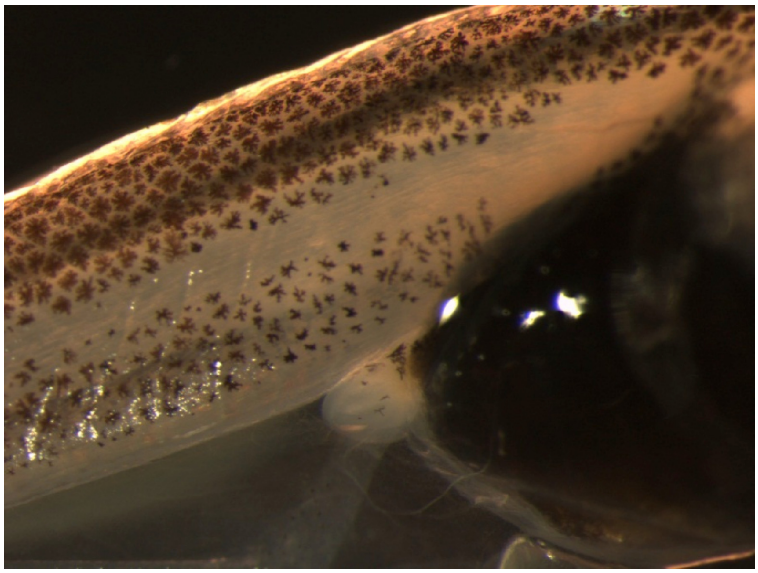
Nieuwkoopin ja Faberin ohjeisiin perustuvat selvät morfologiset kehitysvaiheiden tunnusmerkit.

Selvät morfologiset tunnusmerkit	Kehitysvaihe															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Takajalka	X	X	X	X	X	X	X									
Etujalka						X	X	X	X	X						
Kraniofasiaalinen rakenne										X	X	X	X			
Hajuhermon morfologia											X	X	X			
Pyrstön pituus													X	X	X	X

23. Testin alussa kaikkien sammakonpoikasten tulee olla vaiheessa 51. Selvin morfologinen tunnusmerkki tässä kehitysvaiheessa on takajalan morfologia, joka on esitetty kuvassa 1

Kuva 1.

X. laevis -lajin poikasen takajalan morfologia vaiheessa 51.



24. Kehitysvaiheen valinnan lisäksi myös koe-eläinten kokoon perustuvaa valintaa voidaan käyttää. Tällöin on mitattava koko ruumiin pituus (ei siis pelkästään kuonon ja peräaukon välistä pituutta) päivänä 0 alaryhmästä, joka koostuu noin kahdestakymmenestä (Nieuwkoopin ja Faberin) vaiheessa 51 olevasta sammakonpoikasesta. Kun tämän ryhmän eläinten koko ruumiin keskimääräinen pituus on laskettu, voidaan asettaa koe-eläinten koko ruumiin vähimmäis- ja enimmäisrajat siten, että keskiarvon vaihteluväli saa olla ± 3 mm (keskiarvot vaiheessa 51 olevien sammakonpoikasten koko ruumiin pituudesta, joka vaihtelee välillä 24,0–28,1 mm). Kunkin koe-eläimen kypsyyden määrittämisessä ensisijainen parametri on kuitenkin kehitysvaihe. Sammakonpoikaset, joilla on selvästi näkyviä epämuodostumia tai vammoja, on suljettava pois tutkimuksesta.

▼M6

25. Edellä kuvatut kehitysvaihekriteerit täyttävät sammakonpoikaset pidetään puhdasta kasvatusvettä sisältävässä säiliössä siihen saakka, kunnes kehitysvaiheen määritys on tehty. Määrityksen jälkeen toukat jaetaan satunnaisesti altistuskäsittelysäiliöihin, kunnes jokaisessa säiliössä on 20 toukkaa. Sen jälkeen jokaisesta säiliöstä tarkastetaan, onko siellä eläimiä, joiden ulkonäkö on poikkeava (niillä on esimerkiksi vammoja tai niiden uintikäyttäytyminen on poikkeavaa). Selvästi sairailta näyttävät sammakonpoikaset on poistettava käsittelysäiliöistä, ja niiden tilalle on laitettava keruusäiliöstä valitut uudet toukat.

Havainnot

26. Tarkempia tietoja testin päättämiseen liittyvistä menettelyistä ja sammakonpoikasten käsittelystä on OECD:n ohjeasiakirjassa ”Amphibian Thyroid Histology” (9).

Päivänä 7 tehtävät mittaukset

27. Päivänä 7 jokaisesta testisäiliöstä otetaan viisi satunnaisesti valittua sammakonpoikasta kustakin rinnakkaisnäytteestä. Tässä tulee käyttää sellaista satunnaistamismenetelmää, että jokaisella testin organismilla on yhtäläinen todennäköisyys tulla valituksi. Tämä voidaan saavuttaa käyttämällä mitä tahansa satunnaistamismenetelmää, mutta se edellyttää, että jokainen sammakonpoikanen otetaan haaviin. Ne sammakonpoikaset, joita ei valita, laitetaan takaisin säiliöön. Valitut sammakonpoikaset lopetetaan inhimillisesti liuoksessa, joka sisältää 150–200 mg/l esimerkiksi MS-222:ta; liuos on puskuroitava asianmukaisesti natriumbikarbonaatilla pH-arvon 7,0 saavuttamiseksi. Lopetetut sammakonpoikaset huuhdellaan vedellä ja kuivataan imeyttämällä vesi paperiin. Tämän jälkeen ne punnitaan lähimmän milligramman tarkkuudella. Jokaiselta sammakonpoikaselta määritetään takajalan pituus, kuonon ja peräaukon välinen pituus sekä kehitysvaihe (kaksiokulaarista dissektiomikroskooppia käyttäen).

Päivänä 21 tehtävät mittaukset (testin päätös)

28. Testin päättyessä (päivänä 21) loput sammakonpoikaset otetaan pois testisäiliöistä ja lopetetaan inhimillisesti liuoksessa, joka sisältää 150–200 mg/l esimerkiksi MS-222:ta; liuos on puskuroitava asianmukaisesti natriumbikarbonaatilla edellä kuvatun mukaisesti. Sammakonpoikaset huuhdellaan vedellä ja kuivataan imeyttämällä vesi paperiin. Tämän jälkeen ne punnitaan lähimmän milligramman tarkkuudella. Jokaiselta sammakonpoikaselta määritetään kehitysvaihe sekä mitataan kuonon ja peräaukon välinen pituus ja takajalan pituus.

29. Kaikki toukat laitetaan Davidsonin kiinnitysaineeseen 48–72 tunnin ajaksi joko kokonaisina näytteinä tai leikattuina pääkudosnäytteinä, jotka sisältävät alaleuan histologisia arviointeja varten. Histopatologiaa varten jokaisesta rinnakkaisnäytesäiliöstä on kerättävä yhteensä viisi sammakonpoikasta näytteeksi. Koska follikkelisolun korkeus määräytyy kehitysvaiheen mukaan (10), tarkoituksenmukaisin tapa ottaa näytteet histologisia analyyseja varten on käyttää sellaisia yksilöitä, joiden kehitysvaihe on sopiva, jos mahdollista. Kehitysvaiheeltaan sopivien yksilöiden valitsemiseksi kaikkien toukkien kehitysvaihe on määritettävä ennen valintaa, ja sen jälkeen ne on käsiteltävä tiedonkeruuta ja säilöntää varten. Tämä on tarpeen, koska kehitykseen kuuluvan normaalien poikkeamien vuoksi kehitysvaiheet jakautuvat eri tavoin kussakin rinnakkaisnäytesäiliössä.

30. Histopatologisiin analyyseihin valittujen eläinten (n = 5 kustakin rinnakkaisnäytteestä) tulee vastata kontrollien (yhdistetyt rinnakkaisnäytteet) kehitysvaiheiden mediaania, jos mahdollista. Jos rinnakkaisnäytesäiliöissä on enemmän kuin viisi sopivassa kehitysvaiheessa olevaa toukkaa, valitaan viisi toukkaa satunnaisotannalla.

▼M6

31. Jos rinnakkaisnäytesäiliöissä on vähemmän kuin viisi sopivassa kehitysvaiheessa olevaa toukkaa, näytteeksi otetaan satunnaisesti valittuja yksilöitä edellisestä tai seuraavasta kehitysvaiheesta, jotta näytteen koko olisi viisi toukkaa jokaisesta rinnakkaisnäytteestä. Päätös ottaa lisää toukkia joko edellisestä tai seuraavasta kehitysvaiheesta on tehtävä sen perusteella, miten kehitysvaiheiden arvioidaan kokonaisuudessaan jakautuvan kontrolliryhmissä ja kemikaalikäsittelyryhmissä. Toisin sanoen jos kemikaalikäsittely aiheuttaa kehityksen hidastumista, muut toukat on otettava edellisestä kehitysvaiheesta. Jos kemikaalikäsittely taas aiheuttaa kehityksen nopeutumista, muut toukat on otettava seuraavasta kehitysvaiheesta.

32. Jos sammakonpoikasen kehityksessä on vakavia muutoksia, jotka johtuvat testikemikaalilla käsittelystä, vaiheen jakautuminen kemikaalikäsittelyryhmissä ei välttämättä limity kontrolliryhmien kehitysvaiheen laskettuun mediaaniin. Vain näissä tapauksissa valintamenettelyä on muutettava siten, että käytetään muuta vaihetta kuin kontrolliryhmän mediaanivaihetta, jotta kilpirauhasen histopatologiaa varten saadaan näytteeksi toukkia, joiden kehitysvaihe on sopiva. Lisäksi jos vaiheet ovat määrittämättömiä (esimerkiksi epäsynkronisia), jokaisesta rinnakkaisnäytteestä tulee valita satunnaisesti viisi sammakonpoikasta histologista analyysia varten. Jos näytteeksi valitaan toukkia, joiden kehitysvaihe ei vastaa kontrolliryhmän mediaanikehitysvaihetta, syy on ilmoitettava.

Biologisten ominaisuuksien määrittäminen

33. Kahdenkymmenenyhden päivän mittaisen altistusvaiheen aikana ensisijaiset ominaisuudet mitataan päivinä 7 ja 21, mutta koe-eläimiä tulee silti havainnoida päivittäin. Taulukossa 3 on yhteenveto mitattavista ominaisuuksista ja vastaavista havainnointiajankohdista. Tarkempia tietoja apikaalisten ominaisuuksien mittaamisen ja histologisten arviointien teknisistä menetelmistä on OECD:n ohjeasiakirjoissa (9).

Taulukko 3.

AMA-tutkimuksen ensisijaisten ominaisuuksien havainnointiajankohdat

Apikaaliset ominaisuudet	Päivittäin	Päivä 7	Päivä 21
— kuolleisuus	•		
— kehitysvaihe		•	•
— takajalan pituus		•	•
— kuonon ja peräaukon välinen pituus		•	•
— ruumiin märkäpaino		•	•
— kilpirauhasen histologia			•

▼M6

Apikaaliset ominaisuudet

34. AMA-tutkimuksen apikaalisia ominaisuuksia ovat kehitysvaihe, takajalan pituus, kuonon ja peräaukon välinen pituus sekä märkäpaino, ja ne kuvataan lyhyesti jäljempänä. Lisää teknistä tietoa näiden tietojen keräämisestä on viiteohjeasiakirjoissa, mukaan luettuina käytettäväksi suositellut tietokoneavusteiset analyysimenetelmät.

Kehitysvaihe

35. *X. laevis* -lajin sammakonpoikasten kehitysvaihe määritetään Nieuwkoopin ja Faberin (8) laatimien kriteerien perusteella. Kehitysvaihetietojen perusteella määritetään se, onko kehitys nopeutunutta, epäsynkronista, viivästynyttä vai normaalia. Kehityksen nopeutuminen tai viivästyminen määritetään vertailemalla kontrolli- ja käsittelyryhmissä saavutettua mediaanivaihetta. Kehitys määritetään epäsynkroniseksi, kun tutkitut kudokset eivät ole epämuodostuneita tai poikkeavia, vaan kun morfogeneesin suhteellinen ajoittuminen tai eri kudosten kehittyminen yksittäisellä sammakonpojalla on häiriintynyt.

Takajalan pituus

36. Kilpirauhashormonit säätelevät takajalkojen eriytymistä ja kasvua, jotka ovat keskeisiä kehitysvaiheen määrittämisessä käytettyjä kehityksen tunnusmerkkejä. Kehitysvaiheen määrittämisessä takajalan kehittymistä arvioidaan laadullisesti, mutta tässä tutkimuksessa sitä tarkastellaan määrällisenä ominaisuutena. Siksi takajalan pituus mitataan ominaisuutena, jonka perusteella voidaan havaita kilpirauhasakseliin kohdistuvia vaikutuksia (kuva 2). Yhtenäisyyden vuoksi takajalan pituus mitataan vasemmasta takajalasta. Takajalan pituus arvioidaan testissä sekä päivänä 7 että päivänä 21. Päivänä 7 takajalan pituuden mittaaminen on helppoa, kuten kuvasta 2 näkyy. Päivänä 21 takajalan pituuden mittaaminen on kuitenkin hankalampaa jalassa olevien taipeiden vuoksi. Sen vuoksi takajalan pituuden mittaaminen päivänä 21 on aloitettava siitä kohdasta, jossa jalka yhtyy muuhun ruumiiseen, ja pituus on mitattava jalan keskiviivaa pitkin kaikkien kulmapoikkeamien läpi. Mahdollisen kilpirauhaseen kohdistuvan vaikutuksen kannalta takajalan pituudessa päivänä 7 havaittuja muutoksia pidetään merkittävinä, vaikka niitä ei ilmenisi enää päivänä 21. Pituuden mittaukset tehdään digitaalisista valokuvista käyttämällä kuvan analysointiohjelmaa, kuten OECD:n ohjeasiakirjassa ”Amphibian Thyroid Histology” (9) on kuvattu.

Ruumiin pituus ja märkäpaino

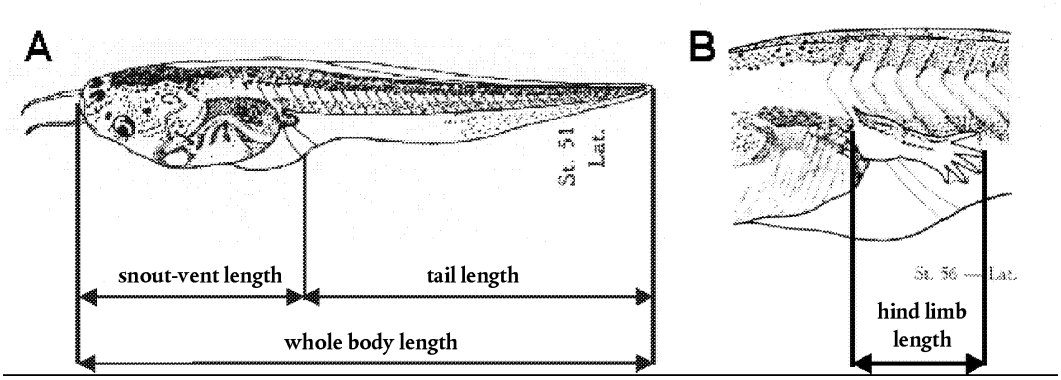
37. Kuonon ja peräaukon välisen pituuden (kuva 2) ja märkäpainon määrittämiset sisältyvät testiprotokollaan, jotta voidaan arvioida testikemikaalien mahdollisia vaikutuksia sammakonpoikasten kasvunopeuteen kontrolliryhmään verrattuna. Nämä tiedot ovat hyödyllisiä myös testikemikaalin yleisen myrkyllisyyden havaitsemisessa. Koska ylimääräisen veden poistaminen ennen painon määrittämistä voi aiheuttaa sammakonpoikasille stressiä ja ihovaurioita, nämä mittaukset tehdään päivänä 7 alaryhmään valituille sammakonpoikasille ja kaikille muille sammakonpoikasille testin päättyessä (päivänä 21). Käytä mittauksen pyrstönpuoleisena rajana peräaukon kallonpuoleista reunaa yhtenäisyyden vuoksi.

38. Kuonon ja peräaukon välistä pituutta käytetään arvioitaessa sammakonpoikasen kasvua, kuten kuvassa 2 on näytetty.

▼M6

Kuva 2.

A) Ruumiin pituuden mittausten tyypit ja B) X. laevis -lajin sammakonpoikasten takajalan pituuden mittaukset (1).



Kilpirauhasen histologia

39. Vaikka kehitysvaihe ja takajalan pituus ovat tärkeitä ominaisuuksia, kun arvioidaan altistukseen liittyviä muutoksia muodonvaihdoksen kehittymisessä, kehityksen viivästymistä ei sinänsä voida pitää diagnostisena indikaattorina kilpirauhasen toimintaa hillitsevästä vaikutuksesta. Jotkin muutokset saattavat olla havaittavissa vain tavanomaisessa histopatologisessa analyysissa. Diagnostisia kriteerejä ovat kilpirauhasen hypertrofia/atrofia, follikkelisolun hypertrofia ja follikkelisolun hyperplasia. Muita laadullisia kriteerejä ovat lisäksi follikkelin ontelon alue, kolloidin laatu ja follikkelisolun korkeus/muoto. Vaikeusaste (neljä luokkaa) on ilmoitettava. Tietoja näytteiden ottamisesta ja käsittelemisestä histologista analyysia varten ja histologisten analyysien tekemisestä kudosnäytteistä on saatavana sammakkoeläinten muodonvaihdostutkimusta koskevassa julkaisussa ”Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation” ja ”Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas” (9). Niiden laboratorioiden, jotka tekevät tämän tutkimuksen ensimmäistä kertaa (ensimmäisiä kertoja), on kysyttävä koulutusmielessä neuvoa kokeneilta patologeilta ennen histologisen analyysin aloittamista ja kilpirauhasen arvioimista. Kehityksen nopeutumiseen tai epäsynkroniaan viittaavat selvät ja huomattavat muutokset apikaalisissa ominaisuuksissa saattavat tehdä kilpirauhasten histopatologisen analyysin tekemisestä tarpeetonta. Vaikka selviä morfologisia muutoksia tai näyttöä kehityksen viivästymisestä ei ole, histologiset analyysit on kuitenkin tehtävä.

Kuolleisuus

40. Kaikki testisäiliöt on tarkastettava päivittäin kuolleiden sammakonpoikasten varalta, ja kuolleiden määrä on kirjattava muistiin jokaisesta säiliöstä. Kaikista kuolleisuuteen liittyvistä havainnoista on kirjattava päivämäärä, pitoisuus ja säiliön numero. Kuolleet eläimet on poistettava testisäiliöstä heti, kun ne havaitaan. Jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia, se saattaa olla merkki epätarkoituksenmukaisista testiolosuhteista tai testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista.

Muut havainnot

41. Poikkeava käyttäytyminen sekä selvästi nähtävät epämuodostumat ja leesiot on merkittävä muistiin. Kaikista poikkeavaan käyttäytymiseen sekä selviin epämuodostumiin tai leesioihin liittyvistä havainnoista on kirjattava

▼M6

päivämäärä, pitoisuus ja säiliön numero. Vesikolonnissa olevien sammakonpoikasten käyttäytyminen on normaalia, kun i) niiden pyrstö on päätä korkeammalla, ii) niiden peräevän liike on säännöllisen rytmikästä, iii) ne tulevat ajoittain pintaan, iv) niiden kiduskannet toimivat ja v) ne reagoivat ärsykkeisiin. Epänormaalia käyttäytymistä on esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjassa makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen ja ärsykkeisiin reagoimattomuus. Lisäksi selvät eron ravinnon kulutuksessa käsittelyjen välillä on merkittävä muistiin. Selviä epämuodostumia ja leesioita voivat olla esimerkiksi morfologiset poikkeamat (esimerkiksi raajojen epämuodostumat), verta vuotavat leesiot sekä bakteeri- tai sieni-infektiot. Nämä määritykset ovat laadullisia, ja ne on rinnastettava sairaudesta/stressistä kertoviin kliinisiin merkkeihin kontrollieläimiin vertaamalla. Jos näitä merkkejä esiintyy altistussäiliöissä enemmän tai nopeammin kuin kontrollisäiliöissä, niitä on pidettävä osoituksena selvästä myrkyllisyydestä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedonkeruu

42. Kaikki tiedot on kerättävä käyttäen elektronisia tai manuaalisia järjestelmiä, jotka ovat hyvää laboratoriokäytäntöä koskevien periaatteiden mukaisia. Tutkimustietojen tulee sisältää seuraavat seikat:

Testikemikaali:

— Testikemikaalin luonnehdinta: fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tiedot stabiiliudesta ja biohajoavuudesta.

— Kemialliset tiedot ja aineisto: laimennusten valmistelun menetelmä ja taajuus. Testikemikaalin tietoihin tulee sisältyä testikemikaalin varsinainen ja nimellinen pitoisuus ja joissakin tapauksissa tarvittaessa muu kuin lähtöaine. Testikemikaalimittaukset voi olla tarpeen tehdä niin varastoliuoksista kuin testiliuoksistakin.

— Liuotin (jos se on muu kuin vesi): liuottimen valinnan perustelu ja liuottimen luonnehdinta (tyyppi, käytetty pitoisuus).

Testiolosuhteet:

— Operatiiviset tiedot: havainnot, jotka liittyvät testijärjestelmän toimintaan sekä tukevaan ympäristöön ja infrastruktuuriin. Tyypillisiä tietoja ovat seuraavat: ympäristön lämpötila, testilämpötila, valoisa aika, altistusjärjestelmän kriittisten osien (kuten pumppujen, jaksolaskureiden, painemittareiden) tila, virtausnopeudet, vesimäärät, varastopullojen vaihdot ja ruokintatiedot. Yleisiä veden laadun parametreja ovat esimerkiksi pH, liuenneen hapen pitoisuus, johtavuus, kokonaisjodipitoisuus, emäksisyys ja kovuus.

— Poikkeamiset testimenetelmästä: näiden tietojen tulee sisältää kaikki tiedot tai sanalliset kuvaukset testimenetelmästä poikkeamisista.

Tulokset:

— Biologiset havainnot ja tiedot: näihin tietoihin tulee sisältyä havainnot kuolleisuudesta, ravinnon kulutuksesta, epänormaalista uintikäyttäytymisestä, letargiasta, tasapainon menetyksestä, epämuodostumista, leesioista jne. Ennalta määritetyin väliajoin tehtäviä havaintoja ja kerättäviä tietoja ovat kehitysvaihe, takajalan pituus, kuonon ja peräaukon välinen pituus sekä märkäpaino.

▼M6

— Tilastolliset analyysitekniikat ja käytettyjen tekniikoiden perustelut; tilastollisten analyysien tulokset mieluiten taulukkomuodossa.

— Histologiset tiedot: näiden tietojen tulee sisältää sanalliset kuvaukset sekä tiettyjen havaintojen vakavuus ja ilmenevyys pisteytettynä, kuten histopatologiaa koskevassa ohjeasiakirjassa on eritelty.

— Ad hoc -havainnot: näiden havaintojen tulee sisältää tutkimukseen liittyvät sanalliset kuvaukset, jotka eivät sovi edellä kuvattuihin kategorioihin.

Tietojen toimittaminen

43. Lisäys 2 sisältää päivittäistä tietojenkeruuta varten tarkoitetut lomakkeet, joita voidaan käyttää raakatietojen syöttämiseen ja yhteenvetotilastojen laskemiseen. Lisäksi käytettävissä ovat raportointitaulukot, joiden avulla voi kätevästi ilmoittaa ominaisuuksia koskevien tietojen yhteenvedot. Histologisten arviointien raportointitaulukot ovat myös lisäyksessä 2.

Suorituskykyvaatimukset ja testin hyväksyttävyys/validiteetti

44. Selvät poikkeamat testimenetelmästä johtavat yleensä siihen, että tutkimuksesta saatuja tietoja ei voida hyväksyä tulkittaviksi tai raportoitaviksi. Seuraavat, taulukossa 4 esitetyt kriteerit on sen vuoksi laadittu ohjeeksi toteutetun testin laadun ja kontrolliorganismien suorituskyvyn määrittämiseen.

Taulukko 4.

AMA-tutkimuksen suorituskykyvaatimukset

Arviointiperuste	Hyväksyttävät rajat
Testipitoisuudet	Pitoisuudet pysyneet ≤ 20 prosentin sisällä variaatiokertoimesta (mitatun testipitoisuuden vaihtelevuus) 21 päivän testin aikana
Kontrollien kuolleisuus	≤10 % – kuolleisuus missä tahansa kontrollien rinnakkaisnäytteessä saa olla enintään kaksi sammakonpoikasta
Kontrollien mediaani vähimmäiskehitysvaihe testin lopussa	57
Kehitysvaiheen jakauma kontrolliryhmässä	Kehitysvaiheen jakauman 10. ja 90. persentiilin välinen ero saa olla enintään neljä vaihetta
Liuennut happi	≥ 40 % ilman kyllästysarvosta (*)
pH	pH-arvon on pysyttävä välillä 6,5–8,5. Rinnakkaisnäytteiden/käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 0,5.
Veden lämpötila	22° ± 1 °C – rinnakkaisnäytteiden/käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 0,5 °C
Testipitoisuudet, joihin ei liity selvää myrkyllisyyttä	≥ 2
Rinnakkaisnäytteiden suorituskyky	≤ 2 rinnakkaisnäytettä testin aikana saa heikentyä

▼M6

Arviointiperuste	Hyväksyttävät rajat
Liuottimen käytön edellytykset	Jos kantoaineena käytetään liuotinta, on käytettävä sekä liuotinkontrollia että puhdasvesikontrollia, ja tulokset on ilmoitettava.
	Tilastollisesti merkitsevät erot liuotinkontrolli- ja vesikontrolliryhmien välillä käsitellään erikseen. Ks. lisätiedot jäljempänä.
Staattista menetelmää (jossa liuos ei vaihdu) koskevat edellytykset	Edustavat kemialliset analyysit ennen vaihtoa ja sen jälkeen on raportoitava.
	Ammoniakkipitoisuudet tulee mitata juuri ennen vaihtoa.
	Kaikki lisäyksessä 1 olevassa taulukossa 1 luetellut veden laatuparametrit on mitattava juuri ennen vaihtoa.
	Vaihtoväli saa olla enintään 72 tuntia.
	Asianmukainen ruokinta-aikataulu (50 prosenttia kaupallisen sammakonpoikasten ruoan päivittäisestä ruoka-annoksesta)

(*) Veden ilmastusta voidaan ylläpitää kuplalaitteilla. Kuplalaitteiden teho on suositeltavaa säätää siten, etteivät ne aiheuta tarpeetonta stressiä sammakonpoikasille.

Testin pätevyys

45. Jotta testi olisi hyväksyttävä/validi, seuraavien vaatimusten on täytyttävä:

Validi koe testissä, jonka on tarkoitus olla negatiivinen kilpirauhasen toiminnan osalta:

(1) Kuolleisuus ei saa ylittää kymmentä prosenttia yhdessäkään käsittelyssä (mukaan luettuina kontrollit). Kuolleisuus ei saa olla enempää kuin kolme sammakonpoikasta yhdessäkään rinnakkaisnäytteessä. Muutoin rinnakkaisnäytettä on pidettävä vaarantuneena.

(2) Analyysia varten saatavilla on oltava vähintään kaksi käsittelypitoisuutta ja kaikki neljä vaarantumatonta rinnakkaisnäytettä.

(3) Analyysia varten saatavilla on oltava vähintään kaksi käsittelypitoisuutta, joissa ei ole merkkejä selvästä myrkyllisyydestä.

Validi koe testissä, jonka on tarkoitus olla positiivinen kilpirauhaseen kohdistuvan vaikutuksen osalta:

(1) Kontrolliryhmässä kuolleisuus saa olla enintään kaksi sammakonpoikasta/rinnakkaisnäyte.

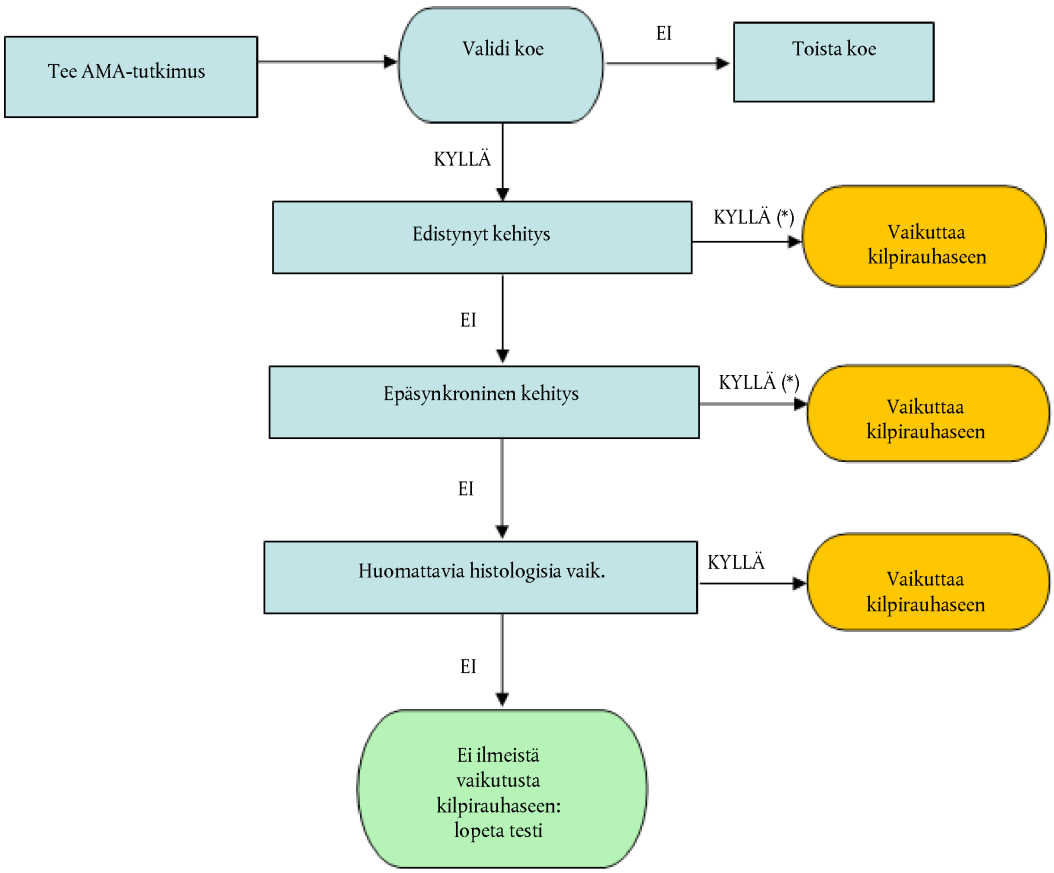
AMA-tutkimuksen päätöksentekologiikka

46. AMA-tutkimusta varten laadittiin päätöksentekologiikka, jonka tarkoituksena on antaa loogista apua biologisen testin tekemisessä ja sen tulosten tulkinnassa (ks. kuvassa 3 oleva vuokaavio). Päätöksentekologiikassa painotetaan ominaisuuksia seuraavasti: edistynyttä kehitystä, epäsynkronista kehitystä ja kilpirauhasen histopatologiaa painotetaan voimakkaasti, kun taas viivästynyttä kehitystä, kuonon ja peräaukon välistä pituutta ja märkäpainoa (parametreja, joihin yleinen myrkyllisyys saattaa vaikuttaa) painotetaan vastaavasti vähemmän.

▼M6

Kuva 3.

AMA-tutkimuksen päätöksentekologiikka



(*) Jotkin sääntelyviranomaiset voivat edellyttää histologisia tutkimuksia siitä huolimatta, että edistyneessä ja epäsynkronisessa kehityksessä voi olla merkittäviä eroja. Tämän testin tekevää tahoa kehotetaan ottamaan yhteyttä kyseisiin viranomaisiin ennen testin tekemistä sen selvittämiseksi, mitkä ovat vaadittavat ominaisuudet.

Edistynyt kehitys (määritetty kehitysvaiheen, kuonon ja peräaukon välisen pituuden sekä takajalan pituuden perusteella)

47. Edistyneen kehityksen tiedetään ilmenevän vain kilpirauhashormoniin liittyvien vaikutusten kautta. Nämä voivat olla perifeerisiin kudoksiin kohdistuvia vaikutuksia, kuten suora vuorovaikutus kilpirauhashormonin reseptorin (kuten T4:n) kanssa, tai vaikutuksia, jotka muuttavat verenkierrossa olevia kilpirauhashormonipitoisuuksia. Kummassakin tapauksessa vaikutuksia pidetään riittävänä osoituksena siitä, että kemikaali vaikuttaa kilpirauhaseen. Edistynyttä kehitystä arvioidaan jommallakummalla seuraavasta kahdesta tavasta, Ensinnäkin yleistä kehitysvaihetta voidaan arvioida käyttämällä Nieuwkoopin ja Faberin (8) oppaassa tarkemmin kuvattua vakiolähestymistapaa. Toiseksi tiettyjä morfologisia piirteitä voidaan kvantifioida, kuten takajalan pituutta päivinä 7 ja 21, sillä se liittyy positiivisesti kilpirauhashormonireseptoriin kohdistuviin agonistisiin vaikutuksiin. Jos edistynyt kehitys tai takajalan pituus on tilastollisesti merkitsevää, testi osoittaa, että kemikaali vaikuttaa kilpirauhaseen.

▼**M6**

48. Koe-eläinten arviointi nopeutuneen kehityksen kannalta suhteessa kontrollipopulaatioon perustuu seuraavasta neljästä ominaisuudesta tehtävien tilastollisten analyysien tuloksiin:

— takajalan pituus (kuonon ja peräaukon välisellä pituudella normalisoituna) tutkimuspäivänä 7

— takajalan pituus (kuonon ja peräaukon välisellä pituudella normalisoituna) tutkimuspäivänä 21

— kehitysvaihe tutkimuspäivänä 7

— kehitysvaihe tutkimuspäivänä 21.

49. Takajalan pituutta koskevat tilastolliset analyysit on tehtävä vasemman takajalan pituutta koskevien mittausten perusteella. Takajalan pituus normalisoidaan laskemalla kunkin yksilön takajalan pituuden sekä kuonon ja peräaukon välisen pituuden suhde. Sen jälkeen vertaillaan kunkin käsittelytason normalisoitujen arvojen keskiarvoa. Kehitystä pidetään nopeutuneena, jos keskimääräinen takajalan pituus (normalisoituna) jossakin kemikaalikäsittelyryhmässä on merkittävästi suurempi kontrolliryhmään verrattuna tutkimuspäivänä 7 ja/tai tutkimuspäivänä 21 (ks. lisäys 3).

50. Kehitysvaiheen tilastolliset analyysit on tehtävä Nieuwkoopin ja Faberin (8) kuvaamien morfologisten kriteerien mukaisesti määritettyjen kehitysvaiheiden perusteella. Kehitystä pidetään nopeutuneena, jos monien dikotomisten tietojen analyysissa havaitaan, että kehitysvaihetta koskevat arvot jossakin kemikaalikäsittelyryhmässä ovat huomattavasti suuremmat kontrolliryhmään verrattuna tutkimuspäivänä 7 ja/tai tutkimuspäivänä 21.

51. AMA-testimenetelmässä mihin tahansa edellä mainittuun neljään ominaisuuteen kohdistuvaa merkitsevää vaikutusta pidetään riittävänä, jotta kehitystä voidaan pitää nopeutuneena. Toisin sanoen merkitseviä vaikutuksia takajalan pituuteen tietyssä aikapisteessä ei tarvitse vahvistaa merkitsevillä vaikutuksilla takajalan pituuteen jossakin toisessa aikapisteessä eikä merkitsevillä vaikutuksilla kehitysvaiheeseen tässä nimenomaisessa aikapisteessä. Vastaavasti merkitseviä vaikutuksia kehitysvaiheeseen tietyssä aikapisteessä ei tarvitse vahvistaa merkitsevillä vaikutuksilla kehitysvaiheeseen jossakin toisessa aikapisteessä eikä merkitsevillä vaikutuksilla takajalan pituuteen tässä nimenomaisessa aikapisteessä. Nopeutunutta kehitystä koskevan näytön painoarvo kuitenkin lisääntyy, jos merkittäviä vaikutuksia havaitaan useamman kuin yhden ominaisuuden yhteydessä.

Epäsynkroninen kehitys (määritetty kehitysvaihekriteerien perusteella)

52. Epäsynkronista kehitystä kuvaa morfogeneesin suhteellisen ajoittumisen tai yhden sammakonpoikasen eri kudosten kehittymisen häiriintyminen. Vaikeus määrittää organismin kehitysvaihetta selvästi käyttämällä morfologisia ominaisuuksia, joita pidetään tietylle kehitysvaiheelle tyypillisinä, osoittaa, että kudokset kehittyvät muodonvaihdoksen kautta epäsynkronisesti. Epäsynkroninen kehitys on merkki kilpirauhaseen kohdistuvasta vaikutuksesta. Ainoat tunnetut vaikutustavat, jotka aiheuttavat epäsynkronista kehitystä, johtuvat kemikaalien vaikutuksista, jotka kohdistuvat perifeeriseen kilpirauhashormonin toimintaan ja/tai kilpirauhashormonin metaboliaan kehittyvissä kudoksissa, mikä on havaittu esimerkiksi dejodinaasin estäjien yhteydessä.

▼**M6**

53. Koe-eläinten arviointi epäsynkronisen kehityksen kannalta suhteessa kontrollipopulaatioon perustuu koe-eläinten morfologiseen arviointiin tutkimuspäivänä 7 ja tutkimuspäivänä 21.

54. Normaalin kudoksen muodostumisen kehitysjärjestyksen tunnistaminen perustuu Nieuwkoopin ja Faberin (8) laatimaan kuvaukseen *Xenopus laeviksen* normaalista kehityksestä. Käsite ”epäsynkroninen kehitys” tarkoittaa nimenomaan niitä poikkeamia sammakonpoikasen morfologisessa kehityksessä, joiden perusteella kehitysvaihetta ei voida määrittää varmasti Nieuwkoopin ja Faberin (8) laatimien kriteerien mukaan, koska keskeisissä morfologisissa tunnusmerkeissä on piirteitä eri vaiheista.

55. Kuten käsitteestä ”epäsynkroninen kehitys” käy ilmi, huomioon tulee ottaa vain ne tapaukset, joissa esiintyy poikkeamia tiettyjen kudosten muodostumisen etenemisessä suhteessa muiden kudosten muodostumisen etenemiseen, Joissakin klassisissa fenotyypeissä etujalan kehitys on viivästynyt tai se puuttuu huolimatta siitä, että takajalat ja pyrstön kudokset ovat kehittyneet normaalisti tai tavallista nopeammin, tai kidukset ovat resorboituneet tavallista aikaisemmin suhteessa takajalan morfogeneesiin ja pyrstön resorboitumiseen. Eläin kirjataan epäsynkronisesti kehittyneeksi, jos sitä ei voida luokitella tiettyyn vaiheeseen, koska se ei täytä valtaosaa Nieuwkoopin ja Faberin (8) tietyn kehitysvaiheen tunnusmerkeistä, tai jos yhden tai useamman keskeisen ominaisuuden kehitys on viivästynyt tai nopeutunut tuntuvasti (esimerkiksi jos etujalat eivät ole kehittyneet, vaikka pyrstö on kokonaan resorboitunut). Tämä arviointi tehdään laadullisesti, ja siinä on tutkittava kaikki Nieuwkoopin ja Faberin (8) luettelemat tunnusmerkit. Havainnoitavien eläinten eri tunnusmerkkien kehitysvaihetta ei kuitenkaan tarvitse kirjata muistiin. Eläimiä, joiden kehitys näyttää epäsynkroniselta, ei luokitella mihinkään Nieuwkoopin ja Faberin (8) kehitysvaiheeseen.

56. Kun sellaisia tapauksia, joiden morfologinen kehitys on poikkeavaa, määritellään luokkaan ”epäsynkroninen kehitys”, keskeinen kriteeri on se, että kudosten muodostumisen ja morfogeneesin suhteellinen ajoittuminen on häiriintynyt, kun taas niiden kudosten morfologia, joissa havaitaan kemikaalin vaikutuksia, ei ole erityisen poikkeava. Tällaista selvien morfologisten poikkeavuuksien tulkintaa voidaan havainnollistaa seuraavalla esimerkillä: hidastunut takajalan morfogeneesi suhteessa muiden kudosten kehittymiseen täyttää ”epäsynkronisen kehityksen” kriteerin, kun taas niitä tapauksia, joissa takajalkoja ei ole tai joissa niiden lukumäärä on poikkeava (ektrodaktylia, polydaktylia) tai raajassa on muita selviä epämuodostumia, ei tule luokitella kohtaan ”epäsynkroninen kehitys”.

57. Tässä yhteydessä tärkeimpiä morfologisia tunnusmerkkejä, jotka on arvioitava niiden yhteisen metamorfisen etenemisen kannalta, ovat takajalan morfogeneesi, etujalan morfogeneesi, etujalan kehittyminen, pyrstön resorboitumisen vaihe (etenkin pyrstöevän resorboituminen) ja pään morfologia (esimerkiksi kidusten koko ja niiden resorboitumisen vaihe, alaleuan morfologia, Meckelin ruston ulostyöntyminen).

58. Kemikaalin vaikutustavan mukaan erilaisia selviä morfologisia fenotyyppejä saattaa ilmetä. Joissakin klassisissa fenotyypeissä etujalan kehitys on viivästynyt tai se puuttuu huolimatta siitä, että takajalat ja pyrstön kudokset ovat kehittyneet normaalisti tai tavallista nopeammin, tai että kidukset ovat resorboituneet tavallista aikaisemmin suhteessa takajalan ja pyrstön muodostumiseen.

▼**M6**

Histopatologia

59. Jos kemikaali ei aiheuta selvää myrkyllisyyttä eikä nopeuta kehitystä tai aiheuta epäsynkronista kehitystä, kilpirauhasen histopatologia arvioidaan käyttämällä asianmukaista ohjeasiakirjaa (9). Kehityksen viivästyminen silloin, kun myrkyllisyyttä ei ole todettu, on vahva osoitus siitä, ettei kemikaali vaikuta kilpirauhaseen, mutta kehitysvaiheen analyysi on vähemmän herkkä ja diagnostinen kuin kilpirauhasen histopatologinen analyysi. Siksi tässä tapauksessa on tehtävä kilpirauhasen histopatologiset analyysit. Kilpirauhasen histologiaan kohdistuvia vaikutuksia on todettu, vaikka kehitykseen kohdistuvia vaikutuksia ei olisikaan. Jos kilpirauhasen histopatologiassa ilmenee muutoksia, kemikaalin katsotaan vaikuttavan kilpirauhaseen, Jos kilpirauhasessa ei havaita kehitysviipeitä tai histologisia leesioita, kemikaalin ei katsota vaikuttavan kilpirauhaseen. Tämä päätös perustuu siihen, että THS-hormoni vaikuttaa kilpirauhaseen, ja mikä tahansa kemikaali, joka muuttaa verenkierrossa olevan kilpirauhashormonin määrää niin paljon, että THS:n eritys muuttuu, aiheuttaa myös histopatologisia muutoksia kilpirauhasessa. Erilaiset vaikutustavat ja -mekanismit voivat muuttaa verenkierrossa olevan kilpirauhashormonin määrää. Vaikka kilpirauhashormonipitoisuus viittaa kilpirauhaseen liittyvään vaikutukseen, sen perusteella ei kuitenkaan voida määrittää, mikä vaikutustapa tai -mekanismi saa tämän vasteen aikaan.

60. Koska tämä ominaisuus ei sovellu analysoitavaksi tavanomaisilla tilastollisilla lähestymistavoilla, kemikaalille altistumiseen liittyvän vaikutuksen määrittää patologi, joka laatii siitä asiantuntijalausunnon.

Viivästynyt kehitys (määritetty kehitysvaiheen, takajalan pituuden, painon sekä kuonon ja peräaukon välisen pituuden perusteella)

61. Kehitys saattaa viivästyä kilpirauhasesta johtumattomien mekanismien ja epäsuoran myrkyllisyyden vuoksi. Lievät kehitysviiveet, joihin liittyy selviä merkkejä myrkyllisyydestä, viittaavat todennäköisesti ei-spesifiseen myrkylliseen vaikutukseen. Kilpirauhaseen kohdistumattoman myrkyllisyyden arviointi on tärkeä osa testiä, jotta väärien positiivisten tulosten todennäköisyyttä voidaan vähentää. Liiallinen kuolleisuus on ilmiselvä merkki siitä, että on myös muita myrkyllisiä mekanismeja. Vastaavasti kasvun lievä väheneminen märkäpainon ja/tai kuonon ja peräaukon välisen pituuden perusteella määritettynä viittaa siihen, ettei myrkyllisyys kohdistu kilpirauhaseen. Kasvun selvää voimistumista on yleisesti havaittu sellaisten kemikaalien yhteydessä, jotka vaikuttavat normaaliin kehitykseen kielteisesti. Näin ollen se, että eläimet ovat mahdollisesti suuria, ei välttämättä tarkoita sitä, etteikö myrkyllisyys kohdistuisi kilpirauhaseen. Kilpirauhaseen kohdistuvaa myrkyllisyyttä ei kuitenkaan tule koskaan määrittää pelkästään kasvun perusteella. Kilpirauhaseen kohdistuva vaikutus on määritettävä kasvun, kehitysvaiheen ja kilpirauhasen histopatologian perusteella. Selvän myrkyllisyyden määrittämisessä on otettava huomioon myös muita ominaisuuksia, joita ovat esimerkiksi turvotus, verta vuotavat leesiot, letargia, vähentynyt ruoankulutus, epäsäännöllinen/muuttunut uintikäyttäytyminen jne. Jos kaikki testipitoisuudet aiheuttavat selvän myrkyllisyyden merkkejä, testikemikaali tulee arvioida uudelleen pienemmillä testipitoisuuksilla, ennen kuin päätetään, vaikuttaako kemikaali mahdollisesti kilpirauhaseen vai ei.

62. Tilastollisesti merkitsevät kehitysviipeet silloin, kun muita selvän myrkyllisyyden merkkejä ei ole, viittaavat siihen, että kemikaali vaikuttaa kilpirauhaseen (antagonistisesti). Jos vahvoja tilastollisia vasteita ei ole, tämä tulos voidaan lisätä kilpirauhasen histopatologiaa koskeviin tuloksiin.

▼M6

Tilastolliset analyysit

63. Aineiston tilastollisissa analyyseissa on mieluiten noudatettava ympäristömyrkyllisyystietojen tilastollista analyysia koskevassa asiakirjassa ”Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application” (11) kuvattuja menettelyjä. Kaikkien jatkuvien määrällisten ominaisuuksien (takajalan pituus, kuonon ja peräaukon välinen pituus, märkäpaino), jotka ovat yhdenmukaisia monotonisen annosvasteen kanssa, yhteydessä on sovellettava Jonckheere-Terpstran testiä alaspäin askeltavasti merkitsevän käsittelyvaikutuksen toteamiseksi.

64. Niitä jatkuvia ominaisuuksia, jotka eivät ole yhdenmukaisia monotonisen annosvasteen kanssa, koskevista tiedoista on arvioitava normaalius (mieluiten käyttämällä Shapiro-Wilkin tai Anderson-Darlingin testiä) ja varianssin homogeenisuus (mieluiten käyttämällä Levenen testiä). Molemmat testit tehdään ANOVA-menetelmästä saaduilla jäännöksillä. Näiden virallisten normaaliutta ja varianssin homogeenisuutta koskevien testien sijasta voidaan käyttää myös asiantuntijan arvioita, joskin ensisijaisesti tulee käyttää virallisia testejä. Jos havaitaan ei-normaaliutta tai varianssin heterogeenisuutta, on käytettävä normalisoivaa, varianssia stabiloivaa muunnosta. Jos tiedot (kenties muunnoksen jälkeen) jakautuvat normaalisti homogeenisen varianssin yhteydessä, merkittävä käsittelyvaikutus määritetään Dunnettin testin avulla. Jos tiedot (kenties muunnoksen jälkeen) jakautuvat normaalisti heterogeenisen varianssin yhteydessä, merkittävä käsittelyvaikutus määritetään Tamhane-Dunnettin testin tai T3-testin tai Mann-Whitney-Wilcoxonin U-testin avulla. Jos normalisoivaa muunnosta ei löydy, merkittävä käsittelyvaikutus määritetään Mann-Whitney-Wilcoxonin U-testillä käyttäen Bonferroni-Holm-korjausta p-arvoihin. Dunnettin testiä sovelletaan riippumatta ANOVA F-testeistä, ja Mann-Whitneyn testiä sovelletaan riippumatta yleisistä Kruskall-Wallisin testeistä.

65. Merkittävää kuolleisuutta ei odoteta, mutta se on arvioitava alaspäin askeltavalla Cochran-Armitage-testillä, kun tiedot ovat yhdenmukaiset annosvasteen monotonisuuden kanssa. Muussa tapauksessa on käytettävä Fisherin tarkkaa testiä ja Bonferroni-Holm-korjausta.

66. Kehitysvaiheeseen kohdistuva merkitsevä käsittelyvaikutus määritetään soveltamalla rinnakkaisnäytteiden mediaaneihin käytettyä Jonckheere-Terpstran testiä alaspäin askeltavasti. Vaihtoehtoisesti – ja mieluiten – vaikutuksen määrittämisessä tulee käyttää monidikotomista Jonckheeren testiä 20. ja 80. persentiilin välillä, koska siinä otetaan huomioon jakautumisprofiilin muutokset.

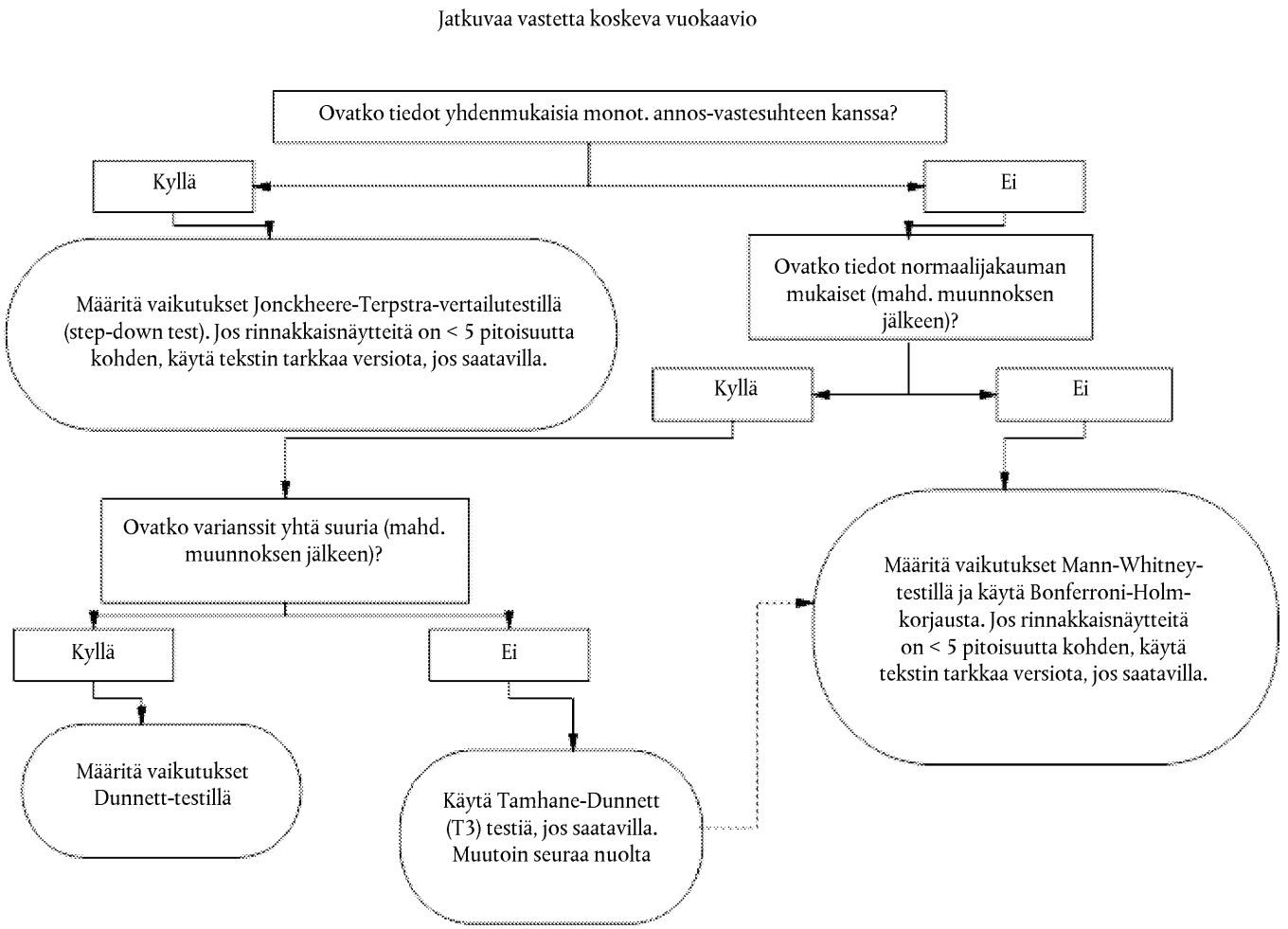
67. Tarkoituksenmukainen analyysiyksikkö on rinnakkaisnäyte, joten tiedot koostuvat rinnakkaisnäytteiden mediaaneista, jos käytetään Jonckheere-Terpstran testiä tai Mann-Whitneyn U-testiä, tai rinnakkaisnäytteiden keskiarvoja, jos käytetään Dunnettin testiä. Annosvasteen monotonisuus voidaan arvioida silmämääräisesti rinnakkaisnäytteestä sekä käsittelyjen keskiarvoista tai mediaaneista tai virallisista testeistä, kuten edellä on kuvattu (11). Jos käsittelyä tai kontrollia kohti on vähemmän kuin viisi rinnakkaisnäytettä, on käytettävä Jonckheere-Terpstran ja Mann-Whitneyn testien permutaatioversioita, jos ne ovat saatavilla. Kaikkien testien tilastollista merkitsevyyttä arvioidaan merkitsevyystasolla 0,05.

68. Kuvassa 4 on vuokaavio, joka koskee tilastollisten testien tekemistä jatkuvista tiedoista.

▼M6

Kuva 4.

Vuokaavio jatkuviin vastetietoihin sovellettavista tilastollisista lähestymistavoista.



▼M6

Tietojen analysointia koskevia erityishuomioita

Vaarantuneiden käsittelytasojen käyttö

69. Useita tekijöitä otetaan huomioon, kun määritetään, esiintyykö rinnakkaisnäytteessä tai koko käsittelyssä selvää myrkyllisyyttä, jolloin näytteet tulisi poistaa analyysista. Selväksi myrkyllisyydeksi määritellään se, että missä tahansa rinnakkaisnäytteessä on enemmän kuin kaksi kuollutta koe-eläintä ja kun kuolema voidaan selittää ainoastaan myrkyllisyydellä teknisen virheen sijasta. Muita selvän myrkyllisyyden merkkejä ovat verenvuoto, epänormaali käyttäytyminen, epänormaalit uintikuviot, ruokahaluttomuus ja muut sairaudesta kertovat kliiniset merkit. Muiden subletaalien myrkyllisyyden merkkien osalta laadulliset arvioinnit voivat olla tarpeen, ja niissä on otettava aina huomioon puhtaan veden kontrolliryhmä.

Liuotinkontrollit

70. Liuottimen käyttöä on harkittava vasta viimesijaisena keinona, kun kaikki muut kemikaalin annosteluvaihtoehdot on kokeiltu. Jos liuotinta käytetään, sen kanssa on käytettävä puhtaan veden kontrollia. Testin lopuksi on arvioitava liuottimen mahdolliset vaikutukset. Tämä tehdään vertailemalla liuotinkontrolliryhmää ja puhtaan veden kontrolliryhmää tilastollisesti. Oleellisimmat ominaisuudet, jotka tässä analyysissa tulee ottaa huomioon, ovat kehitysvaihe, kuonon ja peräaukon välinen pituus sekä märkäpaino, koska muuhun kuin kilpirauhaseen kohdistuva myrkyllisyys saattaa vaikuttaa niihin. Jos näissä ominaisuuksissa havaitaan tilastollisesti merkitseviä eroja puhtaan veden kontrolliryhmän ja liuotinkontrolliryhmän välillä, tutkimuksen päätepisteet vastemittausten osalta on määritettävä käyttämällä puhtaan veden kontrollia. Jos kontrolliryhmien välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa kaikkien mitattujen vastemuuttujien osalta, tutkimuksen päätepisteet vastemittausten osalta on määritettävä käyttäen yhdistettyjä laimennusvesi- ja liuotinkontrolleja.

Käsittelyryhmät, jotka saavuttavat vähintään kehitysvaiheen 60

71. Vaiheen 60 jälkeen sammakonpoikasten koko ja paino pienenevät kudosten resorboitumisen ja absoluuttisen vesipitoisuuden vähenemisen vuoksi. Märkäpainon sekä kuonon ja peräaukon välisen pituuden mittausta ei siis voida käyttää asianmukaisesti kasvunopeuden erojen tilastollisissa analyyseissa. Siksi niiden organismien, joiden kehitysvaihe on >NF60, märkäpaino- ja pituustiedot on sensuroitava, eikä niitä voida käyttää rinnakkaisnäytteiden keskiarvojen tai mediaanien analyyseissa. Näiden kasvuun liittyvien parametrien analysoimisessa voidaan käyttää kahta eri toimintatapaa.

72. Ensimmäinen toimintatapa on ottaa märkäpainon ja/tai kuonon ja peräaukon välisen pituuden tilastollisissa analyyseissa huomioon vain ne sammakonpoikaset, joiden kehitysvaihe on aiempi tai vastaava kuin vaihe 60. Tästä toimintatavasta ajatellaan saatavan riittävän vankkoja tietoja mahdollisten kasvuun kohdistuvien vaikutusten vakavuudesta, kunhan vain pieni osuus koe-eläimistä poistetaan analyyseista (≤20 prosenttia). Jos suurempi määrä sammakonpoikasista on ylittänyt kehitysvaiheen 60 (≤20 prosenttia) yhdessä tai useammassa nimellispitoisuudessa, on tehtävä kaikilla sammakonpoikasilla, kaksisuuntainen ANOVA, joka perustuu hierarkkiseen varianssirakenteeseen, jotta voidaan arvioida kemikaalikäsittelyjen kasvuun kohdistuvat vaikutukset samalla kun otetaan huomioon myöhäisvaiheen kehityksen vaikutus kasvuun. Lisäyksessä 3 on ohjeet painon ja pituuden kaksisuuntaisesta ANOVA-analyysista.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris.

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris.

(4) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris.

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729–96(2002), Philadelpia, PA.

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus (FETAX). E 1439–98.

(7) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. & Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539–551.

(8) Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York.

(9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris.

(10) Dodd, M.H.I. & Dodd, J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts, B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467–599.

(11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment, no. Series on Testing and Assessment, No. 54. Paris.

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Tarkistus. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69–92.

▼**M6**

Lisäys 1

Taulukko 1

21 päivän mittaisen AMA-tutkimuksen koeolosuhteet

Koe-eläin		*Xenopus laevis* -toukat	
Toukkavaihe testin alussa		Nieuwkoopin ja Faberin vaihe 51	
Altistusaika		21 päivää	
Toukkien valintaperusteet		Kehitysvaihe ja kokonaispituus (valinnainen)	
Testipitoisuudet		Vähintään kolme pitoisuutta, joiden väli on suurin piirtein yksi suuruusluokka	
Altistusmenetelmä		Läpivirtaus (ensisijainen) ja/tai staattinen menetelmä, jossa liuos ei vaihdu	
Testausjärjestelmän virtausnopeus		25 ml/min (koko tilavuus vaihtuu noin 2,7 h:n välein)	
Ensisijaiset ominaisuudet / määrityspäivät		Kuolleisuus	Päivittäin
		Kehitysvaihe	Päivät 7 ja 21
		Takajalan pituus	Päivät 7 ja 21
		Kuonon ja peräaukon välinen pituus	Päivät 7 ja 21
		Ruumiin märkäpaino	Päivät 7 ja 21
		Kilpirauhasen histologia	Päivä 21
Laimennusvesi-/laboratoriokontrolli		Deklooratttu vesijohtovesi (hiilisuodatettu) tai vastaava laboratoriolähde	
Toukkien tiheys		20 toukkaa / testiastia (5/l)	
Testiliuos/testiastia		4–10 l (vettä vähintään 10–15 cm) / lasinen tai ruostumattomasta teräksestä valmistettu testiastia (esim. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Rinnakkaisnäyte		4 rinnakkaistestiastiaa / testipitoisuus ja kontrolli	
Hyväksyttävä kuolleisuus kontrolleissa		≤ 10 % rinnakkaisnäytetestiastiaa kohti	
Kilpirauhasen kiinnitys	Kiinnitettyjen lkm	Kaikki sammakonpoikaset (5 / rinnakkaisnäyte arvioidaan alustavasti)	
	Alue	Pää tai koko ruumis	
	Kiinnitysneste	Davidsonin kiinnitysneste	
Ruokinta	Ravinto	Sera Micron® tai vastaava	
	Määrä/antotiheys	Ks. taulukosta 1 ohjeet ruokinnasta Sera Micron® -ravinnolla	
Valaistus	Valojaksot	12 h valoisaa / 12 h pimeää	

▼**M6**

	Intensiteetti	600–2 000 luksia (veden pinnalta mitattuna)
Veden lämpötila		22 ± 1 °C
pH		6,5–8,5
Liuenneen hapen pitoisuus		> 3,5 mg/l (> 40 % ilman kyllästysarvosta)
Analyyttisen kemian näytteenottoaikataulu		Kerran viikossa (neljä näytteenottokertaa / testi)

▼**M6**

Lisäys 2

Raakatietojen ja yhteenvetotietojen raportointitaulukot

Taulukko 1

Yleiset tiedot testikemikaalista

Kemialliset tiedot			
	Syötä testikemikaali, pitoisuusyksiköt ja käsittelyt		
	Testikemikaali:		
	Pitoisuusyksiköt:		
	Käsittely 1		
	Käsittely 2		
	Käsittely 3		
	Käsittely 4		
	Päivämäärä (päivä 0):		Syötä päivämäärä (kk/pp/vv)
	Päivämäärä (päivä 7):		Syötä päivämäärä (kk/pp/vv)
	Päivämäärä (päivä 21):		Syötä päivämäärä (kk/pp/vv)

Taulukko 2

Raakatietojen keruulomakkeet päiville 7 ja 21

PÄIVÄ X
PVM 00.00.00

	Pitoisuus	Käsittelyn numero	Rinnakkaisnäytteen numero	Yksilön numero	Yksilön tunniste	Kehitysvaihe	Kuono-peräaukko-pituus (mm)	Takajalan pituus (mm)	Koko organismin märkäpaino (mg)
RIVI	KÄS.	KÄS.#	RINN.	YKS.	YKS.#	VAIHE	PIT.	TA-KAJ.PIT.	PAINO
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Pitoisuus	Käsittelyn numero	Rinnakkaisnäytteen numero	Yksilön numero	Yksilön tunniste	Kehitysvaihe	Kuono-peräaukko-pituus (mm)	Takajalan pituus (mm)	Koko organismin märkäpaino (mg)
RIVI	KÄS.	KÄS.#	RINN.	YKS.	YKS.#	VAIHE	PIT.	TAKAJ.PIT.	PAINO
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Pitoisuus	Käsittelyn numero	Rinnakkaisnäytteen numero	Yksilön numero	Yksilön tunniste	Kehitysvaihe	Kuono-peräaukko-pituus (mm)	Takajalan pituus (mm)	Koko organismin märkäpaino (mg)
RIVI	KÄS.	KÄS.#	RINN.	YKS.	YKS.#	VAIHE	PIT.	TAKAJ.PIT.	PAINO
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Pitoisuus	Käsittelyn numero	Rinnakkaisnäytteen numero	Yksilön numero	Yksilön tuniste	Kehitysvaihe	Kuono-peräaukko-pituus (mm)	Takajalan pituus (mm)	Koko organismin märkäpaino (mg)
RIVI	KÄS.	KÄS.#	RINN.	YKS.	YKS.#	VAIHE	PIT.	TAKAJ.PIT.	PAINO
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

Taulukko 3

Päivien 7 ja 21 ominaisuustietojen lasketut yhteenvedot

		Kehitysvaihe			Kuono-peräaukko-pituus (mm)		Takajalan pituus (mm)		Paino (mg)	
KÄS	RINN	MIN	MEDI-AANI	MAX	KESKI-ARVO	KESK.H-AJ.	KESKI-ARVO	KESK.HAJ.	KESKI-ARVO	KESK.HAJ.
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Huomautus: Solun laskelmat liittyvät taulukkoon 2 syötettyihin tietoihin.

Taulukko 4

Päivittäiset kuolleisuustiedot

Testi-päivä	Päivämäärä	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00.00.00																
1	#Arvo!																
2	#Arvo!																
3	#Arvo!																
4	#Arvo!																
5	#Arvo!																

▼**M6**

Testi-päivä	Päivämäärä	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Arvo!																
7	#Arvo!																
8	#Arvo!																
9	#Arvo!																
10	#Arvo!																
11	#Arvo!																
12	#Arvo!																
13	#Arvo!																
14	#Arvo!																
15	#Arvo!																
16	#Arvo!																
17	#Arvo!																
18	#Arvo!																
19	#Arvo!																
20	#Arvo!																
21	#Arvo!																
Rinnakkaisnäytteiden luku		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Käsittelyn luku		0				0				0				0			

Huomautus: Solun laskelmat liittyvät taulukkoon 1 syötettyihin tietoihin.

Taulukko 5

Veden laatukriteerit

Altistusjärjestelmä (läpivirtaus/staattinen)
Lämpötila:
Valovoima:
Valoisa-pimeä-sykli
Elintarvikkeet:
Ruokintatiheys:
Veden pH:
Testiveden jodipitoisuus:

▼**M6**

Taulukko 6

Yhteenveto kemiallisista tiedoista

Kemiallinen nimi:																					
Cas #:																					
Testi-päivä	Päivämäärä	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00.00.00																				
1	#Arvo!																				
2	#Arvo!																				
3	#Arvo!																				
4	#Arvo!																				
5	#Arvo!																				
6	#Arvo!																				
7	#Arvo!																				
8	#Arvo!																				
9	#Arvo!																				
10	#Arvo!																				
11	#Arvo!																				
12	#Arvo!																				
13	#Arvo!																				
14	#Arvo!																				
15	#Arvo!																				
16	#Arvo!																				
17	#Arvo!																				
18	#Arvo!																				
19	#Arvo!																				
20	#Arvo!																				
21	#Arvo!																				

Huomautus: Solun laskelmat liittyvät taulukkoon 1 syötettyihin tietoihin.

▼**M6**

Taulukko 7

Keskeisten kriteerien histopatologiset raportointitaulukot

Päiväys: Kemikaali:

Kontrollieläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1	Kontrollieläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2	Kilpirauhasen hypertrofia	Kilpirauhasen atrofia	Follikkelisolun hypertrofia	Follikkelisolun hyperplasia
Yhteensä:					

Patologi:

Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1	Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2	Kilpirauhasen hypertrofia	Kilpirauhasen atrofia	Follikkelisolun hypertrofia	Follikkelisolun hyperplasia
Yhteensä:					

Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1	Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2	Kilpirauhasen hypertrofia	Kilpirauhasen atrofia	Follikkelisolun hypertrofia	Follikkelisolun hyperplasia
Yhteensä:					

Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1	Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2	Kilpirauhasen hypertrofia	Kilpirauhasen atrofia	Follikkelisolun hypertrofia	Follikkelisolun hyperplasia
Yhteensä:					

▼**M6**

Taulukko 8

Muut histopatologiset kriteerit

Päiväys: Kemikaali: Patologi:

Kontrollieläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1	Kontrollieläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2	Follikkelin ontelon alue suurentunut	Follikkelin ontelon alue pienentynyt
Yhteensä:			

Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1	Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2	Follikkelin ontelon alue suurentunut	Follikkelin ontelon alue pienentynyt
Yhteensä:			

Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1	Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2	Follikkelin ontelon alue suurentunut	Follikkelin ontelon alue pienentynyt
Yhteensä:			

Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1	Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2	Follikkelin ontelon alue suurentunut	Follikkelin ontelon alue pienentynyt
Yhteensä:			

▼**M6**

Taulukko 9

Histopatologisten löydösten kuvaukset

Päiväys:

Kemikaali:

Patologi:

		Kuvaus:
Kontrollieläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1		
Kontrollieläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2		
Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1		
Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2		

▼**M6**

Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1		
Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2		
Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 1		
Annoseläimen tunniste – rinnakkaisnäyte 2		

▼M6

Taulukko 10

Yhteenvetoraportointitaulukon malli AMA-tutkimuksen päivälle x (7 tai 21)

		Valvonta				Annos 1					Annos 2					Annos 3				
Ominaisuus	Rinnakkais-näyte	Keski-arvo	SD	CV	N	Keski-arvo	SD	CV	N	p-arvo	Keski-arvo	SD	CV	N	p-arvo	Keski-arvo	SD	CV	N	p-arvo
Takajalan Pituus (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskiarvo:																			
Kuono-peräaukko-pit. (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskiarvo:																			
Märkäpaino: (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskiarvo:																			

▼M6

Taulukko 11

Kehitysvaihetietojen yhteenvetoraportointitaulukon malli AMA-tutkimuksen päivälle × (7 tai 21)

		Valvonta				Annos 1					Annos 2					Annos 3				
	Rinnakkais-näyte	Medi-aani	Minimi	Maksimi	N	Medi-aani	Minimi	Maksimi	N	p-arvo	Medi-aani	Minimi	Maksimi	N	p-arvo	Medi-aani	Minimi	Maksimi	Medi-aani	p-arvo
Kehitysaste (vaihe)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Keskiarvo:																			

▼**M6**

Lisäys 3

Pituuden ja painon vaihtoehtoinen analyysi, jos myöhäisvaiheen kehitystä esiintyy yli 20 prosentilla sammakonpoikasista yhdessä tai useammassa pitoisuudessa

Jos suurempi määrä sammakonpoikasista on ylittänyt kehitysvaiheen 60 (≤ 20 prosenttia) yhdessä tai useammassa nimellispitoisuudessa, on tehtävä kaikilla sammakonpoikasilla kaksisuuntainen ANOVA, joka perustuu hierarkkiseen varianssirakenteeseen, jotta voidaan arvioida kemikaalikäsittelyjen kasvuun kohdistuvat vaikutukset samalla kun otetaan huomioon myöhäisvaiheen kehityksen vaikutus kasvuun.

Kaikkia tietoja suositellaan käytettäväksi, mutta huomioon tulee ottaa myöhäisvaiheen kehityksen vaikutus. Tämä voidaan tehdä kaksisuuntaisella ANOVAlla, joka perustuu hierarkkiseen varianssirakenteeseen. Määritä LateStage=”Yes”, jos eläimen kehitysvaihe on vähintään 61. Määritä muussa tapauksessa LateStage=”No” +. Sen jälkeen voidaan tehdä kaksisuuntainen ANOVA muuttujilla pitoisuus, LateStage ja niiden yhteisvaikutus. Satunnaiskertoimena on Rep(Conc) ja toisena satunnaisvaikutuksena on Tadpole(Rep). Tällöin ”rep” on edelleen analyysiyksikkö, ja se antaa pitkälti samat tulokset kuin painotettu analyysi ”rep*latestage means”, painotettuna eläinten lukumäärällä keskiarvoa kohti. Jos tiedot rikkovat ANOVAn normaaliuden tai varianssin homogeenisuuden vaatimuksia, se voidaan korjata käyttämällä normalisoitua arvojärjestysmuunnosta.

Tavanomaisten ANOVA F-testien (Conc, LateStage ja niiden yhteisvaikutus) lisäksi yhteisvaikutuksen F-testi voidaan jakaa kahteen muuhun ANOVA F-testiin, joista toinen käsittelee keskimääräisiä vasteita kaikissa pitoisuuksissa määrityksellä LateStage=”No” ja toinen keskimääräisiä vasteita kaikissa pitoisuudessa määrityksellä LateStage=”Yes”. Muut käsittelykeskiarvojen vertailut kontrolleihin tehdään kullakin LateStage-tasolla. Trendityyppinen analyysi voidaan tehdä käyttämällä asianmukaisia kontrasteja. Myös yksinkertaisia parillisia vertailuja voidaan tehdä, jos LateStage-muuttujan tasolla on näyttöä ei-monotonisesta annosvasteesta. Bonferroni-Holm-korjaus p-arvoihin tehdään vain, jos vastaava F-osa ei ole merkitsevä. Tämä voidaan tehdä SAS-ohjelmassa ja luultavasti myös muissa tilasto-ohjelmapaketeissa. Komplikaatioita voi ilmetä, jos jossakin pitoisuudessa ei ole myöhäisessä kehitysvaiheessa olevia eläimiä, mutta nämä tilanteet voidaan selvittää helposti.

▼**M6**

Lisäys 4

Määritelmät

Kemikaali: aine tai seos.

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M6

C.39. MAA-AINEKSESSA TEHTÄVÄ HYPPYHÄNTÄISTEN LISÄÄNTYMISTESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 232 (2009). Tämä testimenetelmä on kehitetty siksi, että voidaan arvioida kemikaalien vaikutuksia maaperässä elävien hyppyhäntäisten lisääntymiseen. Se perustuu nykyisiin menetelmiin (1) (2). Partenogeneettisesti lisääntyvä *Folsomia candida* ja suvullisesti lisääntyvä *Folsomia fimetaria* ovat kaksi helpoiten saatavilla olevaa hyppyhäntäisten lajia. Niitä voi kasvattaa ja niitä on myös kaupallisesti saatavilla. Kun arvioitavana on tiettyjä elinympäristöjä, joissa näitä kahta lajia ei esiinny, menetelmä on laajennettavissa myös muihin hyppyhäntäislajeihin, jos ne täyttävät testin validiteettikriteerit.

2. Maaperässä hyppyhäntäiset ovat ekologisesti merkittäviä lajeja ympäristömyrkyllisyyden testaukseen. Hyppyhäntäiset ovat kuusijalkaisia, ja niiden ohut ulkoinen tukiranka läpäisee ilmaa ja vettä erittäin hyvin. Ne kuuluvat niveljalkaisiin, mutta niiden altistumisreitti ja -nopeus on eri kuin kastemadoilla ja änkyrimadoilla.

3. Hyppyhäntäispopulaation tiheys on yleensä 10^5 m^{-2} maaperässä ja lehtikarikekerroksissa monissa maanpäällisissä ekosysteemeissä (3) (4). Aikuisten koko on yleensä 0,5–5 mm, ja niiden osuus maaperäeläinten kokonaisbiomassasta ja maahengityksestä on pieni, arviolta 1–5 prosenttia (5). Niiden tärkein tehtävä onkin toimia mahdollisina prosessien säätelijöinä saalistamalla mikrobeja ja pieneliöitä. Hyppyhäntäiset ovat hyvin monentyyppisten endogeeisten ja epigeeisten selkärankaisten, kuten punkkien, tuhatjalkaisten, hämähäkkien, maakiitäjäisten ja lyhytsiipisten saaliseläimiä. Hyppyhäntäiset osallistuvat hajotusprosesseihin hapokkaassa maassa, jossa ne voivat olla tärkeimpiä maan selkärangattomia änkyrimatojen ohella, sillä kastematoja ja kaksoisjalkaisia ei tällaisessa maaperässä yleensä ole.

4. *F. fimetaria* on levinnyt koko maailmaan, ja sitä tavataan yleensä monentyyppisessä maaperässä, niin hiekka- ja hiesupitoisessa maassa kuin mullas- ja kangashumusmaassa. Se on silmätön ja pigmentitön hyppyhäntäinen. Sitä on löydetty myös viljelysmailta kaikkialla Euroopassa (6). Ruokailutavoiltaan se on kaikkiruokainen; se syö sienirihmastoja, bakteereita, alkueläimiä ja jätöksiä. Laidunmaalla se on vuorovaikutuksessa kasvitauteja aiheuttavien sienten kanssa (7), ja se saattaa vaikuttaa myös sienijuuriin, minkä tiedetään pitävän paikkansa ainakin *F. candidan* osalta. Useimpien hyppyhäntäisten tavoin se lisääntyy sukupuolisesti, mikä edellyttää koiraiden jatkuvaa läsnäoloa munien hedelmöittämistä varten.

5. Myös *F. candidaa* tavataan kaikkialla maailmassa. Vaikka se ei ole yleinen useimmissa luonnollisissa maaperissä, sitä tavataan usein suuria määriä paikoissa, joissa on paljon humusta. Se on silmätön ja pigmentitön hyppyhäntäinen. Sillä on hyvin kehittynyt hyppyhanko (hyppyelin) ja aktiivinen juoksuliike, ja se hyppää nopeasti, jos sitä häiritään. *F. candidan* ekologinen rooli on samankaltainen kuin *F. fimetarian*, mutta sen elinympäristönä ovat orgaanisesti monimuotoisemmat maaperät. Se lisääntyy partenogeneettisesti. Koiraita voi olla vähemmän kuin yksi tuhannesta.

TESTIN PERIAATE

6. Synkronisesti kehittyneet aikuiset (*F. fimetaria*) tai nuoret (*F. candida*) hyppyhäntäiset altistetaan testikemikaalin eri pitoisuuksille siten, että kemikaali sekoitetaan muokattuun keinotekoiseen maahan (8), jonka orgaanisen aineksen pitoisuus on viisi prosenttia (tai vaihtoehtoiseen maaperään). Testin kulku voidaan jakaa kahteen vaiheeseen:

— Pitoisuusalueen määritystesti (jos myrkyllisyydestä ei ole riittävästi tietoa saatavana), jossa pääasiallisia tutkittavia ominaisuuksia ovat kuolleisuus

▼M6

ja lisääntyminen. *F. fimetarialta* ne arvioidaan kahden viikon altistuksen jälkeen ja *F. candidalta* kolmen viikon jälkeen.

— Varsinainen lisääntymistesti, jossa arvioidaan emoeläinten tuottamien poikasten kokonaismäärää ja emoeläinten eloonjäämistä. Tämän varsinaisen testin kesto on *F. fimetarian* osalta kolme viikkoa ja *F. candidan* osalta neljä viikkoa.

Testikemikaalin myrkyllinen vaikutus aikuisten eläinten kuolleisuuteen ja lisääntymistuloksiin ilmaistaan arvoilla LC_x ja EC_x. Tiedot sovitetaan epälineaarisen regression avulla tarkoituksenmukaiseen malliin, jotta voidaan arvioida se pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin kuolleisuuden tai vähenemän lisääntymistuloksissa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää myös NOEC/LOEC-arvoja (9).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

7. Testikemikaalista pitäisi olla käytettävissä seuraavat tiedot: fysikaaliset ominaisuudet, vesiliukoisuus, log K_{ow}, maa-vesi-jakaantumiskerroin sekä höyrynpaine. Lisätiedot testikemikaalin käyttäytymisestä maaperässä, kuten fotolyysi- ja hydrolyysinopeudet sekä bioottinen hajoaminen, ovat myös suotavia. Testikemikaalin IUPAC-nimikkeistön mukaiset tunnistetiedot, CAS-numero, erä, rakennekaava ja puhtaus on dokumentoitava, jos nämä tiedot ovat saatavilla.

8. Tätä testimenetelmää voidaan käyttää vesiliukoisten tai veteen liukenemattomien kemikaalien yhteydessä. Testikemikaalia käytetään kummassakin tapauksessa kuitenkin eri tavalla. Testimenetelmää ei voida soveltaa haihtuviin kemikaaleihin, eli sellaisiin, joiden osalta Henryn vakio tai ilma-vesi-jakaantumiskerroin on suurempi kuin yksi, tai sellaisiin kemikaaleihin, joiden höyrynpaine on suurempi kuin 0,0133 Pa 25 °C:ssa.

TESTIN VALIDITEETTI

9. Jotta testitulosta voidaan pitää luotettavana, seuraavien kriteerien on täytyttävä käsittelemättömissä kontrolleissa:

— Aikuisten eläinten keskimääräinen kuolleisuus testin lopussa saa olla enintään 20 prosenttia.

— Nuorten eläinten keskimäärän testiastiaa kohti testin lopussa tulee olla vähintään 100.

— Nuorten eläinten määrälle lasketun variaatiokertoimen tulee olla alle 30 prosenttia varsinaisen testin lopussa.

VERTAILUKEMIKAALI

10. Vertailukemikaali on testattava sen EC_{50}-pitoisuudella valitussa testimaaperätyypissä joko säännöllisin väliajoin tai mahdollisesti osana jokaista testikertaa, jotta voidaan varmentaa, että testijärjestelmän testiorganismien vaste on normaalilla tasolla. Sopiva vertailukemikaali on boorihappo, jonka tulisi vähentää kummankin lajin lisääntymistä 50 prosentilla (10) (11), kun sen pitoisuus on 100 mg/kg maa-aineksen kuivapainosta.

TESTIN KUVAUS

Testiastiat ja -laitteet

11. Sopivia testiastioita ovat säiliöt, joihin mahtuu 30 g kosteaa maa-ainesta. Materiaalin tulee olla joko lasia tai inerttiä muovia (myrkytöntä). Muovisäiliöiden käyttöä on kuitenkin vältettävä, jos testikemikaalille altistuminen vähenee sorption takia. Testiastioiden on oltava poikkileikkaukseltaan sellaisia, että maa-aineksen varsinainen syvyys testiastiassa on 2–4 cm. Astioissa tulee

▼M6

olla kannet (esimerkiksi lasia tai polyetyleeniä), jotka on suunniteltu vähentämään veden haihtumista samalla kun maa-aineksen ja testi-ilmakehän välinen kaasujenvaihto on mahdollista. Säiliön tulee olla ainakin osittain läpinäkyvä valonläpäisevyyden vuoksi.

12. Testissä tarvitaan myös vakiolaboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

— kuivauskaappi

— stereomikroskooppi

— pH-mittari ja luksimittari

— sopivia tarkkoja vaakoja

— asianmukaiset lämpötilan valvontalaitteet

— asianmukaiset ilmankosteuden valvontalaitteet (ei oleellinen, jos altistusastiat on peitetty kansilla)

— lämpökaappi, jonka lämpötilaa voi säätää, tai pieni huone

— pinsettejä tai imulaite, jonka imuteho on pieni.

Testattavan maa-aineksen esikäsittely

13. Testissä käytetään muokattua keinotekoista maata, jonka orgaanisen aineksen pitoisuus on viisi prosenttia. Myös luonnollista maata voidaan käyttää, koska keinotekoinen maa ei muistuta luonnollista maata. Keinotekoisen maan suositeltu koostumus on seuraavanlainen (kuivapainojen perusteella, kun ainekset on kuivattu vakiopainoon 105 °C:ssa):

— 5 % rahkaturvetta, joka on ilmakuivattu ja jauhettu hienoksi (hiukkaskoko 2 ± 1 on hyväksyttävä)

— 20 % kaoliinisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 %)

— noin 74 % ilmakuivattua teollisuushiekkaa (tarvittavan $CaCO_3$-määrän mukaan), ensisijaisesti hienoa hiekkaa, jonka hiukkasista yli puolet on kooltaan 50–200 mikronia. Hiekan tarkkaan määrään vaikuttaa $CaCO_3$-määrä (ks. jäljempänä); niiden yhteismäärän tulisi olla 75 prosenttia.

— 1,0 % kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$, jauhemainen, analyyttinen laatu), jotta maan pH-arvoksi saadaan 6,0 ± 0,5; lisättävän kalsiumkarbonaatin määrään saattaa vaikuttaa etenkin turpeen laatu/tyyppi (ks. huomautus 1).

Huomautus 1: $CaCO_3$:n tarvittavaan määrään vaikuttavat maa-ainesalustan ainekset, ja se on määritettävä mittaamalla esi-inkuboidun kostean maa-aineksen osanäytteiden pH-arvo juuri ennen testiä.

Huomautus 2: On suositeltavaa mitata maa-aineksen pH-arvo, valinnaisesti myös C/N-suhde, kationinvaihtokyky (CEC) ja orgaanisen aineksen pitoisuus, jotta normalisointi myöhemmässä vaiheessa on mahdollista ja jotta tuloksia voidaan tulkita paremmin.

Huomautus 3: Tarvittaessa (esimerkiksi tiettyihin testaustarkoituksiin) testija/tai kasvatusalustana voidaan käyttää myös luonnonmaata, joka on peräisin saastumattomilta alueilta. Luonnonmaata käytettäessä sitä on kuitenkin luonnehdittava vähintään seuraavin tiedoin: alkuperä (keräyspaikka), pH, rakenne (hiukkaskokojakauma), CEC ja orgaanisen aineksen pitoisuus, eikä siinä saa olla minkäänlaisia epäpuhtauksia. Luonnonmaan soveltuvuus testiin ja testin validiteettikriteerien täyttämiseen on syytä osoittaa ennen sen käyttämistä varsinaisessa testissä.

▼M6

14. Maan kuivat ainesosat sekoitetaan perusteellisesti (esim. suurella laboratoriosekoittimella). Keinomaan enimmäisvedenpidätyskyky (WHC) määritetään lisäyksessä 5 kuvattujen menetelmien mukaisesti. Testimaan kosteuspitoisuus on optimoitava; sen rakenteen tulee olla irtonainen ja huokoinen, jotta hyppyhäntäiset voivat kaivautua huokosiin. Ihanteellinen kosteus on tavallisesti 40–60 prosenttia enimmäisvedenpidätyskyvystä.

15. Kuiva keinomaa esikostutetaan lisäämällä siihen riittävästi deionisoitua vettä, jotta noin puolet lopullisesta vesipitoisuudesta saavutetaan 2–7 päivää ennen testin aloittamista happamuuden tasapainottamiseksi/vakauttamiseksi. Maan ja 1 M:n kaliumkloridin (KCl) tai 0,01 M:n kalsiumkloridin ($CaCl_2$) pH-arvon määrittämisessä käytetään liuosta suhteessa 1:5 (lisäyksen 6 mukaisesti). Jos maa on vaadittua vaihteluväliä happamampaa, sitä voidaan muokata lisäämällä tarvittava määrä $CaCO_3$:a. Jos maa on liian emäksistä, sitä voidaan muokata lisäämällä epäorgaanista happoa, joka on hyppyhäntäisille vaaratonta.

16. Esikostutettu maa jaetaan osioihin, jotka vastaavat testissä käytettävien testipitoisuuksien (ja tarvittaessa vertailukemikaalien) ja kontrollien lukumäärää. Lopuksi maa-ainekseen lisätään testikemikaalit ja vesipitoisuus säädetään 24 kohdan mukaisesti.

Koe-eläinten valinta ja valmistelu

17. Suositeltu laji on partenogeneettinen *F. candida*, koska testimenetelmän rengastestauksessa (11) tämä laji täytti eloonjäämistä koskevat validiteettikriteerit useammin kuin *F. fimetaria*. Jos vaihtoehtoista lajia käytetään, sen on täytettävä 9 kohdassa esitetyt validiteettikriteerit. Testin alussa eläinten tulee olla hyvin ruokittuja, ja iältään niiden tulee olla 23–26 päivää (*F. fimetaria*) ja 9–12 päivää (*F. candida*). Jokaisessa rinnakkaisnäytteessä *F. fimetaria* -lajista tulee olla 10 koirasta ja 10 naarasta. *F. candida* -lajista tulee käyttää 10:tä naarasta (ks. lisäys 2 ja lisäys 3). Synkroniset eläimet valitaan niiden säilytysastioista satunnaisotannalla, ja niiden terveys ja fyysinen kunto tarkastetaan jokaisesta rinnakkaisnäytteeseen lisättävästä erästä. Kukin 10–20 yksilöstä koostuva ryhmä laitetaan satunnaisesti valittuun testisäiliöön. *F. fimetaria* -lajista valitaan isoja naaraita, jotta ne erotetaan kunnolla *F. fimetaria* -koiraista.

Testipitoisuuksien valmistelu

18. Testikemikaalin lisäämisessä voi käyttää neljää menetelmää: 1) testikemikaali sekoitetaan maahan käyttämällä vettä kantoaineena, 2) testikemikaali sekoitetaan maahan käyttämällä orgaanista liuotinta kantoaineena, 3) testikemikaali sekoitetaan maahan käyttämällä hiekkaa kantoaineena ja 4) testikemikaali applikoidaan maan pintakerrokseen. Sopiva menetelmä valitaan kemikaalin ominaisuuksien ja testin tarkoituksen mukaan. Yleensä testikemikaalin sekoittaminen maahan on suositeltavaa. Sellaiset applikointimenetelmät, jotka vastaavat sitä, miten testikemikaalia käytetään käytännössä, saattavat kuitenkin olla tarpeen (esimerkiksi nestemäisen valmisteen suihkuttaminen tai tiettyjen torjunta-ainevalmisteiden, kuten rakeiden tai siementen peittausaineen käyttäminen). Maa käsitellään ennen hyppyhäntäisten lisäämistä paitsi silloin, kun testikemikaali lisätään maan pintakerrokseen; tällöin hyppyhäntäisten on annettava kaivautua maahan ennen kemikaalin lisäämistä.

Vesiliukoinen testikemikaali

19. Testikemikaalista ja deionisoidusta vedestä valmistetaan sellainen määrä liuosta, joka riittää yhden testipitoisuuden kaikkiin neljään rinnakkaisnäytteeseen. Kukin testikemikaaliliuos sekoitetaan perinpohjaisesti yhteen erään esikostutettua maata, ennen kuin se laitetaan testiastiaan.

Veteen liukenematon testikemikaali

20. Jos kemikaali ei liukene veteen, vaan orgaanisiin liuottimiin, testikemikaali voidaan liuottaa pienimpään mahdolliseen määrään sopivaa liuotinta (esimerkiksi asetonia). Sen jälkeen kemikaali on sekoitettava maahan perusteellisesti.

▼M6

Tarvittaessa se on sekoitettava pieneen määrään kvartsihiekkaa. Ainoastaan haihtuvia liuottimia saa käyttää. Kun käytetään orgaanista liuotinta, kaikissa testipitoisuuksissa ja negatiivisessa liuotinkontrollissa on oltava sama vähimmäismäärä liuotinta. Applikaatiosäiliöt on pidettävä jonkin aikaa peittämättöminä, jotta testikemikaalin applikointiin liittyvä liuotin haihtuu. Näin varmistetaan, että myrkyllistä kemikaalia ei tässä vaiheessa häviä.

Huonosti veteen ja orgaanisiin liuottimiin liukeneva testikemikaali

21. Kun kemikaalit liukenevat huonosti veteen ja orgaanisiin liuottimiin, kvartsihiekkaa – jonka tulee olla osa maahan sekoitettavan hiekan kokonaismäärää – sekoitetaan testikemikaaliin, jotta saadaan haluttu testipitoisuus. Tämä kvartsihiekan ja testikemikaalin seos lisätään esikostutettuun maahan ja sekoitetaan hyvin sopivaan määrään deionisoitua vettä, jotta saadaan tarvittava kosteuspitoisuus. Lopullinen seos jaetaan testiastioihin. Menettely toistetaan jokaisen testipitoisuuden yhteydessä, ja myös asianmukainen kontrolli valmistellaan.

Testikemikaalin applikointi maan pintakerrokseen

22. Kun testikemikaali on torjunta-aine, voi olla asianmukaista applikoida se maan pintakerrokseen suihkuttamalla. Maa käsitellään vasta sitten, kun hyppyhäntäiset on lisätty. Testisäiliöihin täytetään ensin kostutettua maasubstraattia, sen jälkeen lisätään eläimet ja lopuksi testisäiliöt punnitaan. Jotta vältetään eläinten suora altistuminen testikemikaalille suoran kosketuksen vuoksi, testikemikaali applikoidaan vähintään puoli tuntia sen jälkeen, kun hyppyhäntäiset on laitettu säiliöön. Testikemikaali tulee applikoida maan pinnalle mahdollisimman tasaisesti käyttämällä sopivaa laboratoriossa käytettävää suihkutuslaitetta. Näin simuloidaan torjunta-aineen suihkuttamista pellolla. Applikointi tulisi tehdä olosuhteissa, joissa lämpötila vaihtelee ± 2 °C, ja vesiliuokset, emulsiot tai dispersiot tulee applikoida veden annostusnopeudella riskinarviointiin perustuvien suositusten mukaisesti. Nopeus on varmistettava käyttämällä asianmukaista kalibrointitekniikkaa. Tietyt valmisteet, kuten rakeet tai siementen peittausaineet, voidaan applikoida samalla tavalla kuin maataloudessa. Eläinten ruoka lisätään suihkutuksen jälkeen.

MENETTELY

Testiolosuhteet

23. Testin keskilämpötilan tulee olla 20 ± 1 °C, ja lämpötilan vaihteluväli saa olla 20 ± 2 °C. Testi toteutetaan valoisaa ja pimeää aikaa säätelemällä (mieluiten 12 tuntia valoisaa ja 12 tuntia pimeää). Testiastioiden alueella tulisi olla 400–800 luksin valaistus.

24. Maan kosteuden tarkistamiseksi astiat punnitaan testin alussa, keskivaiheilla ja lopussa. Jos astian paino on pienentynyt yli kaksi prosenttia, astiaan lisätään deionisoitua vettä. Veden häviämistä voidaan vähentää pitämällä testi-inkubaattorissa suuri ilmankosteus (> 80 prosenttia).

25. pH-arvo on mitattava sekä pitoisuusalueen määritystestin että varsinaisen testin alussa ja lopussa. Mittaukset on tehtävä yhdestä ylimääräisestä kontrollinäytteestä ja yhdestä ylimääräisestä näytteestä, joka on otettu käsiteltyjen maa-ainesten näytteistä (kaikki pitoisuudet) ja joka on valmisteltu ja ylläpidetty samalla tavalla kuin koeviljelmät mutta johon ei ole lisätty hyppyhäntäisiä.

Testimenettely ja mittaukset

26. Jokaisesta testipitoisuudesta laitetaan testiastiaan sellainen määrä testimaata, joka vastaa 30 gramman tuorepainoa. Lisäksi valmistellaan vesikontrollit,

▼M6

joihin ei lisätä testikemikaalia. Jos testikemikaalin applikoinnissa käytetään kantoainetta, koesarjojen lisäksi tulee tehdä yksi kontrollisarja, joka sisältää pelkästään kantoainetta. Liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuuden olisi oltava sama kuin testikemikaalia sisältävissä testiastioissa.

27. Yksittäiset hyppyhäntäiset siirretään kuhunkin testiastiaan varovasti (jaotellen ne testiastioihin satunnaisesti) asettamalla ne maa-aineksen pinnalle. Jotta eläinten siirto olisi tehokasta, voidaan käyttää imulaitetta, jonka imuteho on pieni. Testipitoisuuksien rinnakkaisnäytteiden ja kontrollien lukumäärä määräytyy käytettävän testisuunnitelman mukaan. Testiastiat sijoitetaan testi-inkubaattoriin satunnaisesti, ja astioiden paikkoja muutetaan satunnaisesti viikoittain.

28. *F. fimetaria* -testissä yhdessä testiastiassa tulee olla 20 aikuista eläintä, joista 10 on koirasta ja 10 naarasta ja joiden ikä on 23–26 päivää. Päivänä 21 hyppyhäntäiset otetaan pois maa-aineksesta ja lasketaan. *F. fimetarian* osalta sukupuolet erotellaan koon perusteella testissä käytetystä synkronisoidusta eläinerästä. Naaraat ovat selvästi suurempia kuin koiraat (ks. lisäys 3).

29. *F. candida* -testissä yhdessä testiastiassa tulee olla kymmenen eläintä, joiden ikä on 9–12 päivää. Päivänä 28 hyppyhäntäiset poistetaan maa-aineksesta ja lasketaan.

30. Sopiva ravinnonlähde on jauhemainen leivontakuivahiiva, jota on saatavilla tavallisista ruokakaupoista. Sitä lisätään jokaiseen säiliöön riittävä määrä, esimerkiksi 2–10 grammaa, testin alussa ja noin kahden viikon kuluttua.

31. Testin lopussa arvioidaan kuolleisuutta ja lisääntymistä. Kolmen viikon (*F. fimetaria*) tai neljän viikon (*F. candida*) kuluttua hyppyhäntäiset uutetaan maa-aineksesta (ks. lisäys 4) ja lasketaan (12). Hyppyhäntäinen merkitään kuolleeksi, jos sitä ei löydetä maa-aineksen seasta. Uutto- ja laskemismenetelmä on validoitava. Yksi validiteettikriteeri on se, että nuorten eläinten uuttotehokkuus on yli 95 prosenttia, mikä saadaan aikaan esimerkiksi lisäämällä maa-ainekseen tietty määrä eläimiä.

32. Testimenetelmän yhteenveto ja aikataulu on kuvattu lisäyksessä 2.

Testisuunnitelma

Pitoisuusalueen määritystesti

33. Tarvittaessa pitoisuusalueen määritystesti toteutetaan esimerkiksi siten, että siinä on viisi testikemikaalipitoisuutta (0,1, 1,0, 10, 100 ja 1 000 mg/kg maa-aineksen kuivapainoon nähden), kaksi rinnakkaisnäytettä jokaisesta käsittelystä ja kontrolli. Samankaltaisilla kemikaaleilla tehdyistä testeistä tai kirjallisuudesta saadut lisätiedot hyppyhäntäisten kuolleisuudesta tai lisääntymisestä voivat olla hyödyllisiä, kun päätetään pitoisuusalueen määritystestissä käytettävien pitoisuuksien vaihteluvälistä.

34. Pitoisuusalueen määritystestin kesto on kaksi viikkoa *F. fimetarian* osalta ja kolme viikkoa *F. candidan* osalta. Näin varmistetaan, että ne tuottavat yhden poikueen jälkeläisiä. Testin lopussa arvioidaan hyppyhäntäisten kuolleisuus ja lisääntyminen. Aikuisten lukumäärä ja jälkeläisten olemassaolo on kirjattava.

Varsinainen testi

35. Jotta EC_x-arvo voidaan määrittää (esimerkiksi EC_{10}, EC_{50}), tulee testata 12 pitoisuutta. Jokaista testipitoisuuskäsittelyä kohti suositellaan vähintään kahta rinnakkaisnäytettä ja kuutta kontrollirinnakkaisnäytettä. Porrastuskerroin voi vaihdella annos-vastemallin mukaisesti.

▼M6

36. NOEC/LOEC-arvojen määrittämisessä tulee testata vähintään viisi pitoisuutta geometrisessa sarjassa. Jokaista testipitoisuuskäsittelyä kohti suositellaan neljää rinnakkaisnäytettä ja kahdeksaa kontrollia. Pitoisuudet on porrastettava kertoimella, joka saa olla enintään 1,8.

37. Yhdistetty lähestymistapa mahdollistaa sekä NOEC/LOEC-arvojen että ECx-arvon määrittämisen. Yhdistettyä lähestymistapaa sovellettaessa on käytettävä kahdeksaa käsittelypitoisuutta geometrisessa sarjassa. Jokaista käsittelyä kohti suositellaan neljää rinnakkaisnäytettä ja kahdeksaa kontrollia. Pitoisuudet on porrastettava kertoimella, joka saa olla enintään 1,8.

38. Jos pitoisuusalueen määritystestissä ei havaita vaikutuksia suurimmalla pitoisuudella (esimerkiksi 1 000 mg/kg), lisääntymistesti voidaan toteuttaa raja-annostestinä käyttäen testipitoisuutta 1 000 mg/kg ja kontrollia. Raja-annostestin avulla on mahdollista osoittaa, ettei rajapitoisuus aiheuta tilastollisesti merkitsevää vaikutusta. Sekä käsitellyn maa-aineksen että kontrollin osalta tulee käyttää kahdeksaa rinnakkaisnäytettä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

39. Pääasiallinen päätetapahtuma on lisääntymistulos (ts. testiastiaa kohti tuotettujen jälkeläisten määrä). Tilastollisessa analyysissa eli ANOVA-menettelyissä käsittelyjä verrataan Studentin t-testillä, Dunnettin testillä tai Williamsin testillä. Jokaisen käsittelyn keskiarvoille lasketaan 95 prosentin luottamusvälit.

40. Käsittelemättömissä kontrolleissa elossapysyneiden aikuisten määrä on keskeinen validiteettikriteeri, ja se on dokumentoitava. Pitoisuusalueen määrittämistestin tavoin kaikki muut merkit kemikaalin vaarallisuudesta on raportoitava loppuraportissa.

LC_x ja EC_x

41. EC_x-arvot sekä niihin liittyvät parametrin 95 prosentin luottamusvälin ylä- ja alarajat lasketaan asianmukaisilla tilastomenetelmillä (ts. logistisella tai Weibullin funktiolla, trimmatulla Spearman-Kärberin menetelmällä tai yksinkertaisella interpoloinnilla). EC_x-arvo saadaan lisäämällä yhtälöön arvo, joka vastaa x:ää prosenttia kontrollin keskiarvosta. EC_{50} -arvon tai minkä tahansa muun EC_x-arvon laskemiseksi koko aineistolle on tehtävä regressioanalyysi. LC_{50}-arvo arvioidaan yleensä Probit-analyysilla tai muulla vastaavalla analyysilla, jossa otetaan huomioon binomiaalisesti jakautuneet kuolleisuustiedot.

NOEC/LOEC

42. Jos tilastollisella analyysilla on tarkoitus määrittää NOEC/LOEC-arvo, astiakohtaiset tilastot (yksittäisiä astioita pidetään rinnakkaisnäytteinä) ovat tarpeen. Asianmukaisia tilastomenetelmiä tulee käyttää ekotoksisuustietojen tilastollisessa analyysissa sovellettavia nykyisiä lähestymistapoja koskevan OECD:n asiakirjan nro 54 mukaan (Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application) (9). Yleensä kontrolliin verrattavan testikemikaalin aiheuttamia haittavaikutuksia tutkitaan käyttämällä yksisuuntausta hypoteesitestausta, jossa $p \leq 0{,}05$.

43. Normaalijakaumaa ja varianssin homogeenisuutta voidaan testata käyttämällä asianmukaista tilastollista testiä, kuten Shapiro-Wilkin testiä ja Levenen testiä ($p \leq 0{,}05$). Myös yksisuuntainen varianssianalyysi (ANOVA) ja

▼M6

sen jälkeiset monivertailutestit voidaan toteuttaa. Monivertailuja (esimerkiksi Dunnettin testiä) tai alaspäin askeltavia trenditestejä (esimerkiksi Williamsin testiä) voidaan käyttää sen laskemiseen, onko kontrollien ja eri testikemikaalipitoisuuksien välillä merkitseviä eroja ($p \leq 0,05$) (suositellun testin valinta OECD:n ohjeasiakirjan (TG) nro 54 mukaan (9)). Muutoin NOEC- ja LOEC-arvojen määrittämisessä voidaan käyttää parametrittomia menetelmiä (esimerkiksi Bonferroni-U-testiä Holmin mukaan tai Jonckheere-Terpstran trenditestiä).

Raja-annostesti

44. Jos raja-annostesti (kontrollin ja vain yhden käsittelyn vertailu) on tehty ja jos parametristen testimenetelmien vaatimukset (normaalius, homogeenisuus) täyttyvät, metrisiä vasteita voidaan arvioida Studentin testillä (t-testillä). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia (Welchin t-testi) tai parametritonta testiä, kuten Mann-Whitneyn U-testiä.

45. Kontrollien välisten (kontrolli ja liuotinkontrolli) merkitsevien erojen määrittämiseksi jokaisen kontrollin rinnakkaisnäytteet voidaan testata raja-annostestin yhteydessä kuvatulla tavalla. Jos näissä testeissä ei havaita merkitseviä eroja, kaikki kontrolli- ja liuotinkontrollirinnakkaisnäytteet voidaan yhdistää. Muussa tapauksessa kaikkia käsittelyjä tulee vertailla liuotinkontrolliin.

Testiraportti

46. Testiraportin on sisällettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testikemikaali

— testikemikaalin tunnistetiedot, erät ja CAS-numero sekä puhtaus

— testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (esimerkiksi log K_{ow}, vesiliukoisuus, höyrynpaine, Henryn vakio (H) sekä mielellään myös tiedot testikemikaalin käyttäytymisestä maaperässä), mikäli saatavilla

— testikemikaalin ja lisäaineiden koostumus on eriteltävä, jos testataan muu kuin puhdas kemikaali.

Testiorganismit

— lajien ja testiorganismien toimittajan tiedot, kuvaus kasvatusolosuhteista ja testiorganismien ikärakenne

Testiolosuhteet

— kuvaus kokeen rakenteesta ja menettelyistä

— testimaa-aineksen valmistelutiedot; yksityiskohtainen erittely, jos käytetään luonnonmaata (alkuperä, historia, hiukkaskokojakauma, pH, orgaanisen aineksen pitoisuus)

— maaperän vedenpidätyskyky

— kuvaus tekniikasta, jolla testikemikaali on applikoitu maa-ainekseen

— testiolosuhteet: valoteho, valoisien ja pimeiden jaksojen kesto, lämpötila

— kuvaus eläinten ruokinnasta; testissä käytetyn ruoan tyyppi ja määrä, ruokintapäivämäärät

— maa-aineksen pH ja vesipitoisuus testin alussa ja lopussa (kontrolli ja jokainen käsittely)

— yksityiskohtainen kuvaus uuttomenetelmästä ja uuton tehokkuudesta.

▼**M6**

Testitulokset

— jokaisesta testiastiasta määritettyjen nuorten eläinten määrä testin lopussa

— jokaisesta testiastiasta määritettyjen aikuisten eläinten määrä ja niiden kuolleisuus (%) testin lopussa

— kuvaus selvistä fysiologisista tai patologisista oireista tai selkeistä muutoksista käyttäytymisessä

— vertailutestikemikaalista saadut tulokset

— NOEC/LOEC-arvot, LC_x-arvo kuolleisuusta ja EC_x lisääntymisestä (useimmiten LC_{50}, LC_{10}, EC_{50}ja EC_{10}) sekä 95 prosentin luottamusvälit ja kaavio laskennassa käytetystä sovitetusta mallista sekä sen funktion yhtälö ja parametrit (ks. (9))

— kaikki tulosten tulkinnan kannalta hyödylliset tiedot ja havainnot

— varsinaisen testin todistusvoima, jos hypoteesin testaus on tehty (9)

— poikkeukset tässä testimenetelmässä kuvatuista menettelyistä ja kaikki testin aikana ilmenneet epätavallisuudet

— testin validiteetti

— NOEC-arvon osalta (kun se on arvioitu) pienin havaittava ero.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131–156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

(2) ISO (1999) Soil Quality – Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organisation for Standardisation, Geneve.

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London.

(4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

(5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111–118.

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta Collembola)*. Oxford University Press. 330pp (ISBN 0-19-854084-1).

(7) Ulber B (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268.

(8) Tämän lisäyksen C.36 luku, *Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil.*

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris.

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201–205.

(13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412–416.

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138–140.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä sovelletaan seuraavia määritelmiä (tässä testissä kaikki vaikuttavat pitoisuudet ilmaistaan testikemikaalin massana testimaan kuivamassaa kohti):

Kemikaali on aine tai seos.

NOEC (no observed effect concentration = pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta) on se testikemikaalin pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia. Tässä testissä NOEC-arvoa vastaavalla pitoisuudella ei ole tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$) tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna.

LOEC (lowest observed effect concentration = pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus) on testikemikaalin pienin pitoisuus, jolla on tilastollisesti merkitsevä vaikutus ($p < 0,05$) tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna.

ECx (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia) on pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC_{50}-arvo on pitoisuus, jonka on arvioitu aiheuttavan vaikutuksen testiominaisuuteen 50 prosentilla altistuneesta populaatiosta tietyn altistusjakson aikana.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼**M6**

Lisäys 2

Tärkeimmät toimenpiteet ja hyppyhäntäistestin toteuttamisen aikataulu

Testin vaiheet voidaan tiivistää seuraavasti:

Aika (päivä)	Toiminta
-23 – -26	Synkronisen *F. fimetaria* -viljelmän valmistelu
-14	Keinomaan valmistus (kuivien ainesosien sekoitus) Keinomaan pH:n tarkistus ja sen säätäminen tarvittaessa Maan enimmäisvedenpidätyskyvyn mittaus
-9 – -12	Synkronisen *F. candida* -viljelmän valmistelu
-2 – -7	Maan esikostutus
–1	Nuorten eläinten jakaminen eriin Varastoliuosten valmistus ja testikemikaalin lisääminen, jos liuotin on tarpeen
0	Varastoliuosten valmistus ja testikemikaalin lisääminen, jos tarvitaan kiinteä tai vesiliukoinen kemikaali tai jos kemikaali pitää applikoida maan pintaan. Maan pH:n mittaus ja säiliöiden punnitus Ruoan lisäys, hyppyhäntäisten laittaminen testiastioihin
14	Pitoisuusalueen määritystesti *F. fimetaria*: testin päättäminen, eläinten uuttaminen, maan pH:n ja vesihävikin mittaus (paino) Varsinaiset testit: mittaa kosteuspitoisuus ja lisää vettä sekä 2–10 mg hiivaa
21	Varsinainen *F. fimetaria* -testi: testin päättäminen, eläinten uuttaminen, maan pH:n ja vesihävikin mittaus (paino) Pitoisuusalueen määritystesti *F. candida*: testin päättäminen, eläinten uuttaminen, maan pH:n ja vesihävikin mittaus (paino)
28	Varsinainen *F. candida* -testi: testin päättäminen, eläinten uuttaminen, maan pH:n ja vesihävikin mittaus (paino)

▼M6

Lisäys 3

Ohjeet *F. fimetaria*- ja *F. candida* -lajien kasvattamista ja synkronointia varten

Näissä ohjeissa annetut ajat ja kestot on tarkistettava jokaisen hyppyhäntäiskannan osalta, jotta voidaan varmistaa, että ajoitus mahdollistaa nuorten eläinten riittävän synkronisoinnin. Sen jälkeen, kun aikuiset eläimet on siirretty tuoreeseen substraattiin, muninta ja munien kuoriutuminen määräävät sen päivän, jolloin munat ja synkronisesti kehittyvät nuoret eläimet kerätään.

On suositeltavaa pitää pysyvää varastoviljelmää, joka sisältää esimerkiksi 50 säiliötä/petrimaljaa. Varastoviljelmää on ruokittava hyvin; ruokaa on annettava ja viljelmä on kasteltava viikoittain, ja myös vanha ruoka ja jäännökset on poistettava. Jos substraatissa on liian vähän hyppyhäntäisiä, sienien kasvun lisääntyminen saattaa aiheuttaa inhibitiota. Jos varastoviljelmää käytetään munien tuotantoon liian usein, viljelmä voi väsyä. Sen merkkejä ovat kuolleet aikuiset ja home substraatissa. Synkronisten eläinten tuotannosta jäljelle jääneitä munia voidaan käyttää viljelmän uudistamiseen.

Synkronisessa *F. fimetaria* -viljelmässä koiraat erotetaan naaraista pääasiassa koon perusteella. Koiraat ovat selvästi pienempiä kuin naaraat, ja koiraat liikkuvat nopeammin kuin naaraat. Oikean sukupuolen valinta vaatii hieman harjoitusta. Sukupuoli voidaan vahvistaa sukupuolielinten alueen mikroskooppisella tutkimuksella (13).

1. **Kasvatus**

1.a. *Kasvatusalustan valmistelu*

Kasvatusalusta on kipsiä (kalsiumsulfaattia), joka sisältää myös aktiivihiiltä. Näin saadaan aikaan kostea alusta. Hiilen tehtävänä on imeä jätekaasuja ja eritteitä (14) (15). Hiilestä saa käyttää erilaisia tyyppejä, jotta hyppyhäntäisten havainnointi on mahdollista. *F. candida*- ja *F. fimetaria* -lajien kanssa käytetään esimerkiksi jauhemaista hiiltä (lopputuloksena on mustaa tai harmaata kipsiä):

Alustan ainesosat:

— 20 ml aktiivihiiltä

— 200 ml tislattua vettä

— 200 ml kipsiä

tai

— 50 g jauhemaista aktiivihiiltä

— 260–300 ml tislattua vettä

— 400 g kipsiä.

Alustaseoksen on annettava asettua ennen käyttöä.

1.b. *Kasvatus*

Hyppyhäntäisiä pidetään sopivissa säiliöissä, esimerkiksi petrimaljoissa (90 mm × 13 mm), joiden pohjalla on 0,5 cm:n kerros kipsistä ja hiilestä valmistettua substraattia. Niiden kasvatuslämpötila on 20 ± 1 °C ja valoisan ja pimeän vaihteluväli on 12/12 tuntia (400–800 luksia). Säiliöt pidetään kosteina, ja on varmistettava, että säiliöiden suhteellinen ilmankosteus on jatkuvasti 100 prosenttia. Tämä voidaan taata siten, että huokoisessa kipsissä on aina vapaata vettä, mutta vesikalvon muodostumista kipsipinnan päälle

▼M6

on kuitenkin vältettävä. Veden häviämistä voidaan ehkäistä pitämällä ympäröivä ilma kosteana. Säiliöistä pitää poistaa kaikki kuolleet yksilöt ja homeinen ruoka. Munantuotannon edistämiseksi aikuiset eläimet tulee siirtää petrimaljoihin, joissa on tuoretta kipsi-hiilisubstraattia.

1.c. *Ravinto*

Sekä *F. candidaa* että *F fimetariaa* ruokitaan ainoastaan kuivahiivajauheella. Tuoretta ruokaa annetaan kerran tai kahdesti viikossa homehtumisen välttämiseksi. Ruoka laitetaan suoraan kipsin päälle pieneen kasaan. Leivontahiivan määrä tulee mukauttaa hyppyhäntäispopulaation koon mukaan, mutta yleensä 2–15 g riittää.

2. **Synkronisointi**

Testi on tehtävä synkronisilla eläimillä, jotta käytettävissä on samassa kehitysvaiheessa olevia ja samankokoisia homogeenisia koe-eläimiä. Lisäksi synkronisointi mahdollistaa *F. fimetaria* -koiraiden ja naaraiden erottelun kolmen viikon iästä alkaen naaraiden ja koiraiden erilaisuuden, ts. kokoerojen perusteella. Jäljempänä esitetty menettely on esimerkki siitä, miten saadaan synkronisoituja elimiä (käytännön vaiheet ovat valinnaisia).

2.a. *Synkronisointi*

— Laita säiliöihin 0,5 cm:n kerros kipsi-hiilisubstraattia.

— Siirrä 150–200 aikuista *F. fimetaria*- ja 50–100 *F. candida* -lajin hyppyhäntäistä munintaa varten 15–20 parhaasta varastoviljelmäsäiliöstä, joiden kasvatusalusta on 4–8 viikkoa vanhaa, säiliöihin ja ruoki niitä 15 mg:lla leivontahiivaa. Vältä laittamasta nuoria eläimiä aikuisten sekaan, koska niiden läsnäolo saattaa estää munantuotannon.

— Pidä viljelmä 20 ± 1 °C:n lämpötilassa (keskilämpötilan tulisi olla 20 °C) ja huolehdi siitä, että valoisan ja pimeän vaihteluväli on 12/12 tuntia (400–800 luksia). Varmista, että saatavilla on tuoretta ruokaa ja että ilma on tarpeeksi kosteaa. Jos ruokaa ei ole, eläimet saattavat ulostaa munien päälle, jolloin niissä alkaa kasvaa sientä. *F. candida* -lajin eläimet voivat myös syödä omia muniaan. Kymmenen päivän kuluttua munat kerätään varovasti neulalla ja lastalla. Ne siirretään ”munapaperille” (pienille suodatinpaperipaloille, jotka on kastettu kipsi-hiilimassaan), joka asetetaan tuoretta kipsi-hiilisubstraattia sisältävään säiliöön. Substraattiin lisätään muutama murunen hiivaa, joka houkuttelee nuoret eläimet pois munapaperilta. On tärkeää, että munapaperi ja substraatti ovat kosteita, sillä muuten munat kuivuvat. Vaihtoehtoisesti aikuiset eläimet voidaan poistaa synkronisointikasvatuslaatikoista muninnan jälkeen kahdeksi tai kolmeksi päiväksi.

— Kolmen päivän kuluttua useimmat munapaperilla olevat munat ovat kuoriutuneet; myös munapaperin alla saattaa olla nuoria eläimiä.

— Jotta testissä olisi samanikäisiä nuoria eläimiä, munapaperi ja kuoriutumattomat munat poistetaan petrimaljasta pinseteillä. Nuoret eläimet, joiden ikä on 0–3 päivää, jäävät maljaan ja syövät ravinnokseen leivontahiivaa. Kuoriutumattomat munat hävitetään.

— Munia ja kuoriutuneita nuoria eläimiä kasvatetaan samalla tavalla kuin aikuisia. Etenkin *F. fimetarian* kohdalla on varmistettava, että tuoretta ruokaa on riittävästi ja että vanha homehtuva ruoka poistetaan. Lisäksi nuoret eläimet siirretään uusiin petrimaljoihin viikon kuluttua, jos niiden tiheys on yli 200.

▼M6

2.b. *Hyppyhäntäisten käsittely testin alussa*

— *F. candida* -yksilöt, joiden ikä on 9–12 päivää, tai *F. fimetaria* -yksilöt, joiden ikä on 23–26 päivää, kerätään esimerkiksi imulla ja siirretään pieneen säiliöön, jossa on kosteaa kipsi-hiilisubstraattia. Sen jälkeen niiden fyysinen kunto tarkastetaan kaksiokulaarisella mikroskoopilla (loukkaantuneet ja vaurioituneet eläimet hävitetään). Kaikki vaiheet tulee tehdä pitämällä hyppyhäntäiset kosteassa ympäristössä kuivuudesta aiheutuvan stressin välttämiseksi käyttämällä esimerkiksi märkiä pintoja jne.

— Käännä säiliö ylösalaisin ja koputa sen pohjaan, jotta hyppyhäntäiset kulkeutuvat maa-ainekseen. Staattinen sähkövaraus tulee neutraloida, muuten eläimet saattavat vain lentää ilmaan tai liimautua testisäiliön seinämään ja kuivua. Neutralointiin voi käyttää ionisaattoria tai kosteaa liinaa säiliön alla.

— Ruoka tulisi levittää maa-aineksen koko pinnan laajuudelle, ei siis vain yhteen kasaan.

— Siirto- ja testausvaiheen aikana tulee välttää kopauttamasta testisäiliöihin tai häiritsemästä eläimiä muulla tavoin, koska se saattaa lisätä maa-aineksen tiivistymistä ja häiritä hyppyhäntäisten välistä vuorovaikutusta.

3. **Vaihtoehtoiset hyppyhäntäislajit**

Tämän testimenetelmän mukaiseen testaukseen voi valita myös muita hyppyhäntäislajeja, esimerkiksi seuraavia: *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi* ja *Mesaphorura macrochaeta*. Tiettyjen vaatimusten on kuitenkin täytyttävä ennen vaihtoehtoisten lajien käyttämistä:

— Ne on täytynyt tunnistaa yksiselitteisesti.

— Lajien valinnan perustelut on ilmoitettava.

— On varmistettava, että testausvaiheeseen sisältyy lisääntymisbiologia, jotta se olisi mahdollinen vaikutusten kohde altistuksen aikana.

— Eläinten elinhistoria on tunnettava: ikä täysikasvuiseksi kehittymisen hetkellä, munien kehittymisen kesto sekä altistuksen aikainen kehitysvaihe.

— Kasvuun ja lisääntymiseen on oltava ihanteelliset olosuhteet, jotka saadaan aikaan testisubstraatin ja ravinnon avulla.

— Vaihtelun tulee olla riittävän vähäistä, jotta myrkyllisyys voidaan arvioida tarkasti ja täsmällisesti.

▼M6

Lisäys 4

Eläinten uuttaminen ja laskeminen

1. **Uuttaminen voidaan tehdä kahdella menetelmällä.**

1.a. Ensimmäinen menetelmä: Tässä menetelmässä voidaan käyttää säädettävää lämpötilagradienttia uuttolaitetta, joka perustuu MacFadyenin periaatteisiin (1). Lämpö tulee uuttolaatikon päällä olevasta lämmityselementistä (ja sitä säädellään termistorilla, joka asetetaan maanäytteen pinnalle). Keruuastiaa ympäröivän jäähdytysnesteen lämpötilaa säädellään termistorilla, joka sijaitsee keruulaatikon pinnalla (se asetetaan maa-aineksen ytimen alle). Termistorit liitetään ohjelmoitavaan ohjauslaitteeseen, joka nostaa lämpötilaa ohjelmoidun aikataulun mukaisesti. Eläimet kerätään jäähdytettyyn keruuastiaan (2 °C), jonka pohjalla on kipsi-hiilikerros. Uutto aloitetaan 25 °C:ssa, ja lämpötilaa nostetaan automaattisesti 12 tunnin välein 5 °C:lla. Uuton kokonaiskesto on 48 tuntia. Uutto päättyy, kun lämpötila on ollut 12 tunnin ajan 40 °C.

1.b. Toinen menetelmä: Kokeellisen inkubaatiovaiheen nuorten hyppyhäntäisten lukumäärä arvioidaan flotaatiotutkimuksessa. Testi tehdään astioissa, joiden tilavuus on noin 250 ml. Testin lopuksi astioihin lisätään noin 200 ml tislattua vettä. Maa-ainesta sekoitetaan hienoharjaksisella siveltimellä, jotta hyppyhäntäiset nousevat kellumaan vedenpinnalle. Veteen voi lisätä pienen määrän, noin 0,5 ml, Kentmere Photographicin mustaa väriainetta. Se auttaa eläinten laskemista lisäämällä veden ja valkoisten hyppyhäntäisten välistä kontrastia. Väriaine ei ole hyppyhäntäisille myrkyllistä.

2. **Laskeminen:**

Eläinten lukumäärät voidaan laskea paljain silmin tai valomikroskoopilla, jolloin kellunta-astian päälle tulee laittaa ristikko, tai valokuvaamalla jokaisen astian pinta ja laskemalla hyppyhäntäiset myöhemmin suurennetuista kuvista tai valkokankaalle heijastetuista diakuvista. Laskenta voidaan tehdä myös käyttämällä digitaalisia kuvankäsittelytekniikoita (12). Kaikki tekniikat on validoitava.

▼M6

Lisäys 5

Maan enimmäisvedenpidätyskyvyn määrittäminen

Seuraavan menetelmän, jolla määritetään maan enimmäisvedenpidätyskyky, on havaittu olevan tarkoituksenmukainen. Se on kuvattu saasteiden vaikutuksia maan laatuun koskevan ISO DIS 11268-2 (Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) Osa 2: Method for determination of effects on reproduction) -standardin liitteessä C.

Kerää tietty määrä (esimerkiksi viisi grammaa) testimaasubstraattia sopivalla näytteenottovälineellä (kierrekairalla tms.). Aseta kierrekairaputken pohjalle pala märkää suodatinpaperia, ja laita se sitten telineessä vesiastiaan. Putki tulee upottaa veteen vähitellen, kunnes vedenpinta on maanäytteen yläpuolella. Sen jälkeen näyte tulee pitää vedessä kolme tuntia. Koska kaikkea maa-aineksen kapillaareihin imeytynyttä vettä ei pystytä pidättämään, maanäytteen on annettava valua kahden tunnin ajan asettamalla putki hyvin märkään kerrokseen hienojakoista kvartsihiekkaa, joka on laitettu peitettävään astiaan (kuivumisen estämiseksi). Sen jälkeen näyte on punnittava ja kuivattava pysyvään massaan 105 °C:ssa. Vedenpidätyskyky (WHC) lasketaan seuraavasti:

$$\text{WHC (prosenttiosuus kuivamassasta)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

jossa:

S: vesikyllästetty substraatti + putken massa + suodatinpaperin massa

T: taara (putken massa + suodatinpaperin massa)

D: substraatin kuivamassa.

▼**M6**

Lisäys 6

Maan pH:n määrittäminen

Seuraava menetelmä, jolla määritetään maan pH-arvo, perustuu maan laatua koskevassa standardissa ISO DIS 10390: Soil Quality – Determination of pH olevaan kuvaukseen.

Tietyn määrän maata annetaan kuivua huoneenlämmössä vähintään 12 tunnin ajan. Sen jälkeen maasta valmistetaan suspensio (joka sisältää vähintään viisi grammaa maata), jonka tilavuus on viisinkertainen joko analyyttista laatua olevan 1 M kaliumkloridiliuoksen (KCl) tilavuuteen tai analyyttista laatua olevan 0,01 M kalsiumkloridiliuoksen ($CaCl_2$) tilavuuteen nähden. Sen jälkeen suspensiota ravistetaan perinpohjaisesti viisi minuuttia, ja sen annetaan asettua vähintään kaksi mutta enintään 24 tuntia. Nestefaasin pH-arvo mitataan pH-mittarilla, joka kalibroidaan ennen jokaista mittausta käyttämällä asianmukaisia puskuriliuoksia (esimerkiksi pH 4,0 ja 7,0).

▼M6

C.40. SURVIAISSÄÄSKEN KOKO SUKUPOLVEN KIERRON KÄSITTÄVÄ MYRKYLLISYYSTESTI, KÄYTTÄEN VETTÄ TAI SEDIMENTTIÄ, JOIHIN ON LISÄTTY TUTKITTAVAA AINETTA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 233 (2010). Sen tarkoituksena on arvioida koko elinkaaren aikaisen kemikaaleille altistumisen vaikutuksia makeanveden kaksisiipisiin, jotka kuuluvat *Chironomous* sp. -lajiin. Tutkimus kattaa kokonaan ensimmäisen sukupolven (P-sukupolvi) ja toisen sukupolven varhaisvaiheen (F1-sukupolvi). Kyseessä on laajennus nykyiseen testimenetelmään C.28 (1) tai C.27 (15), joissa käytettävässä altistumisskenaariossa veteen tai sedimenttiin on lisätty tutkittavaa ainetta. Menetelmässä otetaan huomioon lajeja *Chironomus riparius* ja *Chironomus dilutus* (aiemmin nimeltään *C. tentans* (2)) koskevat myrkyllisyystestiprotokollat, jotka on laadittu Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) ja jotka on myöhemmin rengastestattu (1) (7) (10) (11) (12). Myös muita hyvin dokumentoituja surviaissääskilajeja, kuten *Chironomus yoshimatsui* -lajia (13)(14), voidaan käyttää. *C. ripariuksen* ja *C. yoshimatsuin* altistuksen kokonaiskesto on noin 44 päivää, ja *C. dilutuksen* osalta se on noin 100 päivää.

2. Sekä vesi- että sedimenttialtistumisskenaariot kuvataan tässä testimenetelmässä. Soveltuvan altistusskenaarion valinta määräytyy testin sovellustarkoituksen mukaan. Vesialtistuksessa, jossa testiainetta lisätään vesipatsaaseen, tarkoituksena on simuloida torjunta-aineiden lentosumutusta. Se kattaa alkuhuippupitoisuudet pintavedessä. Testiaineen lisäämistä veteen voidaan käyttää myös muuntyyppisessä altistuksessa (myös kemikaalivuodoissa), mutta ei sellaisissa tutkimuksissa, joissa tarkastellaan sedimenttiin kertymisen prosesseja testausjaksoa pitemmän aikaa. Tässä tapauksessa ja myös silloin, kun valuma on torjunta-aineiden pääasiallinen kulkeutumisreitti vesistöihin, tutkimus, jossa sedimenttiin on lisätty testiainetta, voi olla sopivampi. Jos muut altistumisskenaariot ovat tarpeen, testin rakennetta voi muuttaa helposti. Esimerkiksi jos tietoa testikemikaalin jakaantumisesta vesifaasiin ja sedimenttikerrokseen ei tarvita ja jos sedimenttiin adsorptoituminen on minimoitava, keinotekoisen sedimenttikorvikkeen (kuten kvartsihiekan) käyttöä voidaan harkita.

3. Kemikaalit, jotka edellyttävät sedimentissä elävien organismien testaamista, saattavat pysyä sedimentissä pitkiä aikoja. Sedimentissä elävät organismit voivat altistua useita reittejä pitkin. Jokaisen altistusreitin suhteellinen tärkeys sekä myrkylliseen kokonaisvaikutukseen vaadittava aika määräytyvät käytettävän kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva kemikaali tai kemikaali, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, kontaminoituneen ravinnon nauttiminen voi olla tärkeä altistusreitti. Jotta hyvin rasvahakuisten aineiden myrkyllisyyttä ei aliarvioida, voidaan harkita ravinnon lisäämistä sedimenttiin ennen testiaineen lisäämistä (ks. 31 kohta). Näin ollen tutkimukseen on mahdollista ottaa mukaan kaikki altistumisreitit ja kaikki elinkaaren vaiheet.

4. Mitattavat ominaisuudet ovat kehittyneiden aikuisten kokonaismäärä (sekä 1. että 2. sukupolvi), kehittymisnopeus (sekä 1. että 2. sukupolvi), täysin kehittyneiden ja elävien sääskien sukupuolten välinen suhde (sekä 1. että 2. sukupolvi), munaryppäiden lukumäärä naarasta kohti (vain 1. sukupolvi) sekä munaryppäiden hedelmällisyys (vain 1. sukupolvi).

5. Synteettisen sedimentin käyttö on erittäin suositeltavaa. Synteettisellä sedimentillä on useita etuja luonnolliseen sedimenttiin verrattuna:

▼M6

— kokeellinen vaihtelu vähenee, koska sedimentti on toistettava ”vakiomatriisi”, eikä kontaminoitumattomia ja puhtaita sedimenttilähteitä tarvitse etsiä

— testit voidaan aloittaa milloin tahansa ilman, että testisedimentissä ilmenee kausivaihtelua, eikä sedimenttiä tarvitse esikäsitellä poistamalla siitä kotoperäiset eläimet

— kustannukset pienenevät verrattuna siihen, että rutiinitestaukseen tarvittavat määrät sedimenttiä kerättäisiin pellolta

— synteettisen sedimentin avulla voidaan vertailla myrkyllisyyttä eri tutkimusten välillä ja luokitella kemikaalit sen mukaisesti (3).

6. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

7. Surviaissääsken ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukat altistetaan testikemikaalin pitoisuusalueelle sedimentti-vesisysteemissä. Testi aloitetaan laittamalla (ensimmäisen sukupolven) munatoukat laboratoriolaseihin, jotka sisältävät sedimenttiä, johon on lisätty testattavaa kemikaalia. Vaihtoehtoisesti testikemikaali voidaan lisätä veteen toukkien laittamisen jälkeen. Arvioitavia seikkoja ovat surviaissääskien kuoriutuminen, siihen kuluva aika sekä täysin kehittyneiden ja elävien sääskien sukupuolten välinen suhde. Kehittyneet aikuiset siirretään kasvatushäkkeihin, jotta ne voivat parveilla, paritella ja munia. Tuotettujen munaryppäiden lukumäärä ja niiden hedelmällisyys arvioidaan. Näistä munaryppäistä saadaan toisen sukupolven ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukat. Nämä toukat laitetaan uusiin valmisteltuihin laboratoriolaseihin (kemikaalin lisäämismenettely kuten 1. sukupolven yhteydessä), ja toisen sukupolven elinkelpoisuutta määritetään arvioimalla niiden kuoriutumista, siihen kuluvaa aikaa sekä täysin kehittyneiden sääskien sukupuolten välistä suhdetta (kaavakuva sukupolven kierron kattavasta testistä on lisäyksessä 5). Kaikki tiedot analysoidaan joko regressiomallilla sen pitoisuuden arvioimiseksi, joka aiheuttaa x prosentin vähennyksen kyseisessä ominaisuudessa, tai käyttämällä hypoteesitestausta, jotta saadaan määritettyä pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC). Jälkimmäinen testi edellyttää käsittelyvasteiden vertailua asianmukaisiin kontrollivasteisiin tilastollisia testejä käyttämällä. Skenaariossa, jossa testattavaa kemikaalia lisätään veteen, ja jos kemikaalit ovat nopeasti hajoavia, kunkin sukupolven myöhemmissä vaiheissa (esimerkiksi kotelovaiheessa) olevat eläimet saattavat altistua huomattavasti pienemmälle pitoisuudelle yläpuolisessa vedessä kuin ensimmäisen sukupolven munatoukat. Jos tämä aiheuttaa huolta ja jos jokaisessa vaiheessa tarvitaan samankaltainen altistustaso, seuraavia muutoksia testimenetelmään voidaan harkita:

— rinnakkaistestit, joissa kemikaali lisätään eri kehitysvaiheissa

— kemikaalin lisääminen (tai sedimentin yläpuolisen veden vaihtaminen) testijärjestelmään toistuvasti kummankin testivaiheen aikana (1. sukupolvi ja 2. sukupolvi), jolloin kemikaalin lisäämisen (veden vaihtamisen) välit on mukautettava testikemikaalin käyttäytymisominaisuuksien perusteella.

Tällaiset muutokset ovat mahdollisia skenaariossa, jossa kemikaalia lisätään veteen, mutta eivät skenaariossa, jossa kemikaalia lisätään sedimenttiin.

TESTIKEMIKAALI KOSKEVIA TIETOJA

8. Seuraavien seikkojen on oltava tiedossa: testikemikaalin vesiliukoisuus, höyrynpaine, log K_{ow}-arvo, mitattu tai laskettu erottuminen sedimenttiin sekä stabiilius vedessä ja sedimentissä. Käytössä on oltava luotettava analyysimenetelmä, jolla testikemikaali voidaan kvantifioida sedimentin yläpuolisessa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä. Menetelmän tarkkuus ja havaitsemisraja on tiedettävä, ja ne täytyy raportoida. Hyödyllisiä

▼M6

tietoja ovat esimerkiksi rakennekaava ja testikemikaalin puhtaus. Tiedot testikemikaalin kemiallisesta käyttäytymisestä (esimerkiksi häviäminen, abioottinen ja bioottinen hajoaminen jne.) ovat myös hyödyllisiä. Kirjallisuusviitteessä (16) annetaan lisäohjeita sellaisten kemikaalien testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

VERTAILUKEMIKAALIT

9. Vertailuaineita voidaan testata silloin tällöin sen varmistamiseksi, ettei laboratoriopopulaation herkkyys ole muuttunut. Kuten vesikirppujen yhteydessä, 48 tunnin välitöntä myrkyllisyyttä koskevan testin tekeminen riittää (kirjallisuusviitteen 17 mukaan). Kuitenkin siihen saakka, kunnes validoidut ohjeet välittömän myrkyllisyyden testistä ovat saatavilla, tämän lisäyksen C.28 kohdan mukaista kroonista myrkyllisyyttä koskevaa testiä on syytä harkita. Esimerkkejä myrkyllisistä vertailuaineista, joita on käytetty onnistuneesti rengastesteissä ja validointitutkimuksissa, ovat lindaani, trifluraliini, pentakloorifenoli, kadmiumkloridi ja kaliumkloridi. (1) (3) (6) (7) (18).

KOKEEN VALIDITEETTI

10. Testi on luotettava, jos

— Kontrollikäsittelyssä keskimääräisen kuoriutumisen on oltava kummassakin sukupolvessa vähintään 70 prosenttia altistusjakson päättyessä (1) (7).

— *C. riparius*- ja *C. yoshimatsui* -lajien osalta kontrollikäsittelyn kummankin sukupolven kaikista kehittyneistä aikuisista sääskistä 85 prosentin tulee kehittyä 12–23 päivän kuluessa siitä, kun ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukat laitettiin testiastioihin. *C. dilutuksen* osalta 20–65 päivän mittainen ajanjakso on hyväksyttävä.

— Kummankin sukupolven kontrollikäsittelyssä täysin kehittyneiden ja elävien aikuisten sääskien (naaras- ja koirasfraktiona) keskimääräisen sukupuolten välisen suhteen tulee olla vähintään 0,4 ja enintään 0,6.

— Jokaisessa kasvatushäkissä ensimmäisen sukupolven kontrollien munaryppäiden määrän tulee olla vähintään 0,6 kutakin häkkiin laitettua naarasta kohti.

— Jokaisessa kasvatushäkissä ensimmäisen sukupolven kontrollien hedelmällisten munaryppäiden fraktion tulee olla vähintään 0,6.

— Kummankin sukupolven altistusjakson päätyttyä jokaisesta astiasta on mitattava pH-arvo sekä liuenneen hapen pitoisuus. Happipitoisuuden on oltava vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta (ASV ([1])), ja sedimentin yläpuolisen veden pH-arvon tulee olla 6–9 kaikissa testiastioissa.

— Veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,0 °C.

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat ja kasvatushäkit

11. Toukat altistetaan 600 ml:n laboratoriolaseissa, joiden halkaisija on noin 8,5 mm (ks. lisäys 5). Muitakin astioita voidaan käyttää, kunhan sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys on sopiva. Sedimentin pinta-alan on oltava riittävä, jotta tilaa on 2–3 cm^2 toukkaa kohden. Sedimenttikerroksen ja sen yläpuolisen veden syvyyden suhteen on oltava 1:4. Kasvatushäkkien (joiden

([1]) 20 °C:n lämpötilassa ja vakiopaineessa ASV makeassa vedessä on 9,1 mg/l (60 prosenttia vastaa arvoa 5,46 mg/l)

▼M6

korkeuden, leveyden ja pituuden on oltava vähintään 30 cm) päällä ja vähintään yhdellä sivulla on oltava verkko (silmäkoko n. 1 mm) (ks. lisäys 5). Munintaa varten jokaiseen häkkiin asetetaan kahden litran kiteytysmalja, joka sisältää testivettä ja -sedimenttiä. Myös kiteytysmaljan osalta sedimenttikerroksen ja sen yläpuolisen veden syvyyden suhteen on oltava jotakuinkin 1:4. Kun munaryppäät on kerätty kiteytysmaljasta, ne laitetaan 12-kuoppaiseen mikrotitterilevyyn (yksi rypäs yhteen kuoppaan, jossa on vähintään 2,5 ml vettä testikemikaalia sisältävästä kiteytysmaljasta). Sen jälkeen levyt peitetään kannella huomattavan haihtumisen estämiseksi. Myös muita sopivia astioita munaryppäiden säilyttämiseen voi käyttää. Mikrotitterilevyjä lukuun ottamatta kaikkien testiastioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testijärjestelmän kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia (esimerkiksi polytetrafluorietyleeniä).

Lajin valinta

12. Paras laji tähän testiin on *Chironomus riparius*. Myös *C. yoshimatsui* -lajia voi käyttää. *C. dilutus* on myös sopiva, mutta sitä on hankalampi käsitellä ja se edellyttää pidempää testijaksoa. Viljelymenetelmien yksityiskohtia käsitellään *C. ripariuksen* osalta tarkemmin lisäyksessä 2. Tietoa on saatavilla myös *C. dilutuksen* (5) ja *C. yoshimatsuin* viljelyolosuhteista (14). Lajin tunnistus on varmistettava ennen testiä, mutta sitä ei ole tarpeen tehdä ennen jokaista testiä, jos eliöt ovat peräisin laboratorion omasta viljelmästä.

Sedimentti

13. Synteettisen sedimentin (keinosedimentin) käyttö on suositeltavaa. Jos kuitenkin käytetään luonnollista sedimenttiä, se on kuvailtava (vähintään pH, orgaaninen kokonaishiilipitoisuus, mutta myös muut parametrit, kuten C/N-suhde ja rakeisuus ovat suositeltavia), eikä siinä saa olla kontaminaatiota tai muita organismeja, jotka saattavat kilpailla surviaissääsken toukkien kanssa tai syödä ne. Lisäksi on suositeltavaa, että sedimentit saavat sopeutua testiolosuhteisiin seitsemän päivän ajan. Suositeltava (1) (20) (21) synteettinen sedimentti, jota on kuvattu kirjallisuusviitteessä (1), valmistetaan seuraavasti:

a. 4–5 % (kuivapaino) turvetta: pH mahdollisimman tarkasti 5,5–6,0; on tärkeää käyttää jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm), ja ainoastaan ilmakuivattua versiota.

b. 20 % (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 %).

c. 75–76 % (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, jossa yli puolet 50–200 µm:n hiukkasia).

d. Deionisoitua vettä lisätään, kunnes lopullisen seoksen kosteus on 30—50 %.

e. Kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5.

f. Orgaanisen hiilen pitoisuuden on oltava lopullisessa seoksessa 2 % (± 0,5 %). Sitä voidaan säätää lisäämällä sopiva määrä turvetta ja hiekkaa kohtien a ja c mukaisesti.

14. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperän on oltava tiedossa. Tarkista, ettei sedimentin ainesosissa ole kemikaalista kontaminaatiota (esimerkiksi

▼M6

raskasmetalleja, orgaanisia klooriyhdisteitä ja orgaanisia fosforiyhdisteitä). Esimerkki synteettisen sedimentin valmistuksesta on lisäyksessä 3. Myös kuivien ainesosien sekoittaminen on hyväksyttävää, jos voidaan osoittaa, että sedimentin ainesosat eivät erotu (esim. kelluvia turvehiukkasia) veden lisäämisen jälkeen ja että turve tai sedimentti on sopeutunut tarpeeksi.

Vesi

15. Testivedeksi soveltuu vesi, joka täyttää lisäyksissä 2 ja 4 luetellut laimennusveden kemialliset ominaisuudet. Kasvatus- ja testivedeksi soveltuu mikä tahansa vesi, luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi (katso lisäys 2) tai talousvesi, josta on poistettu kloori, jos surviaissääsket voivat elää siinä viljelyn ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Testiveden pH-arvon on oltava testin alussa 6–9, eikä kokonaiskovuus $CaCO_3$:na saa olla yli 400 mg/l. Jos kovuusionien ja testikemikaalin välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä). Samantyyppistä vettä on käytettävä koko tutkimuksen ajan. Lisäyksessä 4 luetellut vedenlaadun ominaisuudet on mitattava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi.

Varastoliuokset – vesi, johon on lisätty testikemikaalia

16. a. Testipitoisuudet lasketaan vesipatsaan eli sedimentin yläpuolisen veden pitoisuuksien perusteella. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan tavallisesti varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuokset valmistetaan mieluiten liuottamalla testikemikaalia testiveteen. Liuottimien tai dispergointiaineiden käyttö voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Esimerkkejä sallituista liuottimista ovat asetoni, etyleeniglykolimonoetyylieetteri, etyleeniglykolidimetyylieetteri, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sallittuja dispergointiaineita ovat Cremophor RH40, Tween 80, 0,01-prosenttinen metyyliselluloosa ja HCO-40. Liuotusapuaineen pitoisuuden on oltava mahdollisimman pieni lopullisessa testiviljelyaineessa (≤ 0,1 ml/l), ja sen on oltava sama kaikissa käsittelyissä. Kun käytetään liuotusapuainetta, sillä ei saa olla merkittäviä vaikutuksia eloonjäämiseen, mikä käy ilmi liuotinkontrollista, kun sitä verrataan negatiiviseen (vesi)kontrolliin. Näiden aineiden käyttöä on kuitenkin vältettävä mahdollisimman pitkälle.

Varastoliuokset – sedimentti, johon on lisätty testikemikaalia

16.b. Sedimentit, joiden pitoisuus on haluttu, valmistetaan yleensä lisäämällä testikemikaaliliuosta suoraan sedimenttiin. Testikemikaalin varastoliuos, joka on liuotettu deionisoituun veteen, sekoitetaan synteettiseen sedimenttiin valssauskoneella, sekoittimella tai käsin. Jos testikemikaali liukenee huonosti veteen, se voidaan liuottaa käyttämällä pienintä mahdollista määrää soveltuvaa orgaanista liuotinta (esimerkiksi heksaania, asetonia tai kloroformia). Seuraavaksi liuokseen sekoitetaan 10 g hienoa kvartsihiekkaa yhtä testiastiaa kohden. Sen jälkeen liuottimen annetaan haihtua; sen pitäisi hävitä hiekasta kokonaan, minkä jälkeen hiekkaan sekoitetaan sopiva määrä sedimenttiä. Testikemikaalin liuottamiseen, dispergoimiseen tai emulgointiin saa käyttää vain helposti haihtuvia aineita. On pidettävä mielessä, että testikemikaalin ja hiekkaseoksen mukana tuleva hiekka on otettava huomioon sedimentin valmistuksessa (eli sedimentin valmistukseen on käytettävä pienempi määrä hiekkaa). Varmista huolellisesti, että

▼M6

sedimenttiin lisättävä testikemikaali sekoittuu sedimenttiin hyvin ja tasaisesti. Homogeenisuusasteen voi määrittää tarvittaessa analysoimalla osanäytteitä.

TESTISUUNNITELMA

17. Testin suunnittelu tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, testiastioiden lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti, toukkien lukumäärää kutakin astiaa kohti sekä kiteytysmaljojen ja kasvatushäkkien lukumäärää. $EC_{x,}$- ja NOEC-arvoja sekä raja-annostestiä koskevat suunnitelmat kuvataan jäljempänä.

Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma

18. Testin on katettava vaikuttava pitoisuus ($EC_{x,}$) ja se pitoisuusalueväli, jossa testikemikaalin vaikutuksella on merkitystä, siten, että ominaisuutta ei ekstrapoloida saatujen tietojen rajojen ulkopuolelle. Paljon pienimmän pitoisuuden alapuolelle tai suurimman pitoisuuden yläpuolelle menevää ekstrapolointia tulee välttää. Testimenetelmien C.27 tai C.28 mukaisesta alustavasta pitoisuusalueen määritystestistä saattaa olla apua, kun valitaan testipitoisuuksien sopivaa vaihteluväliä.

19. EC_x-lähestymistavassa tarvitaan vähintään viisi pitoisuutta ja kahdeksan rinnakkaisnäytettä kutakin pitoisuutta kohti. Jokaisen pitoisuuden yhteydessä on käytettävä kahta kasvatushäkkiä (A) ja (B). Kahdeksan rinnakkaisnäytettä jaetaan kahteen ryhmään, joissa kummassakin on neljä rinnakkaisnäytettä, ja nämä kaksi ryhmää vastaavat kumpaakin kasvatushäkkiä. Rinnakkaisnäytteet on tarpeen yhdistää tällä tavalla siksi, että häkissä tarvitaan tietty määrä sääskiä vankkojen lisääntymisarviointien tekemiseksi. Toisessa sukupolvessa on kuitenkin taas kahdeksan rinnakkaisnäytettä, jotka ovat saaneet alkunsa kasvatushäkkien altistuneista populaatioista. Pitoisuuksien välinen kerroin ei saa olla yli kaksi (poikkeus voidaan tehdä, jos annosvastekäyrä on loiva). Käsittelyssä käytettävien rinnakkaisnäytteiden määrää voidaan vähentää kuuteen (kolme kumpaakin kasvatushäkkiä kohti), jos eri vasteita aiheuttavien testipitoisuuksien määrää lisätään. Jos rinnakkaisnäytteiden määrää lisätään tai testipitoisuuden välejä pienennetään, EC_X-testin luottamusväli yleensä kapenee.

NOEC-arvon estimointiin suositeltava testisuunnitelma

20. NOEC-lähestymistavassa on käytettävä viittä testipitoisuutta ja vähintään kahdeksaa rinnakkaisnäytettä (neljä kumpaakin kasvatushäkkiä, A:ta ja B:tä, kohti), ja pitoisuuksien välinen kerroin saa olla enintään kaksi. Rinnakkaisnäytteiden määrän on oltava riittävän suuri, jotta tilastollinen voima on riittävä ja kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla (α = 0,05). Kehittymisnopeuden, hedelmällisyyden ja lisääntymiskyvyn osalta varianssianalyysi on yleensä tarkoituksenmukainen, ja sen jälkeen voi tehdä Dunnettin testin tai Williamsin testin (22–25). Kuoriutumisasteen ja sukupuolten välisen suhteen osalta Cochran-Armitagen testi, Fisherin tarkka testi (Bonferroni-korjauksella) tai Mantel-Haentzalin testi voivat olla sopivia.

Raja-annostesti

21. Raja-annostestin voi tehdä (yksi testipitoisuus ja kontrolli(t)), jos valinnaisessa pitoisuusalueen määritystestissä ei havaita vaikutuksia edes enimmäispitoisuudella. Raja-annostestin tarkoituksena on osoittaa, että testikemikaalin myrkyllisiä vaikutuksia havaitaan pitoisuuksilla, jotka ovat suurempia kuin testattu rajapitoisuus. Veden osalta pitoisuudeksi ehdotetaan 100 mg/l ja sedimentin osalta 1 000 mg/kg (kuivapaino). Yleensä vähintään kahdeksan rinnakkaisnäytettä sekä käsittelystä että kontrollista on

▼M6

tarpeen. On osoitettava, että tilastollinen voima on riittävä, jotta kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla (α = 0,05). Jos vaste on metrinen (kehittymisnopeus), t-testi on soveltuva tilastollinen menetelmä, jos aineisto täyttää tämän testin vaatimukset (normaalisuus, homogeeniset vaihtelut). Jos nämä vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia, tai parametritonta testiä, kuten Wilcoxon-Mann-Whitneyn testiä. Fisherin tarkka testi soveltuu kuoriutumisasteeseen.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Vesi-sedimenttijärjestelmän valmistelu (testikemikaalin lisääminen veteen)

22. a. Jokaiseen testiastiaan ja kiteytysmaljaan laitetaan vähintään 1,5 cm:n (kiteytysmaljaan voi laittaa hieman vähemmänkin) ja enintään 3 cm:n kerros synteettistä sedimenttiä (ks. 13–14 kohta ja lisäys 3). Vettä (ks. 15 kohta) lisätään siten, että sedimenttikerroksen syvyyden ja veden syvyyden suhde on enintään 1:4. Testiastioiden valmistelun jälkeen sedimentti-vesijärjestelmän tulee antaa asettua kevyesti ilmastettuna noin seitsemän päivän ajan ennen ensimmäisen tai toisen sukupolven ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkien lisäämistä (ks. 14 kohta ja lisäys 3). Kiteytysmaljojen sedimentti-vesijärjestelmää ei ilmasteta testin aikana, koska niiden ei tarvitse tukea toukkien elossapysymistä (munat on jo kerätty ennen niiden kuoriutumista). Sedimentin voi peittää muovikiekolla, kun testivettä lisätään vesipatsaaseen, jotta sedimentin ainesosien erottuminen ja hienon materiaalin resuspensio voidaan välttää, mutta kiekko on poistettava heti tämän jälkeen. Myös muut välineet voivat olla sopivia.

Vesi-sedimenttijärjestelmän valmistelu (testikemikaalin lisääminen sedimenttiin)

22. b Sedimentit, jotka on valmisteltu 16.b kohdan mukaisesti ja joihin on lisätty testikemikaalia, laitetaan astioihin ja kiteytysmaljaan, ja niiden päälle lisätään vettä siten, että sedimentin ja veden tilavuuden suhde on 1:4. Sedimenttikerroksen syvyyden tulisi olla 1,5–3 cm (kiteytysmaljassa se voi olla vähän matalampi). Sedimentin voi peittää muovikiekolla, kun testivettä lisätään vesipatsaaseen, jotta sedimentin ainesosien erottuminen ja hienon materiaalin resuspensio voidaan välttää, mutta kiekko on poistettava heti tämän jälkeen. Myös muut välineet voivat olla sopivia. Kun sedimenttiin on lisätty testikemikaali ja sedimentin päälle on lisätty vesi, testikemikaalin on hyvä antaa erottua sedimentistä vesifaasiin (4) (5)(7) (18). Tämä on suositeltavaa tehdä samassa lämpötilassa ja ilmastuksessa, joita testissä käytetään. Sopiva tasapainottumisaika on sedimentti- ja kemikaalikohtaista, ja se voi vaihdella tunneista päiviin; harvinaisissa tapauksissa se voi olla jopa viisi viikkoa. Koska monet kemikaalit voisivat hajota tässä ajassa, tasapainotilaa ei jäädä odottamaan, vaan tasapainottumisajaksi suositellaan 48:aa tuntia. Jos kuitenkin tiedetään, että sedimentissä olevan kemikaalin hajoamisen puoliintumisaika on pitkä, tasapainottumisaikaa voi pidentää. Tämän tasapainottumisajan jälkeen testikemikaalin pitoisuus on mitattava sedimentin yläpuolisessa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä vähintään suurimman pitoisuuden ja yhden pienemmän pitoisuuden osalta (ks. 38 kohta). Näiden testikemikaalin analyyttisten määritysten perusteella voidaan laskea massatase, ja tulokset voidaan ilmoittaa mitattujen pitoisuuksien pohjalta.

23. Testiastiat on peitettävä (esimerkiksi lasilevyillä). Tutkimuksen aikana vettä voidaan tarvittaessa lisätä alkuperäiseen tilavuuteen saakka haihtumisen kompensoimiseksi. Käytä tähän tarkoitukseen tislattua tai deionisoitua vettä, jotta suoloja ei keräydy. Kasvatushäkeissä olevia kiteytysmaljoja ei peitetä, ja testijakson aikaista veden haihtumista saa

▼M6

kompensoida lisäämällä vettä, mutta se ei ole välttämätöntä, koska munaryppäät ovat kosketuksissa veden kanssa vain noin yhden päivän ajan ja koska maljoja käytetään testissä vain lyhyen aikaa.

Testiorganismien lisääminen

24. Neljä tai viisi päivää ennen ensimmäisen sukupolven ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkien lisäämistä viljelmästä on poistettava munamassat, ja ne tulee laittaa pieniin astioihin kasvatusalustalle. Alustana voidaan käyttää varastoliuoksesta saatua kypsynyttä alustaa tai vasta valmistettua alustaa. Kasvatusalustalle on lisättävä pieni määrä ruokaa, esimerkiksi muutama pisara filtraattia, joka on tehty hiutalemaisen kalanruoan hienoksi jauhetusta suspensiosta (ks. lisäys 2). Käytä ainoastaan vastamunittuja munamassoja. Tavallisesti toukat alkavat kuoriutua muutaman päivän kuluttua muninnasta (*C. riparius* kuoriutuu 2–3 päivässä, kun lämpötila on 20 °C, ja *C. dilutus* 1–4 päivässä, kun lämpötila on 23 °C; *C. yoshimatsui* tarvitsee 25 °C:n lämpötilan). Toukat kasvavat neljässä vaiheessa, joista jokainen kestää 4–8 päivää. Testissä käytetään ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkia (enintään kaksi vrk kuoriutumisen jälkeen). Ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukat voidaan tarkastaa käyttämällä pääkotelon leveyttä (7).

25. Kaksikymmentä ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkaa ensimmäisestä sukupolvesta jaetaan satunnaisesti kuhunkin testiastiaan, joka sisältää sedimentti-vesijärjestelmän, käyttämällä tylppäkärkistä pipettiä. Veden ilmastus keskeytetään siksi aikaa, kun toukkia lisätään testiastioihin, ja se tulee pitää keskeytettynä 24 tunnin ajan toukkien lisäämisen jälkeen (ks. 32 kohta). Käytettävän testisuunnitelman (ks. 19 ja 20 kohta) mukaan kutakin pitoisuutta kohti käytettävien toukkien määrä on EC_X-tutkimuksessa vähintään 120 (kuusi rinnakkaisnäytettä pitoisuutta kohti) ja NOEC-tutkimuksessa 160 (kahdeksan rinnakkaisnäytettä pitoisuutta kohti). Tutkimuksessa, jossa sedimenttiin on lisätty testikemikaalia, altistus alkaa toukkien lisäämisellä.

Testikemikaalin lisääminen sedimentin yläpuoliseen veteen

26. Vuorokauden (24 h) kuluttua ensimmäisen sukupolven ensimmäisessä kehitysvaiheessa olevien munatoukkien lisäämisestä testikemikaali lisätään sedimentin yläpuoliseen vesipatsaaseen, ja kevyt ilmastus aloitetaan uudestaan (ks. testisuunnitelman mahdolliset muutokset 7 kohdasta). Pieni määrä testikemikaalia sisältävää varastoliuosta lisätään pipetillä vedenpinnan alle. Sen jälkeen sedimentin päällä oleva vesi sekoitetaan varoen häiritsemästä sedimenttiä. Tutkimuksessa, jossa kemikaali lisätään veteen, altistus aloitetaan, kun kemikaali on lisätty veteen (ts. yhden päivän kuluttua toukkien lisäämisestä).

Kuoriutuneiden aikuisten kerääminen

27. Ensimmäisen sukupolven kuoriutuneet sääsket kerätään testiastioista vähintään kerran mutta mieluiten kahdesti päivässä (ks. kohta 36) käyttämällä imulaitetta, imuria tai vastaavaa laitetta (ks. lisäys 5). Keräämisessä on oltava varovainen, etteivät aikuiset sääsket vaurioidu. Yhden käsittelyn neljästä testiastiasta kerätyt sääsket laitetaan siihen kasvatushäkkiin, jossa ne olivat aiemmin olleet. Kun ensimmäinen sääski (koiras) kuoriutuu, kiteytysmaljoihin laitetaan pipetillä pieni määrä testikemikaalin varastoliuosta veden pinnan alle (tutkimus, jossa testikemikaalia lisätään veteen). Sen jälkeen sedimentin päällä oleva vesi sekoitetaan varoen häiritsemästä sedimenttiä. Kiteytysmaljan testikemikaalipitoisuus on nimellisesti sama kuin käsittelyastioissa, jotka kuuluvat kyseiseen kasvatushäkkiin. Tutkimuksessa, jossa testikemikaalia lisätään sedimenttiin, kiteytysmaljat valmistellaan suurin

▼M6

piirtein 11. päivänä altistuksen alkamisesta (ts. ensimmäisen sukupolven toukkien lisäämisestä), jotta ne voivat tasapainottua noin 48 tuntia ennen ensimmäisten munaryppäiden tuottamista.

28. Munaryppäät kerätään kiteytysmaljasta kasvatushäkkiin pinseteillä tai tylppäkärkisellä pipetillä. Jokainen munarypäs asetetaan astiaan, joka sisältää siitä kiteytysmaljasta otettua kasvatusalustaa, josta rypäs kerättiin (esimerkiksi 12-kuoppaisen mikrolevyn kuoppaan, jossa on vähintään 2,5 ml alustaa). Munaryppäät sisältävät astiat peitetään kannella merkittävän haihtumisen estämiseksi. Munaryppäitä tarkkaillaan vähintään kuusi päivää niiden tuottamisen jälkeen, jotta ne voidaan luokitella joko hedelmöittyneiksi tai hedelmöittymättömiksi.

Toisen sukupolven osalta valitaan vähintään kolme mutta mieluiten kuusi hedelmöittynyttä munarypästä jokaisesta kasvatushäkistä ja myös hieman ruokaa, jotta munat pystyvät kuoriutumaan. Nämä munaryppäät olisi täytynyt tuottaa muninnan ollessa huipussaan, mikä tapahtuu kontrollieläimillä yleensä testipäivänä 19. Ihannetapauksessa kaikkien käsittelyjen toisen sukupolven altistus aloitetaan samana päivänä, mutta koska kemikaali vaikuttaa toukkien kehitykseen, se ei ehkä ole aina mahdollista. Tällöin altistus suuremmilla pitoisuuksilla voidaan aloittaa myöhemmin kuin käsittely pienemmillä pitoisuuksilla ja (liuotin)kontrollin tarkkailu.

29. a. Tutkimuksessa, jossa testikemikaali lisätään veteen, toisen sukupolven sedimentti-vesijärjestelmä valmistetaan lisäämällä testikemikaalia sedimentin yläpuoliseen vesipatsaaseen noin tuntia ennen ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkien laittamista testiastioihin. Pieniä määriä testikemikaaliliuoksia lisätään pipetillä vedenpinnan alle. Sen jälkeen sedimentin päällä oleva vesi sekoitetaan varoen häiritsemästä sedimenttiä. Kemikaalin lisäämisen jälkeen järjestelmää ilmastetaan kevyesti.

29. b. Tutkimuksessa, jossa testikemikaali lisätään sedimenttiin, altistusastiat, jotka sisältävät sedimentti-vesijärjestelmän toista sukupolvea varten, valmistellaan samalla tavalla kuin ensimmäisen sukupolven yhteydessä.

30. Kaksikymmentä ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkaa (viimeistään 48 tunnin kuluttua kuoriutumisesta) toisesta sukupolvesta jaetaan satunnaisesti kuhunkin testiastiaan, joka sisältää sedimentti-vesijärjestelmän, käyttämällä tylppäkärkistä pipettiä. Veden ilmastus tulee keskeyttää siksi aikaa, kun ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkia lisätään testiastioihin, ja se tulee pitää keskeytettynä 24 tunnin ajan toukkien lisäämisen jälkeen. Käytettävän testisuunnitelman (ks. 19 ja 20 kohta) mukaan kutakin pitoisuutta kohti käytettävien toukkien määrä on EC_X-tutkimuksessa vähintään 120 (kuusi rinnakkaisnäytettä pitoisuutta kohti) ja NOEC-tutkimuksessa 160 (kahdeksan rinnakkaisnäytettä pitoisuutta kohti).

Ravinto

31. Testiastioissa olevia toukkia on ruokittava mieluiten päivittäin tai vähintään kolme kertaa viikossa. Sopiva määrä ruokaa nuorille toukille niiden kehityksen 10 ensimmäisen päivän aikana on 0,25–0,5 mg (*C. yoshimatsuille* 0,35–0,5 mg) kalanruokaa (suspensiona vedessä tai hienoksi jauhettua ruokaa, esimerkiksi Tetra-Miniä tai Tetra-Phylliä, katso tarkemmat tiedot lisäyksestä 2) toukkaa kohti päivässä. Vanhemmat toukat saattavat tarvita hieman enemmän ruokaa: 0,5–1,0 mg toukkaa kohti päivässä pitäisi riittää testin loppuun saakka. Ruoan määrää pitää pienentää kaikissa käsittelyissä ja säädellä, jos sienikasvua ilmenee tai kontrolleissa esiintyy kuolleisuutta. Jos sienikasvua ei saada loppumaan, testi on toistettava.

Ravinnon kautta altistumisen toksikologinen merkitys on yleensä suurempi sellaisilla kemikaaleilla, joiden affiniteetti orgaaniseen hiileen on

▼M6

suuri, tai kemikaaleilla, jotka sitoutuvat sedimenttiin kovalenttisesti. Kun testataan tällaisia kemikaaleja, se määrä ruokaa, jota toukkien elossapysyminen ja luonnollinen kasvu edellyttää, voidaan lisätä synteettiseen sedimenttiin ennen stabilisointijaksoa sääntelytarpeen mukaan. Veden laadun heikkenemisen ehkäisemiseksi on käytettävä kalanruoan sijasta kasviainesta, kuten 0,5 prosenttia (kuivapaino) nokkosen (*Urtica dioica*), valkomulperin (*Morus alba*), valkoapilan (*Trifolium repens*), pinaatin (*Spinacia oleracea*) tai muun kasviaineksen (*Cerophyl* tai alfaselluloosan) hienoksi jauhettuja lehtiä. Se, että sedimenttiin lisätään koko annos orgaanista ruokaa ennen kemikaalin lisäämistä, ei ole yhdentekevää veden laadun ja biologisen prosessin tehon kannalta (21), eikä se ole vakiintunut menetelmä, mutta viimeaikaisten tutkimusten mukaan on viitteitä siitä, että tämä menetelmä toimii (19) (26). Kasvatushäkissä olevia aikuisia sääskiä ei yleensä tarvitse ruokkia, mutta hedelmällisyys ja hedelmöittyminen paranevat, jos kuoriutuneille aikuisille annetaan ruoaksi saturoitua sukroosiliuosta puuvillavanulappuun imeytettynä.

Inkubaatio-olosuhteet

32. Testiastioiden sedimentin yläpuolista vettä aletaan ilmastaa varovasti 24 tuntia molempien sukupolvien ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkien lisäämisen jälkeen, ja ilmastusta jatketaan testin loppuun saakka (on pidettävä huoli, ettei liuenneen hapen pitoisuus laske alle 60 prosenttiin ilman kyllästysarvosta). Ilmastuksessa käytetään lasista Pasteur-pipettiä, jonka suu kiinnitetään 2–3 cm:n korkeudelle sedimenttikerroksen yläpuolelle, ja siitä pitäisi tulla muutama ilmakupla sekunnissa. Haihtuvia kemikaaleja testattaessa on pidettävä huoli siitä, ettei sedimentti-vesijärjestelmää ilmasteta, mutta samalla validiteettikriteerin (ts. vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta) tulisi täyttyä. Tästä annetaan tarkempia ohjeita kirjallisuusviitteessä (16).

33. *C. riparius* -lajilla tehtävässä testissä käytetään vakiolämpötilaa 20 °C (± 2 °C). *C. dilutus*- ja *C. yoshimatsui* -lajeille suositellut lämpötilat ovat 23 °C ja 25 °C (± 2 °C). Valoisa aika on 16 tuntia, ja valon voimakkuuden pitää olla 500–1 000 luksia. Kasvatushäkkien osalta voidaan lisätä yhden tunnin sarastus- ja hämäräjakso.

Altistuksen kesto

34. Tutkimus, jossa testikemikaali lisätään veteen: Ensimmäisen sukupolven altistusjakso alkaa, kun testikemikaali lisätään testiastioissa olevaan veteen (yhden päivän kuluttua toukkien lisäämisestä – katso mahdolliset muutokset altistustapaan 7 kohdasta). Toisen sukupolven toukkien altistus alkaa heti, koska ne lisätään sedimentti-vesijärjestelmään, johon testikemikaali on jo lisätty. *C. riparius*- ja *C. yoshimatui* -lajien ensimmäisen sukupolven altistuksen enimmäiskesto on 27 päivää ja toisen sukupolven 28 päivää (ensimmäisen sukupolven toukat ovat astioissa yhden päivän ilman altistusta). Kun otetaan huomioon altistusjaksojen päällekkäisyys, testin kokonaiskesto on noin 44 päivää. *C. dilutuksen* osalta altistuksen enimmäiskesto on ensimmäisellä sukupolvella 64 päivää ja toisella sukupolvella 65 päivää. Kokonaiskesto on noin 100 päivää.

Tutkimus, jossa testikemikaali lisätään sedimenttiin: altistus alkaa toukkien lisäämisestä, ja *C. ripariuksen* ja *C. yoshimatsuin* molemmilla sukupolvilla se kestää enintään 28 päivää ja *C. dilutuksen* molemmilla sukupolvilla enintään 65 päivää.

Havainnot

Kuoriutuminen

35. Molemmista sukupolvista määritetään täysin kehittyneiden ja elävien koiras- ja naarassääskien kehitysaika ja kokonaismäärä. Koiraat tunnistaa helposti niiden viuhkamaisista tuntosarvista ja kapeasta ruumiinrakenteesta.

▼M6

36. Kummankin sukupolven testiastioita tulee tarkkailla vähintään kolme kertaa viikossa, ja silloin on tehtävä silmämääräinen arviointi toukkien mahdollisesta poikkeavasta käyttäytymisestä (esimerkiksi sedimentistä poistuminen, epätavallinen uinti) kontrolleihin verrattuna. Kuoriutumisvaiheen aikana – *C. riparius*- ja *C. yoshimatsui* -toukilla se alkaa yleensä noin 12 päivän kuluttua toukkien lisäämisestä (*C. dilutus* -toukilla 20 päivän kuluttua) – kuoriutuneet sääsket lasketaan ja niiden sukupuoli määritetään vähintään kerran mutta mieluiten kahdesti päivässä (varhain aamulla ja myöhään iltapäivällä). Tunnistamisen jälkeen ensimmäisen sukupolven sääsket otetaan varovasti pois astioista ja siirretään kasvatushäkkiin. Toisen sukupolven sääsket otetaan pois ja lopetetaan tunnistamisen jälkeen. Kaikki ensimmäisen sukupolven testiastioihin munitut munaryppäät on kerättävä yksitellen, ja ne tulee siirtää 12-kuoppaisille mikrotitterilevyille (tai muihin sopiviin astioihin) siten, että mukana on vähintään 2,5 ml testiastiasta peräisin olevaa vettä. Mikrotitterilevyt peitetään kannella merkittävän haihtumisen estämiseksi. Kuolleiden toukkien ja näkyvillä olevien koteloiden, joiden kuoriutuminen ei ole onnistunut, lukumäärä on kirjattava muistiin. Esimerkkejä kasvatushäkistä, testiastiasta ja imurista on lisäyksessä 5.

Lisääntyminen

37. Lisääntymiseen kohdistuneita vaikutuksia arvioidaan ensimmäisen sukupolven sääskien tuottamien munaryppäiden lukumäärän ja niiden hedelmöittymisen perusteella. Munaryppäät kerätään kerran päivässä jokaisessa kasvatushäkissä olevasta kiteytysmaljasta. Munaryppäät on kerättävä ja siirrettävä 12-kuoppaiselle mikrotitterilevylle (yksi munarypäs jokaiseen kuoppaan) tai muihin sopiviin astioihin siten, että mukana on vähintään 2,5 ml kiteytysmaljan vettä, ja astiat on peitettävä kannella merkittävän haihtumisen estämiseksi. Jokaisesta munaryppäästä dokumentoidaan seuraavat ominaisuudet: munintapäivä, koko (normaali = 1,0 ± 0,3 cm vai pieni = yleensä ≤ 0,5 cm) ja rakenne (normaali = banaaninmuotoinen, jossa munat sijaitsevat spiraalimaisesti, vai epänormaali = munat sijaitsevat muuten kuin spiraalimaisesti) ja hedelmällisyys (hedelmöittynyt vai hedelmöittymätön). Munaryppään hedelmöittymistä arvioidaan kuuden päivän ajan sen muninnan jälkeen. Munarypästä pidetään hedelmällisenä, kun vähintään kolmannes munista kuoriutuu. Kasvatushäkkiin laitettujen naaraiden lukumäärää käytetään laskettaessa kunkin naaraan munimien munaryppäiden lukumäärää ja hedelmällisten munaryppäiden lukumäärää kutakin naarasta kohti. Tarvittaessa munaryppään sisältämien munien lukumäärä voidaan arvioida rypästä rikkomatta käyttämällä kasvurenkaiden laskentamenetelmää (tarkempia tietoja on kirjallisuusviitteissä 32 ja 33).

Mittaukset

Testikemikaalin lisääminen

38. Vähintään sedimentin yläpuolisen veden, huokosveden ja sedimentin näytteet on analysoitava testin alussa (mieluiten yksi tunti testiaineen lisäämisen jälkeen) ja lopussa suurimmassa testipitoisuudessa ja yhdessä pienemmässä pitoisuudessa. Tämä koskee kummankin sukupolven testiastioita. Kasvatushäkeissä olevista kiteytysmaljoista analysoidaan vain yläpuolinen vesi, koska sen kanssa munaryppäät joutuvat kosketuksiin (tutkimuksessa, jossa kemikaali on lisätty sedimenttiin, voidaan harkita sedimentin pitoisuuden vahvistamista analyyttisesti). Muita sedimentin, huokosveden tai yläpuolisen veden mittauksia voidaan tarvittaessa tehdä testin aikana. Näistä testikemikaalin pitoisuuden määrityksistä saadaan tietoa testikemikaalin käyttäytymisestä ja jakautumisesta vesi-sedimenttijärjestelmässä. Jos sedimentistä ja huokosvedestä otetaan näytteet testin alussa ja sen aikana (ks. 39 kohta), tarvitaan ylimääräisiä testiastioita analyyttisten määritysten tekemiseksi. Tutkimuksessa, jossa testikemikaali on lisätty veteen, sedimentin mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen, jos testikemikaalin jakaantuminen veteen ja sedimenttiin on määritetty selvästi vesi/sedimenttitutkimuksessa vastaavissa olosuhteissa (sedimentin ja veden

▼M6

välinen suhde, applikointityyppi, orgaanisen hiilen pitoisuus sedimentissä), tai jos mitatut pitoisuudet yläpuolisessa vedessä ovat osoittautuneet pysyvän 80–120 prosentissa nimellisistä tai mitatuista alkupitoisuuksista.

39. Jos välimittauksia tehdään (esimerkiksi päivänä 7) ja analyysiin tarvitaan suuria näytteitä, joiden ottaminen testiastioista vaikuttaisi testijärjestelmään, analyyttisiin määrityksiin on käytettävä ylimääräisistä testiastioista otettuja näytteitä. Näitä astioita käsitellään samalla tavoin kuin testiastioita (mukaan lukien testiorganismien lisääminen), mutta niitä ei käytetä biologiseen havainnointiin.

40. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esimerkiksi 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testikemikaali ei adsorboidu suotimiin, myös suodatus voi olla hyväksyttävää. Joskus pitoisuuksien analysointi huokosvedestä ei ole mahdollista, koska näytteen tilavuus on liian pieni.

Fysikaalis-kemialliset parametrit

41. Testiastioissa ja kiteytysmaljoissa olevasta vedestä tulee mitata pH, testiveteen liuennut happi ja veden lämpötila asianmukaisella tavalla (ks. 10 kohta). Kovuus ja ammoniakkipitoisuus on mitattava kontrolleista ja suurimman pitoisuuden testiastiasta ja kiteytysmaljasta testin alussa ja lopussa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

42. Tämän koko sukupolven kierron kattavan testin tarkoitus on määrittää testikemikaalin vaikutus lisääntymiseen ja kahden sukupolven osalta täysin kehittyneiden ja elävien koiras- ja naarassääskien kehitysnopeuteen ja lukumäärään. Kuoriutumisasteen osalta koiraiden ja naaraiden tiedot on yhdistettävä. Jos sukupuolten kehitysnopeutta koskevissa herkkyyksissä ei ole tilastollisesti merkitseviä eroja, koiraiden ja naaraiden tulokset voidaan yhdistää tilastollista analyysia varten.

43. Vaikuttavat pitoisuudet, jotka ilmaistaan päällä olevan veden (jos testikemikaali on lisätty veteen) tai sedimentin (jos testikemikaali on lisätty sedimenttiin) pitoisuuksina, lasketaan yleensä altistuksen alussa mitattujen pitoisuuksien perusteella (ks. 38 kohta). Kun testikemikaali on lisätty veteen, pitoisuuksista, jotka yleensä mitataan altistuksen alussa testiastioiden ja kiteytysmaljojen yläpuolisesta vedestä kummankin sukupolven osalta, lasketaan jokaisen käsittelyn keskiarvo. Kun testikemikaali on lisätty sedimenttiin, pitoisuuksista, jotka yleensä mitataan altistuksen alussa testiastioista (ja valinnaisesti myös kiteytysmaljoista) kummankin sukupolven osalta, lasketaan jokaisen käsittelyn keskiarvo.

44. Jotta voidaan laskea piste-estimaatti, kuten EC_x, astia- ja kasvatushäkkikohtaisia tilastotietoja voidaan käyttää todellisina rinnakkaisnäytteinä. Laskettaessa minkä tahansa EC_x-arvon luottamusväliä astioiden välinen vaihtelu on otettava huomioon tai vaihtoehtoisesti osoitettava vaihtelu niin pieneksi, että se voidaan jättää huomiotta. Jos malliin sovelletaan pienimmän neliösumman menetelmää, astiakohtaisiin tilastotietoihin on sovellettava muunnosta, jotta varianssin homogeenisuus paranee. EC_x-arvot on kuitenkin laskettava sen jälkeen, kun vaste on muunnettu takaisin alkuperäisarvoon (31).

▼M6

45. Kun tilastollisen analyysin tavoitteena on määrittää NOEC hypoteesitestauksella, astioiden välinen vaihtelu on otettava huomioon. Tämä voidaan varmistaa käyttämällä ANOVA-menetelmiä (kuten Williamsin ja Dunnettin testimenetelmiä). Williamsin testi on sopiva silloin, kun odotettavissa on monotoninen annosvaste, ja Dunnettin testi taas silloin, kun monotonisuushypoteesi ei toteudu. Vaihtoehtoisesti yksityiskohtaisemmat testit (27) voivat olla soveltuvia tilanteissa, joissa tavalliset ANOVAn oletukset eivät täyty (31).

Kuoriutumisaste

46. Kuoriutumisasteet ovat dikotomisia tietoja, ja ne voidaan analysoida Cochran-Armitagen testillä, jota sovelletaan alaspäin askeltavasti, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa ja kun näitä tietoja pidetään tämän odotuksen mukaisina. Jos näin ei ole, voidaan käyttää Fisherin tarkkaa testiä tai Mantel-Haentzalin testiä, jossa p-arvot on korjattu Bonferroni-Holmin menetelmällä. Jos on näyttöä siitä, että saman pitoisuuden rinnakkaisnäytteiden välinen varianssi on suurempi kuin binomijakauma antaa edellyttää (ylihajonta), tulee käyttää yksityiskohtaista Cochran-Armitagen testiä tai Fisherin tarkkaa testiä (27).

Elävien ja kuoriutuneiden sääskien (koiraat ja naaraat) yhteismäärä astiaa kohti, n_e, määritetään ja jaetaan astiaan laitettujen toukkien määrällä, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

jossa

ER = kuoriutumisaste

n_e = elävien, kuoriutuneiden sääskien lukumäärä astiaa kohti

n_a = astiaan laitettujen toukkien lukumäärä (yleensä 20)

Jos n_e on suurempi kuin n_a (esimerkiksi jos toukkia laitettiin vahingossa aiottua enemmän), n_a pitää muuttaa yhtä suureksi kuin n_e.

47. Vaihtoehtoinen tapa, joka on sopivin suurten näytekokojen yhteydessä, kun binomiaalista vaihtelua on paljon, on pitää kuoriutumisastetta jatkuvana vasteena ja käyttää menetelmiä, jotka ovat yhdenmukaisia näiden *ER*-tietojen kanssa. Näytekoko määritetään tässä suureksi, jos sekä kuoriutuneiden että kuoriutumattomien toukkien määrä on toistossa (astiassa) yli viisi.

48. Jos halutaan soveltaa ANOVA-menetelmiä, *ER*-arvot on ensin muunnettava arcsin-neliöjuuri-muunnoksella tai Tukey-Freemanin muunnoksella, jotta saadaan likimääräinen normaalijakauma ja jotta varianssi tasoittuu. Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferroni) tai Mantel-Haentzalin testiä voidaan soveltaa, kun käytetään absoluuttisia frekvenssejä. Arcsin-neliöjuuri-muunnosta sovelletaan ottamalla kuoriutumisasteen neliöjuuren käänteinen sini ($\sin^{-1}$).

49. Kuoriutumisasteiden osalta EC_x-arvot lasketaan käyttämällä regressioanalyysia (esimerkiksi Probit-, logit- tai Weibull-mallit (28)). Jos regressioanalyysi epäonnistuu (esimerkiksi kun osittaisia vasteita on alle kaksi), käytetään muita parametrittomia menetelmiä, kuten liukuvaa keskiarvoa tai yksinkertaista interpolaatiota.

Kehittymisnopeus

50. Keskimääräinen kehittymisnopeus tarkoittaa keskimääräistä aikaväliä, joka kuluu toukkien laittamisesta testiastiaan (testin päivä 0) siihen, kun sääskien tutkimuskohortti kuoriutuu (varsinaisen kehittymisajan laskemisessa

▼M6

on huomioitava toukkien ikä astiaan laitettaessa). Kehittymisnopeus (yksikkö: 1/vrk) on kehittymisajan käänteisluku, ja se edustaa yhdessä vuorokaudessa tapahtuvaa toukkien kehittymistä. Kehittymisnopeuden käyttö on suositeltavaa näiden sedimentin myrkyllisyyskokeiden arvioinnissa, sillä sen varianssi on pienempi ja se on homogeenisempi ja lähempänä normaalijakaumaa kuin kehittymisaika. Siksi tehokkaita parametritestimenetelmiä käytetään mieluummin kehittymisnopeuden kuin kehittymisajan kanssa. Kun kehittymisnopeus on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida regressioanalyysillä (esimerkiksi (29), (30)). Keskimääräisen kehittymisnopeuteen liittyvä NOEC-arvo voidaan määrittää ANOVA-menetelmillä, esimerkiksi Williamsin tai Dunnettin testillä. Koska koiraat kuoriutuvat aiemmin kuin naaraat (eli niiden kehittymisnopeus on suurempi), on mielekästä laskea kummankin sukupuolen kehittymisnopeus erikseen sen lisäksi, että lasketaan myös kaikkien sääskien kokonaiskehittymisnopeus.

51. Tilastollisissa testeissä oletetaan, että tarkastuspäivänä x havaittu sääskimäärä kuoriutuu päivän x ja päivän x – l välissä (l = tarkastusvälin pituus, yleensä 1 päivä). Keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa ($\overline{x}$) lasketaan seuraavasti:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

jossa

$\overline{x}$: keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa

i: tarkastusvälin indeksi

m: tarkastusvälien enimmäismäärä

f_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien määrä

n_e: testin lopussa kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärä (Σf_i)

x_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien kehittymisnopeus

$$x_i = 1/\mathrm{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

jossa

day_i: tarkastuspäivä (monesko päivä toukkien lisäämisen jälkeen)

l_i: tarkastusvälin i pituus (päivissä, yleensä 1 päivä)

Sukupuolijakauma

52. Sukupuolten väliset suhteet ovat dikotomisia tietoja, ja ne tulee siksi arvioida Fisherin tarkalla testillä tai muilla asianmukaisilla menetelmillä. *C. ripariuksen* osalta sukupuolten välinen luonnollinen suhde on yksi, eli koiraita ja naaraita on yhtä paljon. Molempien sukupolvien osalta sukupuolten välistä suhdetta koskevia tietoja tulee käsitellä samalla tavoin. Koska sääskien astiakohtainen enimmäismäärä (20) on liian pieni, jotta siitä voitaisiin tehdä järkevä tilastollinen analyysi, yhden käsittelyn kaikkien astioiden täysin kehittyneiden ja elävien sääskien kokonaismäärä

▼M6

kummankin sukupuolen osalta lasketaan yhteen. Nämä muuntamattomat tiedot testataan (liuotin)kontrollia tai yhdistettyjä kontrollitietoja vastaan 2 × 2 -kontingenssitaulukossa.

Lisääntyminen

53. Lisääntyminen (hedelmällisyys) lasketaan kunkin naaraan tuottamien munaryppäiden lukumäärän perusteella. Toisin sanoen kasvatushäkissä tuotettujen munaryppäiden kokonaismäärä jaetaan häkkiin lisättyjen, elossa olevien ja terveiden naaraiden kokonaismäärällä. Hedelmällisyyteen liittyvä NOEC-arvo voidaan määrittää ANOVA-menetelmillä, esimerkiksi Williamsin tai Dunnettin testillä.

54. Munaryppäiden hedelmällisyyden avulla kvantifioidaan hedelmällisten munaryppäiden määrä naarasta kohti. Kasvatushäkissä tuotettujen hedelmällisten munaryppäiden kokonaismäärä jaetaan häkkiin lisättyjen, elossa olevien ja terveiden naaraiden kokonaismäärällä. Munien hedelmällisyyteen liittyvä NOEC-arvo voidaan määrittää ANOVA-menetelmillä, esimerkiksi Williamsin tai Dunnettin testillä.

Testiraportti

55. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (vesiliukoisuus, höyrynpaine, log K_{ow}, jakaantumiskerroin maa-aineksessa (tai sedimentissä, jos saatavissa), stabiilisuus vedessä ja sedimentissä jne.)

— kemialliset tunnistetiedot (yleisnimi, kemiallinen nimi, rakennekaava, CAS-numero jne.) sekä puhtaus ja testiaineen kvantifioinnissa käytetty analyysimenetelmä.

Testilajit:

— käytetyt testiorganismit: lajit, tieteellinen nimi, organismien lähde ja kasvatusolosuhteet

— tiedot siitä, miten munamassoja ja toukkia käsiteltiin

— tiedot ensimmäisen sukupolven kuoriutuneiden aikuisten käsittelystä imurilla jne. (ks. lisäys 5)

— testiorganismien ikä sillä hetkellä, kun na laitettiin 1. ja 2. sukupolven testiastioihin.

Testiolosuhteet:

— käytetty sedimentti, eli luonnollinen vai synteettinen (keinotekoinen) sedimentti

— luonnollinen sedimentti: sedimentin keräyspaikan sijainti ja kuvaus sekä mahdollisuuksien mukaan tiedot kontaminaatiohistoriasta; sedimentin ominaisuudet: pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, C/N-suhde ja granulometria (jos tarpeen)

— synteettinen sedimentti: valmistus, ainesosat ja ominaisuudet (orgaanisen hiilen pitoisuus, pH, kosteus jne. testin alussa mitattuna)

— testiveden valmistus (jos käytetään synteettistä vettä) ja ominaisuudet (happipitoisuus, pH, kovuus jne. testin alussa mitattuna)

▼**M6**

— sedimentin ja sen yläpuolisen veden syvyys testiastioissa ja kiteytysmaljoissa

— sedimentin yläpuolisen veden ja huokosveden tilavuus, sedimentin märkäpaino huokosveden kanssa ja ilman sitä testiastioissa ja kiteytysmaljoissa

— testiastiat (materiaali ja koko)

— kiteytysmaljat (materiaali ja koko)

— kasvatushäkit (materiaali ja koko)

— varastoliuosten ja testipitoisuuksien valmistusmenetelmät testiastioiden ja kiteytysmaljojen osalta

— testikemikaalin lisääminen testiastioihin ja kiteytysmaljoihin: testipitoisuudet, rinnakkaisnäytteiden määrä ja liuottimet tarvittaessa

— testiastioiden inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valoisa jakso ja valoteho, ilmastus (montako kuplaa sekunnissa)

— kasvatushäkkien ja kiteytysmaljojen inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valoisa jakso ja valoteho

— mikrotitterilevyillä (tai muissa astioissa) olevien munaryppäiden inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valoisa jakso ja valoteho

— yksityiskohtaiset tiedot syöttämisestä, kuten ravinnon tyyppi, valmistus, määrä ja syöttöaikataulu.

Tulokset:

— nimelliset testipitoisuudet, mitatut testipitoisuudet ja tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritettiin testiaineen pitoisuus testiastioissa ja kiteytysmaljoissa

— veden laatu testiastioissa ja kiteytysmaljoissa: pH, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, kovuus ja ammoniakki

— tiedot testiastioista haihtuneen veden korvaamisesta tarvittaessa

— kuoriutuneiden koiras- ja naarassääskien määrä astiaa ja päivää kohti, 1. ja 2. sukupolvi

— täysin kehittyneiden ja elävien sääskien sukupuolten välinen suhde käsittelyä kohti, 1. ja 2. sukupolvi

— niiden toukkien astiakohtainen lukumäärä, joista ei kehittynyt sääskiä, 1. ja 2. sukupolvi

— kuoriutumisen prosenttiosuus/fraktio rinnakkaisnäytettä ja testipitoisuutta kohti (koiras- ja naarassääsket yhdistettynä, 1. ja 2. sukupolvi

— täysin kehittyneiden ja elävien sääskien keskimääräinen kehittymisnopeus rinnakkaisnäytettä ja käsittelyastetta kohti (koiras- ja naarassääsket erikseen ja yhteensä), 1. ja 2. sukupolvi

— kiteytysmaljoihin munittujen munaryppäiden lukumäärä kasvatushäkkiä ja päivää kohti

▼**M6**

— jokaisen munaryppään ominaisuudet (koko, muoto ja hedelmöittyminen)

— hedelmällisyys – munaryppäiden kokonaismäärä kasvatushäkkiin laitettujen naaraiden kokonaismäärää kohti

— hedelmöittyminen – hedelmöittyneiden munaryppäiden kokonaismäärä kasvatushäkkiin laitettujen naaraiden kokonaismäärää kohti

— myrkyllisten tutkittavien ominaisuuksien estimaatit, kuten EC_x (ja siihen liittyvät luottamusvälit), NOEC ja sen määrittämiseen käytetyt tilastolliset menetelmät

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Tämän liitteen luku C.28 Surviaissääskillä tehtävä myrkyllisyystesti, käyttäen vettä tai sedimenttiä, joihin on lisätty tutkittavaa ainetta.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: 2662–2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221–230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: 345–350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: 47–57.

(15) Chapter C.27 of this Annex, Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment.

(16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 353–361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163–1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291–3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482–491.

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94–102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577–585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213–221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485–1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: 298–312.

(31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: 1165–1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: 1–9.

(34) OECD (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼**M6**

Lisäys 1

Määritelmät

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Kemikaali on aine tai seos.

Synteettinen sedimentti tai rekonstituoitu tai keinotekoinen sedimentti on luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

Yläpuolinen vesi on testiastiassa sedimentin päällä oleva vesi.

Huokosvesi on sedimenttirakeiden välissä olevaa vettä.

Testivesi on vettä, johon on lisätty testikemikaalia.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M6

Lisäys 2

***Chironomus riparius* -lajin kasvatussuosituksia**

1. *Chironomus*-toukkia voi kasvattaa kiteytysmaljoissa tai suurissa astioissa. Astian pohjalle levitetään noin 5–10 mm:n paksuinen kerros hienoa kvartsihiekkaa. Myös piimaa (esimerkiksi Merck, tuotenro 8117) on osoitettu soveltuvaksi substraatiksi (ohuempi, enintään muutaman millimetrin paksuinen kerros riittää). Astiaan lisätään sopivaa vettä useita senttimetrejä. Haihtunut vesi on tarvittaessa korvattava lisäämällä uutta vettä. Tämä on tarpeen myös kuivumisen estämiseksi. Vesi voidaan vaihtaa tarvittaessa. Varovainen ilmastus on tarpeen. Toukkien kasvatusastioita on säilytettävä soveltuvassa häkissä, jotta kuoriutuvat aikuiset eivät pääse pakenemaan. Häkin on oltava tarpeeksi tilava, jotta kuoriutuneet aikuiset mahtuvat parveilemaan. Häkin on oltava tarpeeksi tilava, jotta kuoriutuneet aikuiset mahtuvat parveilemaan. Muutoin parittelua ei välttämättä tapahdu (vähimmäiskoko on n. 30 × 30 × 30 cm).

2. Häkkejä säilytetään huoneenlämmössä tai huoneessa, jonka lämpötila on vakioitu (20 ± 2 °C). Valoisa jakso on 16 tuntia (voimakkuus n. 1 000 luksia), pimeys 8 tuntia. On ilmoitettu, että lisääntyminen voi estyä, jos ilman suhteellinen kosteus on alle 60 prosenttia.

Laimennusvesi

3. Mitä tahansa soveltuvaa luonnollista tai synteettistä vettä voidaan käyttää. Kaivovesi, talousvesi, josta on poistettu kloori, ja keinotekoinen neste (esimerkiksi Elendtin ”M4”- tai ”M7”-liuos, ks. jäljempänä) ovat yleisesti käytettyjä. Vesi on ilmastettava ennen käyttöä. Kasvatusvesi voidaan tarvittaessa uusia kaatamalla tai lappamalla käytetty vesi kasvatusastioista varoen tuhoamasta toukkaputkia.

Toukkien ruokinta

4. *Chironomus*-toukkia ruokitaan kalojen hiutaleruoalla (Tetra Min®, Tetra Phyll® tai muu vastaava kaupallinen kalanruoka), jota annetaan noin 250 mg astiaa kohden päivässä. Ruoka voidaan antaa kuivana hienoksi jauhettuna jauheena tai veteen sekoitettuna suspensiona: 1,0 g hiutaleruokaa lisätään 20 millilitraan laimennusvettä ja sekoitetaan tasaiseksi. Tätä valmistetta voidaan antaa noin 5 ml testiastiaa kohti päivässä. (Ravista ruoka ennen käyttöä.) Vanhemmille toukille voi antaa enemmän ruokaa.

5. Ruokkimista säädellään vedenlaadun mukaan. Jos kasvatusalusta muuttuu sameaksi, ravinnon määrää on vähennettävä. Ravinnon määrän lisäämistä on seurattava tarkasti. Jos ravintoa on liian vähän, toukat siirtyvät kohti vesipatsasta, ja jos ravintoa on liian paljon, mikrobien toiminta voi lisääntyä ja happipitoisuudet voivat laskea. Kumpikin vaihtoehto voi laskea kasvunopeutta.

6. Vähän viherlevän (esimerkiksi *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) soluja voidaan lisätä, kun uusia kasvatusastioita perustetaan.

Kuoriutuneiden aikuisten ruokinta

7. Eräät kokeen suorittajat ovat ehdottaneet, että kylläisessä sakkaroosiliuoksessa liotettu vanutuppo saattaa riittää kuoriutuneiden aikuisten ravinnoksi.

▼M6

Kuoriutuminen

8. Kun lämpötila on 20 ± 2 °C, toukkien kasvatusastioista alkaa kuoriutua aikuisia noin 13–15 päivän kuluttua. Koiraat tunnistaa helposti niiden viuhkamaisista tuntosarvista ja hoikasta ruumiinrakenteesta.

Munamassat

9. Kun kasvatushäkissä on aikuisia, kaikista toukkien kasvatusastioista on tarkistettava kolme kertaa viikossa, onko niissä hyytelömäisiä munamassoja. Jos munamassoja on, ne on poistettava varovasti. Ne siirretään pieneen astiaan, jossa on pieni määrä kasvatusvettä. Munamassoja voi käyttää uuden viljelyastian perustamiseen (esimerkiksi 2–4 munamassaa astiaa kohden) tai myrkyllisyystesteihin.

10. Ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkien pitäisi kuoriutua 2–3 päivän kuluttua.

Uusien viljelyastioiden perustaminen

11. Kun viljelmät on perustettu, uuden toukkaviljelyastian voi aloittaa testivaatimusten mukaan kerran viikossa tai harvemmin. Vanhat astiat poistetaan, kun aikuiset sääsket ovat kuoriutuneet. Näin saadaan säännöllisesti aikuisia mahdollisimman vähäisellä vaivalla.

Testiliuosten M4 ja M7 valmistaminen

12. Elendt (1990) on kuvannut M4-testiliuosta. M7-testiliuos valmistetaan kuten M4-liuos lukuun ottamatta taulukossa 1 mainittuja aineita, joiden osalta pitoisuudet ovat neljä kertaa pienemmät M7-liuoksessa kuin M4-liuoksessa. Testiliuosta ei tule valmistaa Elendtin ja Biasin (1990) mukaan, jos varastoliuoksissa käytetyt $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$-, $NaNO_3$-, KH_2PO_4- ja K_2HPO_4-pitoisuudet eivät ole asianmukaisia.

M7-liuoksen valmistaminen

13. Jokainen varastoliuos (I) valmistetaan erikseen, ja näistä varastoliuoksista (I) valmistetaan yhdistetty varastoliuos (II) (katso taulukko 1). M7-liuos valmistetaan näin: yhdistetystä varastoliuoksesta (II) otetaan 50 ml ja jokaisesta makroravinteiden varastoliuoksesta otetaan taulukossa 2 esitetty määrä, ja nämä määrät täytetään yhdeksi litraksi deionisoitua vettä. Vitamiinivarastoliuos valmistetaan lisäämällä deionisoituun veteen kolme vitamiinia taulukon 3 mukaan, ja 0,1 ml yhdistettyä vitamiinivarastoliuosta lisätään lopulliseen M7-liuokseen hieman ennen käyttöä. Yhdistetty vitamiinien varastoliuos säilytetään jäädytettynä pienissä alikvooteissa. Liuos ilmastetaan ja stabiloidaan.

Taulukko 1

Hivenaineiden varastoliuokset M4- ja M7-liuosta varten

Varastoliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn varastoliuoksen (II) valmistaminen: sekoita seuraavat määrät (ml) varastoliuoksia (I) ja täytä ne yhdeksi litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

Varastoliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn varastoliuoksen (II) valmistaminen: sekoita seuraavat määrät (ml) varastoliuoksia (I) ja täytä ne yhdeksi litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Nämä aineet ovat erilaiset M4- ja M7-liuoksissa, kuten edellä kerrottiin.
(2) Nämä liuokset valmistetaan erikseen. Sitten ne kaadetaan yhteen ja käsitellään välittömästi autoklaavissa.

Taulukko 2:

Makroravinteiden varastoliuokset M4- ja M7-liuosta varten

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn makroravinteiden varastoliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

Taulukko 3:

Vitamiinien varastoliuos M4- ja M7-liuosta varten

Kaikki kolme vitamiiniliuosta yhdistetään yhdeksi vitamiinien varastoliuokseksi.

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn vitamiinien varastoliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinihydrokloridi	750	0,1	0,075
Syaanikobalamiini (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiini	7,5	0,1	0,00075

VIITTEET

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25–33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, Water Research, 24: 1157–1167.

▼M6

Lisäys 3

Synteettisen sedimentin valmistus

SEDIMENTIN KOOSTUMUS

Synteettisen sedimentin koostumuksen on oltava seuraavanlainen:

Ainesosa	Ominaisuudet	% sedimentin kuivapainosta
Turve	Rahkasuoturvetta, pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä, hienoksi jauhettuna (hiukkaskoko ≤ 1 mm) ja ilmakuivattuna	4–5
Kvartsihiekka	Raekoko: > 50 prosenttia hiukkasista on oltava kokoa 50–200 μm	75–76
Kaoliniittisavi	Kaoliniittipitoisuus≥ 30 %	20
Orgaaninen hiili	Säädetään lisäämällä turvetta ja hiekkaa	2 (± 0,5)
Kalsiumkarbonaatti	$CaCO_3$, jauhemainen, kemiallisesti puhdas	0,05–0,1
Vesi	Johtavuus ≤ 10 μS/cm	30–50

VALMISTELUVAIHE

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi. Tarvittava määrä turvejauhetta suspendoidaan deionisoituun veteen käyttämällä tehokasta homogenisointilaitetta. Tämän suspension pH säädetään välille 5,5 ± 0,5 $CaCO_3$:lla. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen. Arvon pitäisi olla 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen turvesuspensioon sekoitetaan muut ainesosat (hiekka ja kaoliniittisavi) ja deionisoitu vesi, jotta saadaan homogeenista sedimenttiä, jonka vesipitoisuus on 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta. Lopullisen seoksen pH mitataan vielä kerran, ja se säädetään tarvittaessa CaCO3:lla alueelle 6,5–7,5. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. On suositeltavaa, että synteettistä sedimenttiä sopeutetaan ennen surviaissääskillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat.

VARASTOINTI

Synteettisen sedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa huoneenlämmössä. Valmistettua (märkää) sedimenttiä ei saa säilyttää ennen käyttöä tässä testissä. Se on käytettävä heti valmistuksen lopussa olevan 7 päivän sopeutusajan jälkeen.

VIITTEET

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10–20.

▼**M6**

Lisäys 4

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

AINESOSA	PITOISUUDET
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Kovuus $CaCO_3$:na	< 400 mg/l (*)
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

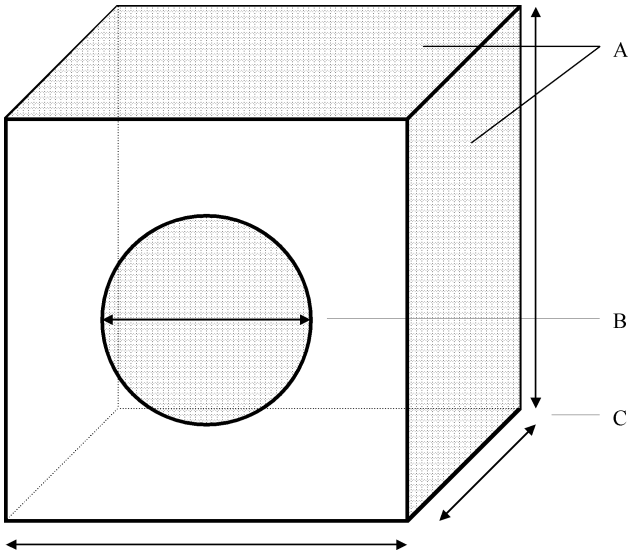
(*) Jos kovuusionien ja testikemikaalin välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -liuosta).

▼**M6**

Lisäys 5

Testin toteuttamisohjeet

Esimerkki kasvatushäkistä:



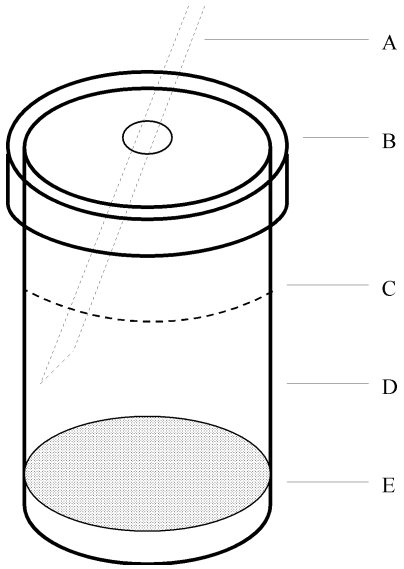
A: Suojaverkko häkin päällä ja vähintään yhdellä sivulla (silmäkoko noin 1 mm)

B: Aukko, josta kehittyneet aikuiset laitetaan kasvatushäkkiin ja poistetaan munitut munaryppäät kiteytysmaljoista (eivät näy tässä kuvassa)

C: Kasvatushäkki, vähimmäismitat: pituus 30 cm, korkeus 30 cm ja leveys 30 cm

▼**M6**

Esimerkki testiastiasta:



A: Pasteur-pipetti ilmansyöttöön yläpuolisen veden päältä

B: Lasikansi, jolla estetään sääskien karkaaminen

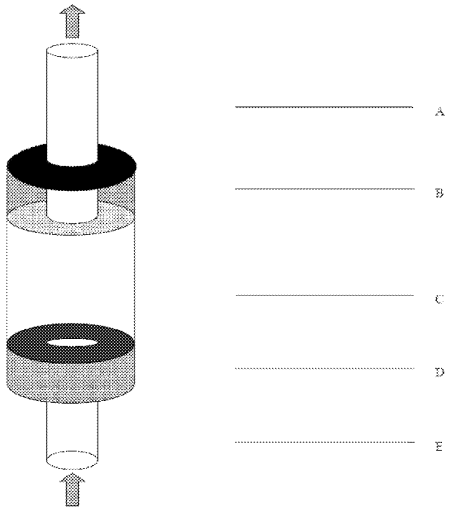
C: Veden pintakerros

D: Testiastia (laboratoriolasi, vähintään 600 ml)

E: Sedimenttikerros

▼**M6**

Esimerkki imurista, jolla kerätään aikuiset sääsket (nuolet tarkoittavat ilman virtaussuuntaa)



A: Lasiputki (sisähalkaisija noin 5 mm), joka on liitetty itsesyöttävään pumppuun

B: Vulkanoidusta kumista valmistettu korkki, jonka lasiputki lävistää (A). Lasiputken (A) aukko tulee päällystää sisäpuolelta pumpulilla ja verkolla (silmäkoko noin 1 mm), jotta sääsket eivät vaurioidu, kun niitä imetään imuriin.

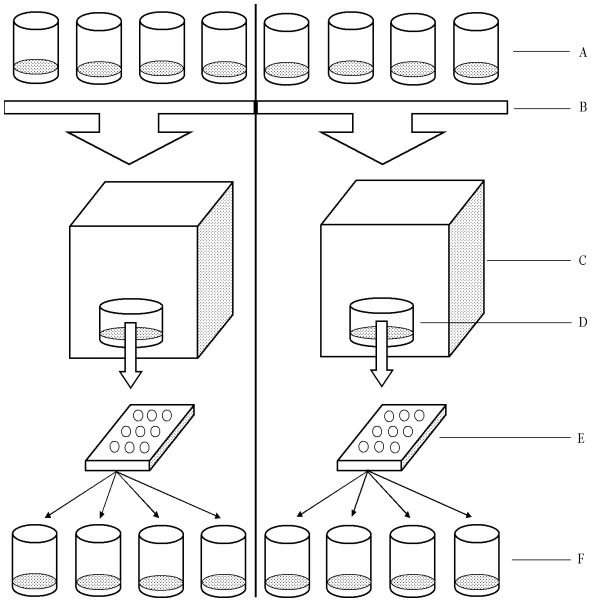
C: Läpinäkyvä säiliö (muovia tai lasia, pituus noin 15 cm) kerättyjä sääskiä varten.

D: Vulkanoidusta kumista valmistettu korkki, jonka putki lävistää (E). Sääsket vapautetaan kasvatushäkistä avaamalla säiliön C korkki D.

E: Putki (muovia tai lasia, sisähalkaisija noin 8 mm), johon aikuiset sääsket kerätään astiasta.

▼**M6**

Kaavakuva sukupolven kierron kattavasta testistä:



A: 1. sukupolvi – testiastiat, jotka sisältävät sedimentti-vesijärjestelmän, kahdeksan rinnakkaisnäytettä ja 20 ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkaa astiaa kohti

B: Neljä testiastiaa kumpaakin kasvatushäkkiä (A ja B) kohti

C: Kasvatushäkit (A ja B) parveilua, parittelua ja munintaa varten

D: Kiteytysmaljat munaryppäiden säilytystä varten

E: Mikrotitterilevyt, yksi kuoppa kutakin munarypästä kohti

F: 2. sukupolvi – testiastiat, jotka sisältävät sedimentti-vesijärjestelmän, kahdeksan rinnakkaisnäytettä ja 20 ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkaa astiaa kohti.

▼M6

C.41. KALOJEN SUKUPUOLIKEHITYSTÄ TUTKIVA TESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 234 (2011). Se perustuu vuonna 1998 tehtyyn päätökseen uudistaa ohjeita ja laatia uusia ohjeita mahdollisten hormonitoimintaa häiritsevien aineiden seulontaa ja testausta varten. Kalojen sukupuolikehitystä tutkivaa testiä (Fish Sexual Development Test, FSDT) pidettiin lupaavana testimenetelmänä, sillä se kattaa kalan elinkaaren herkän vaiheen, jossa kala reagoi sekä estrogeenin että androgeenin kaltaisiin kemikaaleihin. Testimenetelmälle tehtiin vuosina 2006–2010 laboratorioiden välinen validointi, jossa validoitiin medaka (*Oryzias latipes*), seeprakala (*Danio rerio*) ja kolmipiikki (*Gasterosteus aculeatus*). Rasvapäämutu (*Pimephales promelas*) validoitiin osittain (41) (42) (43). Tähän tutkimussuunnitelmaan kuuluvat medaka, kolmipiikki ja seeprakala. Suunnitelma on periaatteessa OECD:n testiohjeen nro 210 (kalan elinkaaren varhaisvaiheen myrkyllisyystesti) (1) parannettu versio, jossa altistus jatkuu siihen saakka, kunnes kalojen sukupuoli on eriytynyt, mikä tapahtuu medakalla, kolmipiikillä ja seeprakalalla noin 60 päivän kuluttua mätimunien kuoriutumisesta (altistusjakso voi olla lyhyempi tai pidempi muilla lajeilla, jotka validoidaan tulevaisuudessa), ja johon lisätään hormonitoiminnan kannalta herkkiä tutkittavia ominaisuuksia. FSDT-testissä arvioidaan elinkaaren varhaisvaiheen vaikutuksia ja mahdollisia haitallisia seurauksia, joita oletetuilla hormonitoimintaa häiritsevillä kemikaaleilla (kuten estrogeeneilla, androgeeneilla ja steroidogeneesin estäjillä) voi olla sukupuolikehitykseen. Yhdistämällä kaksi keskeistä hormonitoimintaan liittyvää ominaisuutta, vitellogeniinin (VTG:n) pitoisuus ja fenotyyppinen sukupuolijakauma, testistä voidaan saada tietoa testikemikaalin vaikutustavasta. Koska fenotyyppinen sukupuolijakauma muuttuu populaatiokohtaisesti, FSDT:tä voidaan käyttää vaarojen ja riskien arviointiin. Jos testiä käytetään vaarojen tai riskien arvioinnissa, kolmipiikkiä ei tule kuitenkaan käyttää, koska tällä hetkellä käytettävissä olevat validointitiedot ovat osoittaneet, että tässä lajissa kemikaalien aiheuttamat muutokset fenotyyppisessä sukupuolijakaumassa olivat harvinaisia.

2. Suunnitelma perustuu siihen, että kaloja altistetaan veden kautta kemikaaleille sukupuolikehityksen kannalta labiilin vaiheen aikana, jolloin kalan oletetaan olevan herkimmillään hormonitoimintaa häiritsevien ja sukupuolikehitystä haittaavien kemikaalien vaikutuksille. Merkkeinä hormonitoimintaan liittyvistä kehityksellisistä poikkeamista mitataan kahta keskeistä ominaisuutta, vitellogeniinipitoisuutta ja sukupuolijakaumaa (sukupuolten välistä suhdetta), jotka määritetään sukupuolirauhasten histologian perusteella. Sukupuolirauhasten histopatologia (oosyyttien ja spermatogeneettisten solujen arviointi ja määritys) on valinnaista. Lisäksi geneettinen sukupuoli määritetään aina kun mahdollista (esimerkiksi medakassa ja kolmipiikissä). Geneettisten sukupuolitunnusmerkkien olemassaolosta on paljon hyötyä, koska se lisää sukupuolijakaumatilastojen selitysvoimaa ja mahdollistaa yksilöllisen fenotyyppisen sukupuolen vaihtumisen havaitsemisen. Muita apikaalisia ominaisuuksia, jotka tulee mitata, ovat kuoriutumisaste, eloonjääminen, pituus ja paino. Testimenetelmän voi muokata myös muille lajeille kuin edellä mainituille edellyttäen, että i) muut lajit validoidaan samalla tavalla kuin medaka, kolmipiikki ja seeprakala, ii) kontrollikalojen sukupuoli on eriytynyt testin lopuksi, iii) vitellogeniinipitoisuudet ovat tarpeeksi suuria, jotta merkitsevät kemikaaleihin liittyvät vaihtelut havaitaan, ja iv) testijärjestelmän herkkyys määritetään käyttämällä hormonitoimintaan vaikuttavia vertailukemikaaleja ((anti-)estrogeeneja, (anti-)androgeeneja, aromataasin estäjiä jne.). Lisäksi kaikki validointiraportit, jotka liittyvät FSDT-tietoihin ja joissa on käytetty muita lajeja, olisi toimitettava OECD:n tarkastettaviksi, ja validoinnin tulos tulee olla hyväksyttävä.

▼M6

JOHDANTO JA RAJOITUKSET

3. Munimalla lisääntyvien selkärankaisten naaraiden maksa tuottaa yleensä vitellogeenia verenkierrossa olevan endogeenisen estrogeenin avulla (2). Se on munankeltuaisen proteiinien esiaste, ja kun maksa on tuottanut sitä, se kulkeutuu verenkierrossa munasarjoihin, joissa kehittyvät munasolut ottavat sen sisäänsä ja muokkaavat sitä. Vitellogeniinin synteesi on hyvin vähäistä mutta havaittavissa nuorilla kaloilla ja aikuisilla koiraskaloilla, koska niiden verenkierrossa ei ole tarpeeksi estrogeenia. Maksa voi kuitenkin syntetisoida ja erittää vitellogeniinia eksogeenisen estrogeenistimulaation vuoksi (3) (4) (5).

4. Vitellogeniinipitoisuutta mittaamalla pystytään havaitsemaan kemikaaleja, joilla on estrogeenisia, antiestrogeenisia ja androgeenisia vaikutustapoja, ja kemikaaleja, jotka häiritsevät steroidogeneesia, kuten aromataasin estäjät. Estrogeeniin vaikuttavien kemikaalien havaitseminen on mahdollista mittaamalla vitellogeniinin indusointia koiraskaloilla, ja sitä on dokumentoitu runsaasti tieteellisessä vertaisarvioidussa kirjallisuudessa. Vitellogeniinin indusointi on osoitettu myös aromatisoituville androgeeneille altistumisen jälkeen (6) (7). Kun naaraskalojen verenkierron estrogeenipitoisuus pienentyy esimerkiksi estämällä aromataasia muuntamasta endogeenista androgeenia luonnolliseksi estrogeeniksi, 17β-estradioliksi, myös aromataasia estäviä ominaisuuksia sisältävien kemikaalien tai laajemmin steroidogeneesin estäjien havaitsemisessa käytettävän vitellogeniinin pitoisuus pienenee (33). Estrogeenin/aromataasin estämisen aiheuttaman vitellogeniinivasteen biologinen merkityksellisyys on osoitettu ja se on dokumentoitu laajalti (8) (9). On kuitenkin mahdollista, että vitellogeniinin tuotantoon naarailla voivat vaikuttaa myös yleinen myrkyllisyys ja muuhun kuin hormonijärjestelmään kohdistuvat myrkylliset vaikutustavat.

5. Useita mittausmenetelmiä on kehitetty onnistuneesti, ja ne on standardoitu vakiokäyttöön vitellogeniinin kvantifioimiseksi yksittäiseltä kalalta otetusta verestä, maksasta, koko ruumiista tai pään/pyrstön homogenaattinäytteistä. Tämä koskee esimerkiksi seeprakalaa, kolmipiikkiä ja medakaa sekä myös rasvapäämutua, joka on osittain validoitu laji. Saatavilla on lajikohtaisia entsyymivälitteisiä immunosorbenttimääritysmenetelmiä (ELISA), joissa käytetään immunokemiaa vitellogeniinin kvantifioimisessa (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Medakalla ja seeprakalalla veren plasmasta, maksasta ja homogenaattinäytteistä mitattujen vitellogeniinipitoisuuksien välinen korrelaatio on hyvä, vaikka homogenaateista saatavat arvot ovat yleensä hieman pienempiä kuin plasman arvot (17) (18) (19). Liitteessä 5 on esitetty suositeltavat näytteenottomenetelmät vitellogeniinianalyysia varten.

6. Fenotyyppisen sukupuolijakauman (sukupuolten välisen suhteen) muutos on ominaisuus, joka kuvastaa sukupuolen vaihtumista. Periaatteessa estrogeenit, antiestrogeenit, androgeenit, antiandrogeenit ja steroidogeneesia estävät kemikaalit voivat vaikuttaa kehittyvien kalojen sukupuolijakaumaan (20). On osoitettu, että sukupuolen vaihtuminen estrogeenin kaltaiselle kemikaalille altistumisen jälkeen on osittain palautuvaa seeprakalalla (21), kun taas androgeenin kaltaiselle kemikaalille altistumisen jälkeen se on pysyvää (30). Sukupuolet määritellään seuraavasti: naaras, koiras, sekasukupuolinen (sekä oosyyttejä että spermatogeneettisia soluja yhdessä sukupuolirauhasessa) tai eriytymätön, ja yksittäisen kalan sukupuoli määritetään sukupuolirauhasten histologisella tutkimuksella. Ohjeita on lisäyksessä 7 ja OECD:n ohjeasiakirjassa, joka koskee hormonitoimintaan liittyvän histopatologian diagnosointia kalojen sukupuolirauhasissa (Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads) (22).

7. Geneettinen sukupuoli tutkitaan geneettisten merkkien avulla, jos niitä on tietyssä kalalajissa. Medakalla naaraan XX-geenit tai koiraan XY-geenit voidaan havaita polymeraasiketjureaktiolla (PCR:llä), tai Y-kromosomiin

▼M6

liittyvä DM-domeenin geeni (DMY) voidaan analysoida (DMY negatiivinen tai positiivinen), kuten kirjallisuusviitteissä (23) ja (24) on kuvattu. Kolmipiikin osalta vastaava PCR-menetelmä geneettisen sukupuolen määrittämiseen on kuvattu lisäyksessä 10. Kun geneettinen sukupuoli voidaan yksilöllisesti liittää fenotyyppiseen sukupuoleen, testin selitysvoima paranee, joten geneettinen sukupuoli pitää määrittää lajeilta, joilla on dokumentoitu olevan geneettisen sukupuolen merkkejä.

8. Kaksi keskeistä hormonitoimintaan kohdistuvaa ominaisuutta, vitellogeniini ja sukupuolijakauma, voivat yhdessä osoittaa, millainen hormonitoimintaan kohdistuva vaikutustapa kemikaalilla on (taulukko 1). Sukupuolijakauma on populaation kannalta oleellinen biomarkkeri (25) (26), ja joidenkin tarkasti määriteltyjen vaikutustapojen osalta FSDT-tuloksia voidaan käyttää vaarojen ja riskien arvioinnissa, mikäli sääntelyviranomainen pitää sitä tarkoituksenmukaisena. Tällaisia vaikutustapoja on estrogeeneilla, androgeeneilla ja steroidogeneesin estäjillä.

Taulukko 1

Hormonitoimintaan liittyvien ominaisuuksien reaktio kemikaalien erilaisille vaikutustavoille:

↑= lisääntyy, ↓= vähenee, — = ei tutkittu

Vaik.tapa	VTG ♂	VTG ♀	Sukupuolijakauma	Viitteet
Heikko estrogeeniagonisti	↑	↑	↑♀ tai ↑Eriyt.	(27) (40)
Vahva estrogeeniagonisti	↑	↑	↑♀ tai ↑Eriyt, ei ♂	(28) (40)
Estrogeeniantagonisti	—	—	↓♀, ↑Eriyt.	(29)
Androgeeniagonisti	↓ tai —	↓ tai —	↑ ♂, ei ♀	(28) (30)
Androgeeniantagonisti	—	—	↑♀ ↑Sekasukup.	(31)
Aromataasin estäjä	↓	↓	↓♀	(33)

9. FSDT ei kata kalan elinkaaren lisääntymisvaihetta, joten kemikaalit, joiden epäillään vaikuttavan pieninä pitoisuuksina ennemminkin lisääntymiseen kuin sukupuolikehitykseen, on tutkittava testillä, joka kattaa lisääntymisen.

10. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

11. FSDT *in vivo* -testi on tarkoitettu havaitsemaan kemikaalit, joilla on androgeenisia ja estrogeenisia ominaisuuksia sekä antiandrogeenisia, antiestrogeenisia ja steroidogeneesia estäviä ominaisuuksia. FSDT:n validointivaiheet (1 ja 2) kattoivat estrogeeniset, androgeeniset ja steroidogeneesia estävät kemikaalit. Estrogeeni- ja androgeeniantagonistien vaikutukset FSDT:ssä on esitetty taulukossa 1, mutta näistä vaikutustavoista ei ole tällä hetkellä kovin paljon dokumentaatiota.

TESTIN PERIAATE

12. Tässä testissä kalat – alkaen hiljattain hedelmöittyneistä munista sukupuolisen eriytymisen päättymiseen saakka – altistetaan kolmelle pitoisuudelle kemikaalia, joka on liuotettu veteen. Testiolosuhteissa on käytettävä läpivirtausjärjestelmää, ellei se ole mahdotonta testikemikaalin saatavuuden tai luonteen (esimerkiksi vähäisen liukoisuuden) vuoksi. Testi aloitetaan asettamalla kaksi hiljattain hedelmöitynyttä munaa (ennen emosolun jakautumista)

▼M6

testiastioihin. Astioiden täyttäminen on kuvattu kunkin lajin osalta 27 kohdassa. Validoitujen kalalajien (medaka, kolmipiikki ja seeprakala) testi päättyy 60 päivän kuluttua kuoriutumisesta. Testin päättyessä kaikki kalat lopetetaan inhimillisesti. Jokaisesta kalasta otetaan biologinen näyte (veren plasma, maksa tai pää-/pyrstöhomogenaatti) vitellogeniinianalyysia varten, ja ruumis kiinnitetään kiinnitysaineella sukupuolirauhasten histologista arviointia varten. Siinä määritetään fenotyyppinen sukupuoli, ja sukupuolirauhasten histopatologinen tutkimus (rauhasten kehitysvaiheen määritys, sekasukupuolisuuden aste) voidaan toteuttaa valinnaisesti. Lajeilla, joilla on asianmukaiset merkit sukupuolesta, otetaan biologinen näyte (perä- tai selkäevästä) geneettisen sukupuolen määritystä varten (lisäykset 9 ja 10).

13. Yhteenveto validoituja lajeja (medaka, kolmipiikki ja seeprakala) koskevista oleellisista testiolosuhteista on lisäyksessä 2.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

14. Tuloksia välittömän myrkyllisyyden testistä tai muusta lyhytaikaista myrkyllisyyttä koskevasta testistä [esimerkiksi testimenetelmä C.14 (34) ja OECD:n testiohje (TG) 210 (1)], tulisi olla saatavilla. Tämä tarkoittaa sitä, että testiaineen vesiliukoisuus ja höyrynpaine tunnetaan, että käytettävissä on luotettava analyyttinen menetelmä aineen kvantifioimiseksi testiliuoksissa ja että menetelmän tarkkuus ja havaitsemisraja tunnetaan ja ne on raportoitu.

15. Tarpeellisia tietoja ovat mm. rakennekaava, kemikaalin puhtaus, stabiilisuus vedessä tai valossa, pKa, P_{ow} ja nopean biohajoavuuden testin (ks. testimenetelmä C.4) tulokset (35).

Testin hyväksyttävyyskriteerit

16. Testitulokset ovat hyväksyttäviä, jos seuraavat ehdot täyttyvät:

— Liuenneen hapen pitoisuus on vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko altistusjakson ajan.

— Veden lämpötila testiastioiden välillä vaihtelee enintään ± 1,5 °C milloin tahansa altistusjakson aikana ja pysyy sillä lämpötila-alueella, joka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäys 2).

— Käytettävissä tulee olla altistuksessa käytettävälle kemikaalille validoitu analyysimenetelmä, jonka havaitsemisraja on selvästi alle pienimmän nimellispitoisuuden. Lisäksi on kerättävä näyttöä, jolla osoitetaan, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat pysyneet hyväksyttävästi ± 20 prosentissa keskimääräisistä mitatuista arvoista.

— Hedelmöityneiden munien eloonjäämisaste kontrolleissa ja – mikäli tarpeen – liuotinkontrolleissa on vähintään yhtä suuri kuin lisäyksessä 2 määritellyt rajat.

— Kasvuun ja sukupuolijakaumaan testin päättyessä liittyvät hyväksymiskriteerit perustuvat kontrolliryhmistä saatuihin tietoihin (yhdistetty liuotin- ja vesikontrolli; jos ne ovat merkittävästi erilaisia, vain liuotinkontrolli).

▼M6

		Medaka	Seeprakala	Kolmipiikki
Kasvu	Kalan märkäpaino, kuivattu imeyttämällä vesi paperiin	> 150 mg	>75 mg	> 120 mg
	Pituus (vakiopituus)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Sukupuolijakauma (koiraiden/naaraiden prosenttiosuus)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— Kun käytetään liuotinta, sillä ei tulisi olla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta eloonjäämiseen, eikä sen pitäisi aiheuttaa hormonitoimintaa häiritseviä vaikutuksia tai muita haittavaikutuksia elinkaaren varhaisvaiheisiin, kuten liuotinkontrollista käy ilmi.

Jos havaitaan poikkeama testin hyväksymiskriteereistä, sen vaikutukset testin luotettavuuteen on otettava huomioon, ja nämä seikat on sisällytettävä tutkimusraporttiin.

TESTIMENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

17. Kaikkia lasista, ruostumattomasta teräksestä tai muusta kemiallisesti inertistä materiaalista valmistettuja astioita voi käyttää. Astioiden tulee olla riittävän suuria, jotta jäljempänä esitetyt täyttötiheyteen liittyvät kriteerit täyttyvät. Suositellaan, että testiastiat sijoitetaan koealueelle satunnaistetusti. Satunnaistettu lohkoittainen järjestys, jossa jokaista pitoisuutta on jokaisessa lohkossa, on ensisijainen täydelliseen satunnaistamiseen nähden. Testiastiat olisi suojattava ei-toivotuilta häiriöiltä.

Lajin valinta

18. Suositeltavat kalalajit luetellaan lisäyksessä 2. Menettelyt uusien lajien lisäämiseksi on esitetty 2 kohdassa.

Kutevan kalan hoito

19. Tarkempia tietoja kutevan kalan hoitamisesta hyväksyttävissä olosuhteissa on OECD:n testiohjeessa (TG) nro 210(1). Kuteva kala on ruokittava kerran tai kahdesti päivässä sopivalla ruoalla.

Alkioiden ja toukkien käsittely

20. Aluksi alkioita ja toukkia voidaan altistaa pienemmissä lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistetuissa astioissa, jotka laitetaan varsinaiseen testiastiaan. Astioiden sivujen tai päiden on oltava verkkoa, jotta testikemikaali pääsee virtaamaan astian läpi. Pienten astioiden läpi johdetaan pyörteetön virtaus ripustamalla astiat varteen, jota voidaan nostaa ja laskea astiassa siten, että organismit ovat nestepinnan alla koko ajan.

21. Jos munien säilytysastioita pidetään isossa testiastiassa telineissä, ritilöissä tai verkoissa, ne on poistettava toukkien kuoriutumisen jälkeen, mutta verkkopäädyt tai -sivut tulee kuitenkin pitää paikallaan kalojen karkaamisen estämiseksi. Jos toukkia täytyy siirtää, ne eivät saisi altistua ilmalle, eikä kalojen vapauttamiseen munien säilytysastioista tule käyttää haaveja. Siirtoajankohta vaihtelee lajeittain, eikä siirto ehkä ole aina välttämätöntä.

▼M6

Vesi

22. Testivedeksi sopii mikä tahansa vesi, jossa testilajin kontrollieläimet pysyvät elossa vähintään yhtä hyvin kuin lisäyksessä 3 kuvatussa vedessä. Veden laadun pitäisi pysyä vakiona testin ajan. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi reagoimalla testikemikaalin kanssa) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, näytteitä on otettava säännöllisin väliajoin analysoitavaksi. Orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus, johtavuus, pH ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laadun tiedetään pysyvän melko vakiona. Raskasmetallien (esimerkiksi Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), pääasiallisten anionien ja kationien (esimerkiksi Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) ja torjunta-aineiden pitoisuudet tulee mitata, jos veden laatu on kyseenalainen. Tarkempia tietoja kemiallisesta analyysista ja veden keräämisestä on 34 kohdassa.

Testiliuokset

23. Testissä tulisi käyttää läpivirtausjärjestelmää, jos se on käytännössä mahdollinen. Läpivirtaustesteissä on käytettävä testiaineen varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esimerkiksi annostelupumppua, laimenninta ja kyllästävää järjestelmää) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saa vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Virtausnopeus, joka on vähintään viisi kertaa testiastian tilavuus 24 tunnissa, on havaittu sopivaksi (1). Muoviletkujen tai muiden sellaisten materiaalien, jotka saattavat sisältää biologisesti aktiivisia kemikaaleja tai joihin testikemikaali saattaa adsorboitua, käyttämistä on pyrittävä välttämään.

24. Varastoliuos valmistetaan mieluiten liuottimia käyttämättä yksinkertaisesti sekoittamalla testikemikaali laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittamista tai ultraääntä). Jos testikemikaali liukenee veteen huonosti, on noudatettava OECD:n toimintaohjetta, joka koskee vaikeasti testattavien aineiden ja seosten vesieliöille myrkyllisyyden testaamista (OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures) (36). Liuottimien käyttöä tulee välttää, mutta se voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Esimerkkejä sopivista liuottimista on kirjallisuusviitteessä (36).

25. Puolistaattisia testiolosuhteita tulee välttää, ellei niiden käyttö ole perusteltua testikemikaaliin liittyvistä pakottavista syistä (esimerkiksi stabiilius, rajallinen saatavuus, kalleus tai vaarallisuus). Puolistaattisessa testissä voidaan käyttää kahta eri liuoksenvaihtomenetelmää: Joko uudet testiliuokset valmistetaan puhtaissa astioissa ja elossa olevat munat ja toukat siirretään varovasti niihin, tai testiorganismit pidetään testiastioissa sen aikaa, kun osa (vähintään kaksi kolmasosaa) testivedestä vaihdetaan päivittäin.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Munien kerääminen ja altistuksen kesto

26. Geneettisten poikkeamien välttämiseksi munia kerätään vähintään kolmelta kalaparilta tai -ryhmältä, jotka sekoitetaan ja valitaan satunnaisesti testin aloitukseen. Katso kuvaus kolmipiikin keinohedelmöityksestä lisäyksestä 11. Testi tulee aloittaa mahdollisimman pian munien hedelmöittymisen jälkeen. Alkiot on upotettava testiliuoksiin mieluiten ennen kuin emosolun

▼M6

jakautuminen alkaa tai mahdollisimman pian tämän vaiheen jälkeen, viimeistään kuitenkin 12 tunnin kuluttua hedelmöittymisestä. Testiä tulee jatkaa siihen saakka, kunnes sukupuolten eriytyminen kontrolliryhmässä on päättynyt (60 päivää kuoriutumisen jälkeen medakalla, kolmipiikillä ja seeprakalalla).

Täyttö

27. Testin alussa hedelmöityneitä munia on oltava vähintään 120 pitoisuutta kohti jaettuna vähintään neljään rinnakkaisnäytteeseen (kontrolliryhmiin jakaminen neliöjuuren perusteella on hyväksyttävää). Munat tulee jakaa käsittelyihin satunnaistetusti (käyttämällä satunnaistamiseen tilastollisia taulukoita). Astioiden täyttöaste (ks. määritelmä lisäyksestä 1) tulee olla riittävän pieni, jotta liuenneen hapen pitoisuus (vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta) voidaan säilyttää ilman astioiden suoraa ilmastusta. Läpivirtaustesteissä täyttöaste saisi olla enintään 0,5 g/l per 24 tuntia ja enintään 5 g/l liuosta minä tahansa ajankohtana. Viimeistään 28 päivän kuluttua hedelmöittymisestä rinnakkaisnäytekohtainen kalojen määrä tulee jakaa uudelleen, jotta jokaisessa rinnakkaisnäytteessä mahdollisimman tarkasti sama määrä kaloja. Jos altistumiseen liittyvää kuolleisuutta ilmenee, rinnakkaisnäytteiden määrää tulee vähentää vastaavasti, jotta käsittelytasojen välinen kalatiheys säilyy mahdollisimman samankaltaisena.

Valo ja lämpötila

28. Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan pitää olla sopivia käytetylle testilajille (ks. lisätietoja FSDT-testin koeolosuhteista lisäyksestä 2).

Ruokinta

29. Ruoka ja ruokinta ovat hyvin tärkeitä, ja on olennaista, että kussakin vaiheessa annetaan asianmukaista ruokaa sopivin väliajoin sellainen määrä, joka tukee normaalia kasvua. Ruokinnassa tulee noudattaa *ad libitum* -periaatetta ylimäärä minimoiden. Jotta kasvunopeus olisi riittävä, kalat on ruokittava vähintään kahdesti päivässä (viikonloppuisin riittää yksi kerta), ja ruokintakertojen välillä tulee olla vähintään kolme tuntia. Ylimääräinen ruoka ja ulosteet on tarvittaessa poistettava astiasta jätteen kertymisen välttämiseksi. Kokemuksen karttuessa ruoan tyyppiä ja ruokinta-aikataulua voi mukauttaa jatkuvasti eloonjäämisen edistämiseksi ja kasvun optimoimiseksi. Ehdotetulle aikataululle on pyrittävä saamaan asiantuntijoiden vahvistus. Ruokinta on lopetettava 24 h ennen testin päättymistä. Esimerkkejä sopivista ruoista on lisäyksessä 2 (katso myös OECD:n kaloilla testausta koskeva asiakirja ”Fish Testing Framework” (39).

Testipitoisuudet

30. Testikemikaalien pitoisuudet on porrastettava lisäyksessä 4 kuvatun mukaisesti. Testissä on käytettävä vähintään kolmea testipitoisuutta vähintään neljässä rinnakkaisnäytteessä. Käyrää, jossa esitetään LC_{50} saatavilla olevien välittömien myrkyllisyystestien altistusajan funktiona, olisi käytettävä apuna valittaessa testipitoisuusaluetta. Jos tietoja on määrä käyttää riskinarviointiin, testissä suositellaan käytettäväksi viittä testipitoisuutta.

31. Kemikaalipitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 10 prosenttia aikuisen eläimen välittömän myrkyllisyyden LC_{50}-arvosta tai 10 mg/l (näistä pienempi arvo), ei tarvitse testata. Enimmäistestipitoisuus on 10 prosenttia toukan tai nuoren eläimen LC_{50}-arvosta.

▼M6

Kontrollit

32. Testipitoisuuksien lisäksi testissä on käytettävä laimennusvesikontrollia (≥ 4 rinnakkaisnäytettä) ja tarvittaessa liuotinkontrollia (≥ 4 rinnakkaisnäytettä). Testissä saa käyttää vain sellaisia liuottimia, joilla ei tutkitusti ole tilastollisesti merkitsevää vaikutusta testissä tutkittaviin ominaisuuksiin.

33. Liuotinta käytettäessä sen lopullinen pitoisuus saa olla enintään 0,1 ml/l (36), ja kaikissa testiastioissa pitää olla sama pitoisuus laimennusvesikontrollia lukuun ottamatta. Liuottimen käyttöä tulee kuitenkin pyrkiä välttämään kaikin keinoin tai niiden pitoisuudet tulee pitää mahdollisimman pieninä.

Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus

34. Ennen testin aloittamista testikemikaalipitoisuus on analysoitava kemiallisesti sen tarkistamiseksi, että hyväksymiskriteerit täyttyvät. Kaikki rinnakkaisnäytteet on analysoitava yksittäin testin alussa ja lopussa. Testin aikana on analysoitava yksi rinnakkaisnäyte testipitoisuutta kohti vähintään kerran viikossa, ja rinnakkaisnäytteitä on vaihdettava järjestelmällisesti (1, 2, 3, 4, 1, 2…). Jos näytteet varastoidaan analysoitavaksi myöhemmin, niiden varastointimenetelmä on validoitava etukäteen. Näytteet on suodatettava (esimerkiksi käyttämällä huokoskokoa 0,45 μm) tai sentrifugoitava, jotta varmistetaan, että määritykset tehdään todellisessa liuoksessa olevasta kemikaalista.

35. Testin aikana kaikista testiastioista on mitattava liuennut happi, pH, kokonaiskovuus, johtavuus, suolapitoisuus (jos tarpeen) ja lämpötila. Vähintään liuennut happi, suolapitoisuus (jos tarpeen) ja lämpötila on mitattava viikoittain, ja pH, johtavuus ja kovuus testin alussa ja lopussa. Lämpötilaa on mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

36. Tulosten perustana tulee käyttää mitattuja pitoisuuksia. Jos testikemikaalin pitoisuus pysyy kuitenkin tyydyttävästi ± 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää joko nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia.

Havainnot ja mittaukset

Alkiokehityksen vaiheet

37. Altistus pitää aloittaa mahdollisimman pian hedelmöittymisen jälkeen ja ennen kuin emosolun jakautuminen alkaa, kuitenkin viimeistään 12 tunnin kuluttua hedelmöittymisestä. Näin varmistetaan varhaisen alkiokehityksen aikainen altistus.

Kuoriutuminen ja eloonjääminen

38. Kuoriutumisesta ja eloonjäämisestä olisi tehtävä havaintoja vähintään kerran päivässä, ja yksilöiden lukumäärät on kirjattava. Kuolleet alkiot, toukat ja nuoret kalat on poistettava heti kun ne on havaittu, koska ne saattavat hajota nopeasti tai muiden kalojen toiminta saattaa rikkoa ne. Kuolleita yksilöitä poistettaessa on oltava erittäin varovainen, ettei vieressä olevia munia tai toukkia kosketa tai vahingoiteta fyysisesti, sillä ne ovat hyvin herkkiä ja hauraita. Kuolemantapaukset todetaan eri kehitysvaiheessa eri tavoin:

— Munat: Erityisesti varhaisvaiheissa läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkymättömyys.

▼M6

— Toukat ja nuoret kalat: Toukat eivät liiku ja/tai niiden hengitysliikkeet puuttuvat ja/tai sydän ei lyö ja/tai keskushermosto on valkoinen ja läpinäkymätön ja/tai ne eivät reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin.

Epänormaali ulkonäkö

39. Niiden toukkien tai kalojen lukumäärä, joiden muoto on poikkeava, on kirjattava muistiin, ja poikkeavuuden ulkonäkö ja luonne on kuvattava. Huomattakoon, että epänormaaleja alkioita ja toukkia esiintyy luonnollisesti, ja niiden määrä voi olla useita prosentteja kontroll(e)issa joissakin lajeissa. Epänormaalit eläimet tulee vain poistaa testiastioista, kun ne kuolevat. Jos poikkeavuudet aiheuttavat kuitenkin kipua, tuskaa, kärsimystä tai pysyvää haittaa ja jos kuolema voidaan ennustaa luotettavasti, Euroopan parlamentin ja neuvoston 22 päivänä syyskuuta 2010 tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta antaman direktiivin 2010/63/EU mukaan eläimet on nukutettava ja lopetettava 44 kohdassa kuvatulla tavalla.

Epänormaali käyttäytyminen

40. Poikkeavuudet, kuten hyperventilaatio, koordinoimaton uinti, epätyypilliset äänet ja epätyypillinen syömiskäyttäytyminen on kirjattava muistiin niitä havaittaessa.

Paino

41. Testin lopussa kaikki eloonjääneet kalat on lopetettava (nukutettava, jos on määrä ottaa verikokeita), ja niiden yksilöllinen märkäpaino (kun ne on kuivattu imeyttämällä vesi paperiin) on punnittava.

Pituus

42. Testin lopussa kalojen yksilölliset pituudet (vakiopituus) on mitattava.

43. Näiden havaintojen avulla voidaan raportoida seuraavat tiedot:

— kertyvä kuolleisuus

— terveiden kalojen lukumäärät testin lopussa

— kuoriutumisen alkamis- ja päättymisajankohdat

— eloon jääneiden eläinten pituus ja paino

— epämuodostuneiden toukkien lukumäärät

— epätavallisesti käyttäytyvien kalojen lukumäärä.

Näytteenotto kaloilta

44. Kaloilta otetaan tarvittavat näytteet testin päättyessä. Kalat, joilta otetaan näytteitä, on lopetettava esimerkiksi MS-222:lla (100–500 mg litrassa liuosta, joka on puskuroitu 200 mg:lla $NaHCO_3$:a litrassa) tai FA-100:lla (4-allyyli-2-metoksofenoli: eugenoli), ja jokaisen kalan pituus on mitattava ja märkäpaino punnittava (kun kala on kuivattu imeyttämällä vesi paperiin), tai nukutettava, jos niiltä on määrä ottaa verinäyte (ks. 49 kohta).

Näytteenotto vitellogeniinianalyysia varten ja sukupuolen määritys histologisen arvioinnin avulla

45. Kaikilta kaloilta tulee ottaa näytteet ja ne pitää valmistella sukupuolen määritystä ja vitellogeniinianalyysia varten. Kaikki kalat on analysoitava histologisesti sukupuolen määrittämiseksi. Vitellogeniinimittauksissa vähintään

▼**M6**

16 kalaa käsittävä osanäyte jokaisesta rinnakkaisnäytteestä on hyväksyttävä. Vitellogeniini on analysoitava useammista kaloista, jos osanäytteen tulokset osoittautuvat epäselviksi.

46. Näytteenottomenetelmä vitellogeniinipitoisuuden ja sukupuolen määritystä varten määräytyy vitellogeniinin analyysimenetelmän mukaan:

Pää-/pyrstöhomogenaattimenetelmä vitellogeniinianalyysia varten

47. Kala lopetetaan. Jokaisen kalan pää ja pyrstö irrotetaan muusta ruumiista heti rintaevien ja selkäevän takaa tehtävillä viilloilla skalpellia käyttäen (ks. kuva 1). Jokaisen kalan pää- ja pyrstöosa yhdistetään, punnitaan ja numeroidaan yksitellen. Sen jälkeen ne jäädytetään nestemäisessä typessä, ja niitä säilytetään vähintään – 70 °C:ssa vitellogeniinianalyysia varten. Kalan ruumis numeroidaan ja kiinnitetään asianmukaisella kiinnitysaineella histologista arviointia varten (22). Tätä menetelmää käyttämällä vitellogeniini ja histopatologia arvioidaan jokaiselta kalalta yksitellen, ja mahdollinen vitellogeniinipitoisuuden muutos voidaan näin liittää kalan fenotyyppiseen tai geneettiseen sukupuoleen (medaka ja kolmipiikki). Katso lisätietoja homogenisointia koskevista ohjeista (lisäys 5) ja vitellogeniinin kvantifiointia koskevista ohjeista (lisäys 6).

Maksahomogenaattimenetelmä vitellogeniinianalyysia varten

48. Kala lopetetaan. Maksa irrotetaan ja säilytetään vähintään – 70 °C:ssa. Suositellut menetelmät maksan irrottamiseen ja esikäsittelyyn ovat saatavilla OECD:n testiohjeessa (TG) nro 229 (37) tai tämän liitteen luvussa C.37 (38). Sen jälkeen maksat homogenisoidaan yksittäin OECD:n testiohjeessa (TG) nro 229 tai tämän liitteen luvussa C.37 kuvatun mukaisesti. Kerättyä supernatanttia käytetään vitellogeniinin mittaamiseen homologisella ELISA-tekniikalla (ks. esimerkki kvantifioinnista seeprakalan yhteydessä lisäyksestä 6 tai medakan yhteydessä OECD:n testiohjeesta (TG) nro 229 (37)). Tällä tavalla on myös mahdollista saada kalakohtaista tietoa sekä vitellogeniinista että sukurauhasten histologiasta.

Veriplasmamenetelmä vitellogeniinianalyysia varten

49. Verinäyte otetaan nukutetuilta kaloilta sydänpunktiolla, pyrstösuonesta tai leikkaamalla pyrstö, ja se sentrifugoidaan 4 °C:ssa plasman keräämistä varten. Plasma säilytetään vähintään – 70 °C:ssa käyttämiseen saakka. Kaikki kalat lopetetaan ja kiinnitetään kiinnitysaineella histologista tutkimusta varten. Sekä plasmanäytteet että kalat numeroidaan yksilöllisesti, jotta vitellogeniinipitoisuudet voidaan yhdistää kalan sukupuoleen.

Kuvio 1

Kalan leikkaaminen pää-/pyrstöhomogenaattiosiin vitellogeniinin mittausta varten ja keskiruumiin histologista arviointia varten



▼M6

Geneettisen sukupuolen määrittäminen

50. Biologinen näyte geneettisen sukupuolen määrittämistä varten otetaan jokaiselta niiden lajien kalalta, joilla on asianomaiset merkit sukupuolesta. Medakalta näytteeksi otetaan peräevä tai selkäevä. Tarkat ohjeet ovat lisäyksessä 9, mukaan luettuina kudosnäytteiden ottaminen ja sukupuolen määrittäminen PCR-menetelmällä. Kolmipiikkiä koskevat ohjeet kudosnäytteiden ottamisesta ja sukupuolen määrittämisestä PCR-menetelmällä ovat lisäyksessä 10.

Vitellogeniinipitoisuuden mittaaminen

51. Vitellogeniinipitoisuus on mitattava määrällisesti ja analyyttisesti validoidulla menetelmällä. Tietyssä laboratoriossa käytetyn menetelmän testin sisäisestä ja testien välisestä vaihtelusta tulisi olla saatavilla tietoa. Laboratorioiden välisen ja laboratorion sisäisen vaihtelun lähde perustuu (todennäköisimmin) kalapopulaation eri kehitysvaiheisiin. Kun otetaan huomioon vitellogeniinimittauksiin liittyvä vaihtelu, pelkästään tähän ominaisuuteen perustuvaan NOEC-arvoon tulee suhtautua hyvin varauksellisesti. Käytettävissä on eri menetelmiä, joilla voidaan arvioida vitellogeniinin tuotantoa tässä testissä käytetyillä lajeilla. Mittaustekniikka, joka on sekä varsin herkkä että spesifi on proteiinipitoisuuksien määrittäminen entsyymivälitteisellä immunosorbenttimääritysmenetelmällä (ELISA-menetelmällä). Tällöin on käytettävä homologisia vasta-aineita (joita on muodostunut saman lajin vitellogeniinia vastaan) ja tärkeimpiä homologisia standardeja.

Sukupuolen määrittäminen

52. Sen mukaan, mitä vitellogeniinin näytteenottomenetelmää käytetään, koko kala tai jokaisesta kalasta jäljelle jäävä keskiruumis asetetaan kudoskasettiin (johon on laitettu tarvittavat merkinnät etukäteen) ja kiinnitetään asianmukaisella kiinnitysaineella sukupuolen histologista määritystä varten (valinnaisesti myös sukupuolirauhasten kehitysvaiheen arviointia varten). Ohjeita kiinnittämistavoista on lisäyksessä 7 sekä OECD:n ohjeasiakirjassa, joka koskee hormonitoimintaan liittyvän histopatologian diagnosointia kalojen sukupuolirauhasissa (Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads) (22). Käsittelyn jälkeen kalat valetaan parafiiniblokiksi. Kalat on asetettava parafiiniblokkiin pitkittäin. Jokaiselta yksilöltä otetaan vähintään kuusi pitkittäisleikettä (paksuus 3–5 μm) frontaalitasossa, mukaan luettuina sukupuolirauhaskudosta molemmista rauhasista. Näiden leikkeiden välinen etäisyys tulisi olla koirailla noin 50 μm ja naarailla 250. Koska jokaisessa blokissa on kuitenkin usein sekä koiraita että naaraita (jos yhteen blokkiin on valettu useampi kuin yksi yksilö), näistä blokeista otettujen leikkeiden väli tulisi olla noin 50 μm siihen saakka, kunnes jokaisen koiraan sukupuolirauhasista on saatu vähintään kuusi leikettä. Sen jälkeen leikkeiden välistä etäisyyttä voidaan suurentaa naarailla noin 250 μm:iin. Leikkeet värjätään hematosykliinillä ja eosiinilla, ja ne tutkitaan valomikroskoopilla sukupuoleen keskittyen (koiras, naaras, sekasukupuolinen vai eriytymätön). Sekasukupuolisuus määritellään siten, että kuutta analysoitua leikettä kohti kiveksissä on useampi kuin yksi oosyytti tai että munasarjoissa on spermatogeenisia soluja (kyllä/ei). Munasarjojen ja kivesten histopatologia ja kehitysvaiheen määritys ei ole pakollista, mutta jos ne tutkitaan, tulokset on analysoitava tilastollisesti ja raportoitava. On muistettava, että joillakin kalalajeilla täysin kehittyneiden sukupuolirauhasten puuttuminen on luonnollista, ja niillä voi olla vain yksi sukupuolirauhanen (esimerkiksi medaka ja toisinaan myös seeprakala). Kaikki tällaiset havainnot on kirjattava muistiin.

53. Medaka-yksilön geneettisen sukupuolen määritys perustuu siihen, onko niillä medakan koirassukupuolen määrittävä geeni DMY vai ei. Tämä geeni

▼M6

sijaitsee Y-kromosomissa. Medakan genotyyppinen sukupuoli voidaan tunnistaa sekvensoimalla DMY-geeni DNA:sta, joka on otettu esimerkiksi peräevän tai selkäevän palasesta. Jos kalalla on DMY-geeni, kyseessä on XY-yksilö (koiras) fenotyypistä riippumatta, ja jos DMY-geeniä ei ole, kyseessä on XX-yksilö (naaras) fenotyypistä riippumatta (23). Kudosten valmistelua ja PCR-menetelmää koskevia ohjeita on lisäyksessä 9. Kolmipiikkiyksilön geneettinen sukupuoli määritetään myös PCR-menetelmällä, jota kuvataan lisäyksessä 10.

54. Sekasukupuolisuuden esiintyminen (katso määritelmä lisäyksestä 1) on raportoitava.

Sekundaariset sukupuoliominaisuudet

55. Medakan kaltaisilla lajeilla sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia ohjaa hormonijärjestelmä, joten havainnot kalan fyysisestä ulkonäöstä tulisi tehdä altistuksen lopussa, mikäli mahdollista. Medakalla naaraiden peräevän takaosassa oleva papillimuodostelma on androgeenille herkkä. Tämän liitteen (38) luvussa C.37 on asiaankuuluvia valokuvia koiraan ja koiraaksi muuttuneen naaraan sekundaarisista sukupuoliominaisuuksista.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

56. On tärkeää, että ominaisuus määritetään vahvimmalla validilla tilastollisella testillä. Kokeellinen yksikkö on rinnakkaisnäyte, mutta rinnakkaisnäytteiden sisäinen vaihtelu on sisällytettävä tilastolliseen testaukseen. Lisäyksessä 8 on päätöksentekoa tukeva vuokaavio, joka on tarkoitettu avuksi, kun valitaan käytettävää sopivinta tilastollista testiä altistustestistä saatujen tietojen piirteiden perusteella. Tilastollinen merkitsevyystaso on 0,05 kaikkien asiaankuuluvien ominaisuuksien yhteydessä.

Sukupuolten ja geneettisten sukupuolten jakaumat

57. Sukupuolijakaumista on analysoitava altistuksen merkitsevä vaikutus (NOEC/LOEC-lähestymistapa) Jonckheere-Terpstran testillä (trenditestillä), jos monotoninen annos-vastesuhde on todettu. Jos annos-vastesuhde on ei-monotoninen, on sovellettava kahta testiä: Dunnettin testiä käytetään, jos normaalisuus ja homogeeninen varianssi on havaittu. Sen sijaan jos on havaittu heterogeeninen varianssi, käytetään Tamhane-Dunnettin testiä. Muussa tapauksessa käytetään Mann-Whitneyn tarkkaa testiä ja Bonferroni-Holm-korjausta. Vuokaavio, jossa kuvataan sukupuolijakaumaan liittyviä tilastoja, on lisäyksessä 8. Sukupuolijakaumat on esitettävä taulukoissa pitoisuuden mukaisina jakaumina ± keskihajonta koiraiden, naaraiden, sekasukupuolisuuden ja eriytymättömyyden osalta. Tilastollinen merkitsevyys tulisi korostaa. Esimerkkejä on FSDT-testin vaiheen 2 validointiraportissa (42). Geneettinen sukupuoli on ilmoitettava prosenttiosuutena koiraiden ja naaraiden fenotyyppisen sukupuolen vaihtumisesta, sekasukupuolisuudesta ja eriytymättömyydestä.

Vitellogeniinipitoisuudet

58. Vitellogeniinipitoisuuksista on analysoitava altistumisen merkitsevä vaikutus (NOEC/LOEC-lähestymistapa). Dunnettin testiä tulisi käyttää mieluummin kuin t-testiä ja Bonferronin korjausta. Jos käytetään Bonferronin korjausta, Bonferroni-Holmin korjaus on suositeltavampi. Vitellogeniinin log-muunnokset on otettava huomioon normaalisuuden ja varianssin homogeenisuuden saavuttamiseksi. Jos pitoisuus-vaste on yhdenmukainen monotonisuuden kanssa, Jonckheere-Terpstran testi on kaikkiin edellä mainittuihin testeihin nähden ensisijainen. Jos käytetään t-testejä tai Dunnettin testiä, merkitsevä ANOVA F -testi ei ole etenemisen kannalta tarpeen. Katso tarkempia tietoja

▼M6

lisäyksessä 8 olevasta vuokaaviosta. Tulokset on ilmoitettava taulukoissa pitoisuuksien keskiarvona ± keskihajonta koiraiden, naaraiden, sekasukupuolisuuden ja eriytymättömyyden osalta erikseen. Fenotyyppisten naaraiden ja fenotyyppisten koiraiden tilastollinen merkitsevyys on korostettava. Esimerkkejä on FSDT-testin vaiheen 2 validointiraportissa (42).

Testikemikaalin varsinaiset pitoisuudet

59. Testikemikaalin todelliset pitoisuudet testiastioissa on analysoitava 34 kohdassa kuvattujen taajuuksien mukaisesti. Tulokset on ilmoitettava taulukoissa keskimääräisenä pitoisuutena ± keskihajontana rinnakkaisnäytekohtaisesti ja myös pitoisuuskohtaisesti. Tällöin on annettava tiedot näytteiden lukumäärästä ja korostettava niitä vieraita havaintoja, jotka olivat ± 20 prosentin sisällä keskimääräisestä käsittelypitoisuudesta. Esimerkkejä on FSDT-testin vaiheen 2 validointiraportissa (42).

Tulosten tulkinta

60. Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testiliuoksista mitatut testikemikaalipitoisuudet ovat lähellä analyysimenetelmän havaitsemisrajaa.

Testiraportti

61. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali

— Olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet; kemialliset tunnistetiedot; tiedot esimerkiksi puhtaudesta ja testikemikaalin kvantifioinnin analyysimenetelmä.

Testiolosuhteet

— Käytetty testimenettely (esimerkiksi läpivirtaus, puolistaattinen/ajoittaisvaihtoinen); testisuunnitelma ja testipitoisuudet, varastoliuosten valmistusmenetelmä (liitteessä), liuoksen vaihtotiheys (liuotusapuaine ja sen pitoisuus tulee ilmoittaa, jos sitä on käytetty).

— Testikemikaalin nimellispitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa sekä menetelmä, jolla arvot laskettiin (käytetty analyysimenetelmä tulee esittää liitteessä); todisteet siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuuksia todellisessa liuoksessa.

— Veden laatu testiastioissa: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus.

— Tarkat tiedot ruokinnasta (esimerkiksi ruoan (ruokien) tyyppi, lähde, annettu määrä ja antotiheys sekä analyysit merkittävistä kontaminanteista (esimerkiksi PCB-yhdisteet, PAH-yhdisteet ja orgaanista klooria sisältävät torjunta-aineet), mikäli tarpeen.

Tulokset

— Todisteet siitä, että kontrollit täyttävät validiteettikriteerit: tiedot kuoriutumisasteesta on esitettävä taulukoissa rinnakkaisnäyte- ja pitoisuuskohtaisena prosenttiosuutena. Hyväksymiskriteereitä (kontrollit) koskevat vieraat havainnot tulee korostaa. Eloonjääminen on esitettävä rinnakkaisnäyte- ja pitoisuuskohtaisena prosenttiosuutena. Validiteettikriteereitä koskevat vieraat havainnot tulee korostaa.

— Havainnoituja eri ominaisuuksia koskevat tulokset on esitettävä selvästi: alkion eloonjääminen ja kuoriutumisen onnistuminen; ulkoiset poikkeamat; pituus ja paino; vitellogeniinimittaukset (ng/g homogenaatissa, ng/ml plasmassa tai ng/mg maksassa); sukupuolirauhasten histologia,

▼M6

sukupuolijakauma, tiedot geneettisestä sukupuolesta; kaloilla ilmenneet epätavalliset reaktiot ja kaikki testikemikaalin aiheuttamat näkyvät vaikutukset.

62. Tulokset on esitettävä keskiarvoina ± keskihajonta (SD) tai keskivirhe (SE). Tilastoista on ilmoitettava vähintään NOEC- ja LOEC-arvot ja luottamusvälit. Tilastollista vuokaaviota (lisäys 8) on noudatettava.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, ”Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals”, Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194–202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, ”Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment”, Environmental Health Perspectives 103, pp. 173–178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), ”An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin”, Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337–347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), ”Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)”, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119–131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), ”Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters”, Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319–321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), ”Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone”, Aquatic Toxicology 65, pp. 397–411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), ”Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances”, Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319–326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), ”Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults”, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533–541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V.Sullivan (1999), ”Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds”, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113–125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), ”Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)”, Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699–1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), ”Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin”, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161–169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), ”The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption – II – kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", Aquatic Toxicology 70, pp. 311–326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", Journal of Health Science 50, pp. 301–308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology, 78, pp. 202–206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), "Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101–105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), "Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48–51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621–633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), "Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237–243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3, pp. 136–151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), "An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio", Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088–1098.

(22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), "Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes", Developmental Dynamics 231, pp. 518–526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), "Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations", Zoological Science 21, pp. 613–619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897–8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), "Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake", Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920–1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), "Development of chronic tests for endocrine active chemicals – Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)", Aquatic Toxicology 77, pp. 279–290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), ”Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)”, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57–66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), ”Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)”, Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257–266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), ”Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations”, Aquatic Toxicology 98, pp. 336–343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), ”Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)”, Aquatic Toxicology 63, pp. 391–403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), ”Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development”, Aquatic Toxicology 70, pp. 11–21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), ”Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)”, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165–170.

(34) Tämän liitteen luku C.14 Nuorten kalojen kasvutesti.

(35) Tämän liitteen luku C.4 Nopea biohajoavuus.

(36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(37) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(38) Tämän liitteen luku C.37 21 päivän mittainen seulontatutkimus kaloilla: Lyhytaikainen estrogeeni- ja androgeeniaktiivisuuteen sekä aromataasin estoon kohdistuva seulonta.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris.

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), ”Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio” Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9–10 pp 768–779.

(41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

(42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.

(43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.

(44) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta. EYVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

▼M6

Lisäys 1

Lyhenteet ja määritelmät

Apikaalinen päätepiste: aiheuttaa vaikutuksen populaation tasolla

ASV: air saturation value, ilman kyllästysarvo

Biomarkkeri: aiheuttaa vaikutuksen yksilön tasolla

Kemikaali: aine tai seos

Dph: days post hatch, (xx) päivää kuoriutumisen jälkeen

DMY: Y-kromosomispesifi DM-domeenin geeni, jota medakakalojen kehittyminen koiraiksi edellyttää.

ELISA: entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys

Kalan paino: kalan märkäpaino (kuivattu imeyttämällä vesi paperiin)

FSDT: Fish Sexual Development Test, kalojen sukupuolikehitystä tutkiva testi

HPG-akseli: hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli

Sekasukupuolinen kala: kala, jolla on kuutta analysoitua leikettä kohti useampi kuin yksi oosyytti kiveksissä tai spermatogeneettisiä soluja munasarjoissa (kyllä/ei)

Täyttöaste: kalojen märkäpaino tilavuusyksikköä kohti

MOA: mode of action, vaikutustapa

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain-Reaction, käänteiskopioija-entsyymi-polymeraasiketjureaktio

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos

Eriytymätön kala: kala, jonka sukupuolirauhasissa ei ole selvästi näkyviä itusoluja

VTG: vitellogeniini

▼**M6**

Lisäys 2

FSDT-testin (makean veden lajit) koeolosuhteet

1. Suositellut lajit	Medaka (*Oryzias latipes*)	Seeprakala (*Danio rerio*)	Kolmipiikki (*Gasterostreus aculeatus*)
2. Testityyppi	Läpivirtaus tai puolistaattinen	Läpivirtaus tai puolistaattinen	Läpivirtaus tai puolistaattinen
3. Veden lämpötila	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Valaistus	Loistelamppu (laajakirjoinen)	Loistelamppu (laajakirjoinen)	Loistelamppu (laajakirjoinen)
5. Valovoima	10–20 µE/m^2/s, 540–1 080 luksia tai 50–100 ft-c:tä (ympäröivän laboratorion tasot)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 080 luksia tai 50–100 ft-c:tä (ympäröivän laboratorion tasot)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 080 luksia tai 50–100 ft-c:tä (ympäröivän laboratorion tasot)
6. Valojaksot	12–16 h valoisaa, 8–12 h pimeää	12–16 h valoisaa, 8–12 h pimeää	16 h valoisaa, 8 h pimeää
7. Astian vähimmäiskoko	Yksittäisiin astioihin on mahduttava vähintään seitsemän litraa vettä	Yksittäisiin astioihin on mahduttava vähintään seitsemän litraa vettä	Yksittäisiin astioihin on mahduttava vähintään seitsemän litraa vettä
8. Testiliuosten tilavuuden muutokset	Vähintään viisi päivässä	Vähintään viisi päivässä	Vähintään viisi päivässä
9. Testiorganismien ikä altistuksen alussa	Hiljattain hedelmöityneet munat (varhainen rakkula-aste)	Hiljattain hedelmöityneet munat (varhainen rakkula-aste)	Hiljattain hedelmöityneet munat
10. Munien lukumäärä käsittelyä kohti	Vähintään 120	Vähintään 120	Vähintään 120
11. Käsittelyjen lkm	Vähintään 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)	Vähintään 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)	Vähintään 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)
12. Rinnakkaisnäytteiden lkm käsittelyä kohti	Vähintään 4 (ellei käytetty neliöjuureen perustuvaa jakamista kontrolliryhmiin)	Vähintään 4 (ellei käytetty neliöjuureen perustuvaa jakamista kontrolliryhmiin)	Vähintään 4 (ellei käytetty neliöjuureen perustuvaa jakamista kontrolliryhmiin)
13. Ruokinta	Elävä ravinto (*Artemia*), pakastetut täysikasvuiset suolalehtijalkaiset, hiutaleruoka jne. Kalat suositellaan ruokittavan kahdesti päivässä.	Kalanpoikasten erikoisruoka, elävä ravinto (*Artemia*), pakastetut täysikasvuiset suolalehtijalkaiset, hiutaleruoka jne. Kalat suositellaan ruokittavan kahdesti päivässä.	Elävä ravinto (*Artemia*), pakastetut täysikasvuiset suolalehtijalkaiset, hiutaleruoka jne. Kalat suositellaan ruokittavan kahdesti päivässä.
14. Ilmastus	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 70 % ilman kyllästysarvosta

▼**M6**

15. Laimennusvesi	Puhdas pinta- tai kaivovesi tai synteettinen vesi	Puhdas pinta- tai kaivovesi tai synteettinen vesi	Puhdas pinta- tai kaivovesi tai synteettinen vesi
16. Testikemikaalialtistuksen kesto	60 pv kuoriutumisen jälkeen	60 pv kuoriutumisen jälkeen	60 pv kuoriutumisen jälkeen
17. Biologiset ominaisuudet	Kuoriutumisen onnistuminen, eloonjäämisen morfologia, VTG sukup.rauhasten histologia, geneettinen sukupuoli sukup.jakauma	Kuoriutumisen onnistuminen, eloonjäämisen morfologia, VTG sukup.rauhasten histologia, sukup.jakauma	Kuoriutumisen onnistuminen, eloonjäämisen morfologia, VTG sukup.rauhasten histologia, sukup.jakauma
18. Testin hyväksymiskriteerit (kontrollien yhdistetyt rinnakkaisnäytteet)	Kuoriutumisen onnistuminen > 80 %	Kuoriutumisen onnistuminen > 80 %	Kuoriutumisen onnistuminen > 80 %
	Kuoriutumisen jälkeinen eloonjääminen ≥ 70 %,	Kuoriutumisen jälkeinen eloonjääminen ≥ 70 %,	Kuoriutumisen jälkeinen eloonjääminen ≥ 70 %,
	kasvu (kalan märkäpaino, kuivattu imeytämällä vesi paperiin) > 150 mg	kasvu (kalan märkäpaino, kuivattu imeytämällä vesi paperiin) > 75 mg	kasvu (kalan märkäpaino, kuivattu imeytämällä vesi paperiin) > 120 mg
	Pituus (vakiopituus) > 20 mm	Pituus (vakiopituus) > 14 mm	Pituus (vakiopituus) > 20 mm
	Sukup.jakauma (% koiraita tai naaraita) 30–70 %	Sukup.jakauma (% koiraita tai naaraita) 30–70 %	Sukup.jakauma (% koiraita tai naaraita) 30–70 %

▼**M6**

Lisäys 3

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

AINESOSA	KESKITTYMÄ
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 ug/l
Jäännöskloori	< 10 ug/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polyklooratujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼**M6**

Lisäys 4

Testimenetelmästä C.14 / Ohjeita testipitoisuuksista

Sarake (välillä 100–10 tai välillä 10–1 olevien pitoisuuksien lukumäärä) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Sarakkeesta voi valita kolmen (tai useamman) peräkkäisen pitoisuuden sarjan. Sarakkeessa (x) olevien pitoisuuksien keskivälillä olevia arvoja on sarakkeessa (2x + 1). Luetellut arvot voivat olla prosenttiosuuksina tilavuusyksikköä tai painoyksikköä kohti ilmaistuja pitoisuuksia (mg/l tai µg/l). Arvot voidaan tarvittaessa jakaa tai kertoa kymmenen potensseilla. Saraketta 1 voidaan käyttää, jos myrkyllisyystaso on hyvin epävarma.

▼M6

Lisäys 5

Ohjeet pään ja pyrstön homogenisointiin (nuoret seeprakalat, rasvapäämutut, kolmipiikit ja medakat)

Tässä kohdassa kuvataan menettelyt, jotka edeltävät vitellogeniinipitoisuuden kvantifiointia. Myös muita menettelyjä, joiden tuloksena on samankaltainen vitellogeniinin kvantifiointi, voidaan käyttää. Testissä voidaan valita, määritetäänkö vitellogeniinipitoisuus veren plasmasta tai maksasta pää-/pyrstöhomogenaatin sijasta.

Menettely

1. Kalat nukutetaan ja lopetetaan testikuvauksen mukaisesti.

2. Kalan pää ja pyrstö leikataan irti testikuvauksessa esitetyllä tavalla. **Tärkeää**: Kaikki dissekointivälineet ja leikkauspöytä on huuhdeltava ja puhdistettava kunnolla (esimerkiksi 96-prosenttisella etanolilla) jokaisen kalan käsittelyn jälkeen, jottei naaraiden tai niiden koiraiden, joille kemikaali on aiheuttanut vaikutuksia, vitellogeniini saastuta terveitä koiraita.

3. Jokaisen kalan pään ja pyrstön yhteispaino punnitaan lähimpään milligrammaan.

4. Punnituksen jälkeen kalan osat laitetaan asianmukaisiin putkiin (esimerkiksi 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin) ja jäädytetään – 80 °C:ssa homogenisointiin saakka. Ne voidaan myös homogenisoida suoraan jään päällä kahdella muovisurvimella. (Myös muita menetelmiä voi käyttää, jos ne tehdään jään päällä ja jos lopputuloksena on homogeeninen massa). **Tärkeää**: *Putket on numeroitava asianmukaisesti, jotta yhden kalan pää ja pyrstö voidaan yhdistää siihen ruumiinosaan, jota käytetään sukupuolirauhasen histologisessa tutkimuksessa*.

5. Kun homogeeninen massa on valmis, siihen lisätään 4–10 kertaa kudoksen painon verran **jääkylmää homogenisointipuskuria** (*) (muista laimennus). Jatka työskentelyä survimilla, kunnes seos on homogeeninen. **Tärkeä huomautus**: *Jokaiselle kalalle käytetään uusia survimia*.

6. Näytteet laitetaan jäähän siihen saakka, kunnes ne sentrifugoidaan **4 °C**:ssa 50 000 g:ssa 30 minuutin ajan.

7. Laita pipetillä 20–50 µl:n supernatanttiannoksia (huomaa määrä) **vähintään kahteen** putkeen upottamalla pipetin kärki pinnan rasvakerroksen läpi ja vetämällä varovasti supernatanttia pipettiin ilman rasva- tai pellettifraktioita.

8. Putkia säilytetään – 80 °C:ssa niiden käyttöön saakka.

(*) *Homogenisointipuskuri:*

(50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteaasinestäjäsekoitus (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaasinestäjäsekoitus (tai vastaavat proteaasinestäjäsekoitukset).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteaasinestäjäsekoitus: Sigman (nisäkkäiden kudoksille tarkoitettu) tuote nro **P 8340**.

Huomautus: Homogenisointipuskuri on käytettävä samana päivänä kuin se valmistetaan. Pidä puskuri jään päällä käytön aikana.

▼**M6**

Lisäys 6

Ohjeet seeprakalojen (*Danio rerio*) pää- ja pyrstöhomogenaatin vitellogeniinipitoisuuden kvantifiointiin (muokattu Holbechin ja muiden (2001) laatimista ohjeista) myös muita menetelmiä, joissa käytetään homologisia vasta-aineita ja standardeja, voidaan käyttää.

1. Mikrotitterilevyt (sertifioitu Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Tanska), jotka on aiemmin päällystetty 5 µg/ml:lla anti-seeprakala-lipovitelliini-IgG:tä, sulatetaan ja pestään kolme kertaa pesupuskuriliuoksella (*).

2. Puhdistettu seeprakalan vitellogeniinistandardi ([1]) laimennetaan asteittain pitoisuuteen 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 ja 20 ng/ml laimennuspuskurissa (**), ja näytteet laimennetaan vähintään 200 kertaa (matriisivaikutuksen estämiseksi) laimennuspuskurissa, jonka jälkeen ne laitetaan mikrotitterilevyihin. Testikontrollia laitetaan kaksinkertainen määrä. Jokaiseen kuoppaan laitetaan 150 µl. Standardit laitetaan kaksinkertaisesti ja näytteet kolminkertaisesti. Anna inkuboitua ravistimessa yön yli 4 °C:n lämpötilassa.

3. Levyt pestään viisi kertaa pesupuskurilla.

4. Dekstraaniketjuun liittynyt HRP (esimerkiksi AMDEX A/S, Tanska) ja konjugoituneet vasta-aineet laimennetaan pesupuskurissa; varsinainen laimennus vaihtelee erän ja iän mukaan. Jokaiseen kuoppaan laitetaan 150 µl, ja levyjä inkuboidaan ravistimessa tunnin ajan huoneenlämmössä.

5. Levyt pestään viisi kertaa pesupuskurilla, ja niiden pohja puhdistetaan huolellisesti etanolilla.

6. Jokaiseen kuoppaan laitetaan 150 µl TMB plus -substraattia (***). Suojaa levy valolta foliolla ja tarkkaile värin kehittymistä ravistimessa.

7. Kun vakiokäyrä on täysin kehittynyt, entsyymitoiminta pysäytetään lisäämällä jokaiseen kuoppaan 150 µl 0,2 M:n H_2SO_4:ää.

8. Absorbanssi mitataan aallonpituusalueella 450 nm (esimerkiksi Molecular Devices Thermomax -mikrolevynlukijalla). Tiedot analysoidaan laitteistoon kuuluvalla ohjelmistolla (esimerkiksi Softmaxilla).

(*) Pesupuskuri

PBS-varastoliuos (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Säädä pH:ksi 7,3 ja täytä 5 litraksi Milliporen H_2O:lla Säilytä 4 °C:ssa.

(**) Laimennuspuskuri:

PBS-varastoliuos (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Säädä pH:ksi 7,3 ja täytä 1 litraksi Milliporen H2O:lla. Säilytä 4 °C:ssa.

(***) TMB plus on käyttövalmis substraatti, jonka valmistaja on KemEnTec (Tanska). Tuote on herkkä valolle. Säilytä 4 °C:ssa.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), puhdistettu seuraavan viitteen mukaisesti: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: 385–398.

▼**M6**

(****) PBS-varastoliuos

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Säädä pH:ksi 6,8 ja täytä 2 litraksi Milliporen H_2O:lla. Säilytä huoneenlämmössä.

▼M6

Lisäys 7

Ohjeet kudosleikkeiden valmisteluun sukupuolen ja sukupuolirauhasten kehitysasteen määritystä varten

Tässä kohdassa kuvataan menettelyt, jotka edeltävät histologisten leikkeiden arviointia. Myös muita menetelmiä, joiden tuloksena on samankaltainen sukupuolen ja sukupuolirauhasten kehitysasteen määritys, voidaan käyttää.

Muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta nämä menettelyt ovat samanlaisia medakalle (JMD) ja seeprakalalle (SK).

Lopettaminen, ruumiinavaus ja kudosten kiinnittäminen

Tavoitteet:

1. Kalan inhimillinen lopettaminen.

2. Tarvittavien paino- ja pituustietojen hankkiminen.

3. Sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien arvioiminen.

4. Kudosten dissekointi vitellogeniinianalyysia varten.

5. Sukupuolirauhasten kiinnittäminen.

Menettelyt:

1. Kala on lopetettava juuri ennen ruumiinavausta. Ellei ruumiinavauksiin ole käytettävissä useampia henkilöitä, samanaikaisesti ei saa lopettaa useampia kaloja.

2. Kala otetaan pois testiastiasta tiheällä haavilla ja siirretään ruumiinavausalueelle kuljetussäiliössä.

3. Sen jälkeen kala laitetaan lopetusliuokseen. Kala otetaan pois liuoksesta, kun hengitys on lakannut ja kun kala ei reagoi ulkoisiin ärsykkeisiin.

4. Kala punnitaan märkänä.

5. Vitellogeniinianalyysissa tarvittavien kudosten valmistelua varten kalan voi asettaa korkkialustalle dissekointimikroskoopin tasolevylle.

   a. Seeprakalan pää leikataan heti rintaevän takaa ja pyrstö leikataan heti selkäevän takaa.

   b. Medakan maha aukaistaan huolellisesti tehdyllä viillolla, joka ulottuu vatsanpuoleista keskiviivaa pitkin hartiaosasta peräaukon kallonpuoleiseen päähän. Maksa irrotetaan varovasti pieniä pinsettejä ja pieniä saksia käyttäen.

6. Vitellogeniinianalyysissa tarvittavat näytteet laitetaan Eppendorf-putkiin ja jäädytetään heti nestemäisellä typellä.

7. Sukupuolirauhaset sisältävä muu ruumis laitetaan muoviseen kudoskasettiin (johon on tehty tarvittavat merkinnät etukäteen), joka siirretään Davidsonin tai Bouinin kiinnitysaineeseen. Kiinnitysainetta tulee olla vähintään kymmenkertainen määrä kudosten arvioituun määrään nähden. Kiinnitysainetta sisältävää astiaa ravistetaan varovasti viisi sekuntia, jotta ilmakuplat häviävät kasetista.

8. a. Kaikkia kudoksia pidetään Davidsonin kiinnitysaineessa yön yli, ja seuraavana päivänä ne siirretään yksittäisiin astioihin, jotka sisältävät 10-prosenttista neutraalia puskuroitua formaliinia. Kudoskasetit sisältäviä säiliöitä ravistetaan varovasti viisi sekuntia, jotta formaliini tunkeutuu kasetteihin kunnolla.

▼M6

b. Kudoksia pidetään Bouinin kiinnitysaineessa 24 h, jonka jälkeen ne siirretään 70-prosenttiseen etanoliin.

Kudosten käsittely

Tavoitteet:

1. Kudosten kuivaaminen parafiinin riittävän tunkeutumisen varmistamiseksi.

2. Kudosten kyllästäminen parafiinilla kudosten eheyden säilyttämiseksi ja kiinteän pinnan luomiseksi mikrotomiaa varten.

Menettelyt:

3. Etiketein varustetut kudoskasetit otetaan pois formaliini-/etanolisäilytyksestä ja laitetaan käsittelykoreihin. Käsittelykori asetetaan kudosprosessoriin.

4. Sen jälkeen valitaan prosessointiohjelma.

5. Kun prosessointivaihe kudosprosessorissa on päättynyt, kori(t) voidaan siirtää valuasemalle.

Valaminen

Tavoite:

Aseta näyte kiinteään parafiiniin oikeaan asentoon mikrotomiaa varten.

Menettelyt:

1. Kasettikori(t) otetaan pois prosessorista ja upotetaan valuaseman lämpökonsolin parafiinia sisältävään etummaiseen kammioon. Kasetit voidaan myös siirtää erilliseen parafiinilämmittimeen.

2. Ensimmäinen valettava kasetti otetaan pois lämpökonsolin etummaisesta kammiosta tai parafiinilämmittimestä. Kasetin kansi poistetaan ja hävitetään, ja kasetin etiketistä tarkastetaan, että se vastaa eläimen tietoja, jotta mahdolliset poikkeavuudet voidaan selvittää ennen valamista.

3. Seuraavaksi valitaan sopivankokoinen valumuotti.

4. Muotti laitetaan annostelukonsolin nokan alle ja täytetään sulalla parafiinilla.

5. Näyte otetaan pois kasetista ja laitetaan muotissa olevaan sulaan parafiiniin. Tämä toistetaan 4–8 näytteen kanssa jokaisen parafiinimuotin osalta. Yksittäisen kalan paikka merkitään siten, että ensimmäinen kala asetetaan 180 asteen kulmaan kaloihin 2–4/8 nähden.

6. Muottiin lisätään parafiinia, jotta näytteet peittyvät.

7. Muotti ja kasetin alaosa laitetaan kylmäkonsolin jäähdytyslevylle.

8. Kun parafiini on jähmettynyt, blokki (ts. kudokset ja kasetin alaosan sisältävä kovettunut parafiini) otetaan pois muotista.

Mikrotomia

Tavoite:

Histologisten leikkeiden leikkaaminen ja kiinnittäminen värjäystä varten.

Menettelyt:

1. Mikrotomian aloitusvaihe toteutetaan seuraavasti:

   a. Parafiiniblokki asetetaan mikrotomin istukkaan.

   b. Kun mikrotomin pyörää pyöritetään, istukka liikkuu eteenpäin, ja blokin parafiinipinnan paksut kohdat leikkautuvat pois siihen asti, kunnes leikkuuterä koskettaa valettuja kudoksia.

▼M6

c. Mikrotomin leikepaksuudeksi tulee asettaa 3–5 mikronia. Istukka liikkuu eteenpäin ja blokista leikataan useita leikkeitä, jotta kaikki kudoksen leikatulle pinnalle karkean trimmauksen aikana muodostuneet artefaktit saadaan pois.

d. Blokin voi ottaa pois istukasta ja laittaa leikattu pinta alaspäin jäähän kudoksen pehmentämiseksi.

2. Seuraava mikrotomian vaihe on lopullisten leikkeiden tekeminen ja kudosleikkeiden kiinnittäminen näytelaseille. Nämä toimenpiteet tehdään seuraavasti:

a. Jos blokki on laitettu jäähän, se otetaan siitä pois ja asetetaan mikrotomin tasolle.

b. Leikepaksuudeksi asetetaan 3–5 mikronia, ja istukkaa liikutetaan eteenpäin pyörittämällä mikrotomin pyörää. Blokista leikataan leikkeitä siihen saakka, kunnes saadaan ”kaistale”, joka sisältää vähintään yhden hyväksyttävän leikkeen, sukupuolirauhaset mukaan luettuina. (Tarvittaessa blokin voi ottaa leikkaamisen aikana pois istukasta ja laittaa jäähän kudoksen pehmentämiseksi ja sitten takaisin istukkaan).

c. Tämän jälkeen leikkeet laitetaan kellumaan tasaisesti vesiastiaan veden pinnalle. Tavoitteena on saada vähintään yksi leike, joka on suora ja jonka alapuolella ei ole ilmakuplia.

d. Parhaan leikkeen alle laitetaan näytelasi, ja se nostetaan lasin avulla pois vedestä. Tätä prosessia kutsutaan leikkeen kiinnittämiseksi näytelasille.

e. Yhdestä kalaryhmästä valmistellaan kolme leikettä. Toinen ja kolmas leike otetaan 50 mikronin välein ensimmäisestä leikkeestä. Jos kalojen sukupuolirauhasia ei ole valettu samaan leikkaustasoon, on tehtävä useampia leikkeitä sen varmistamiseksi, että jokaiselta kalalta saadaan vähintään kuusi leikettä sukupuolirauhaset mukaan luettuina.

f. Näytelasiin merkitään merkkauskynällä sen blokin numero, josta leikkeet otettiin lasille.

g. Lasi laitetaan värjäystelineeseen.

h. Blokki otetaan pois istukasta ja laitetaan leikattu pinta alaspäin säilytykseen.

Värjääminen, näytelasien päällystäminen ja merkitseminen

Tavoitteet:

— Leikkeiden värjääminen histopatologista tutkimusta varten

— Pysyvästi kiinnitetyt ja värjätyt kudokset.

— Värjättyjen leikkeiden merkitseminen pysyvästi siten, että niiden täydellinen jäljittäminen on mahdollista.

Menettelyt:

1. Värjäys

a. Lasien annetaan kuivua ilmassa yön yli ennen värjäystä.

b. Leikkeet värjätään hematoksyliini-eosiinivärjäyksellä.

2. Näytelasien päällystäminen

a. Näytelasit voidaan päällystää käsin tai automaattisesti.

b. Lasi upotetaan ksyleeniin tai TissueCleariin, ja ylimääräinen liuos ravistetaan varovasti pois lasilta.

▼**M6**

c. Noin 0,1 ml kiinnitysainetta laitetaan lähelle lasin toista päätä (mattapään vastakkaista päätä) tai päällysteeseen.

d. Päällyste laitetaan lasille matalassa kulmassa.

3. Merkinnät

a. Jokaisen lasin etiketissä on oltava seuraavat tiedot:

i. Laboratorion nimi

ii. Laji

iii. Näytteen numero / lasin numero

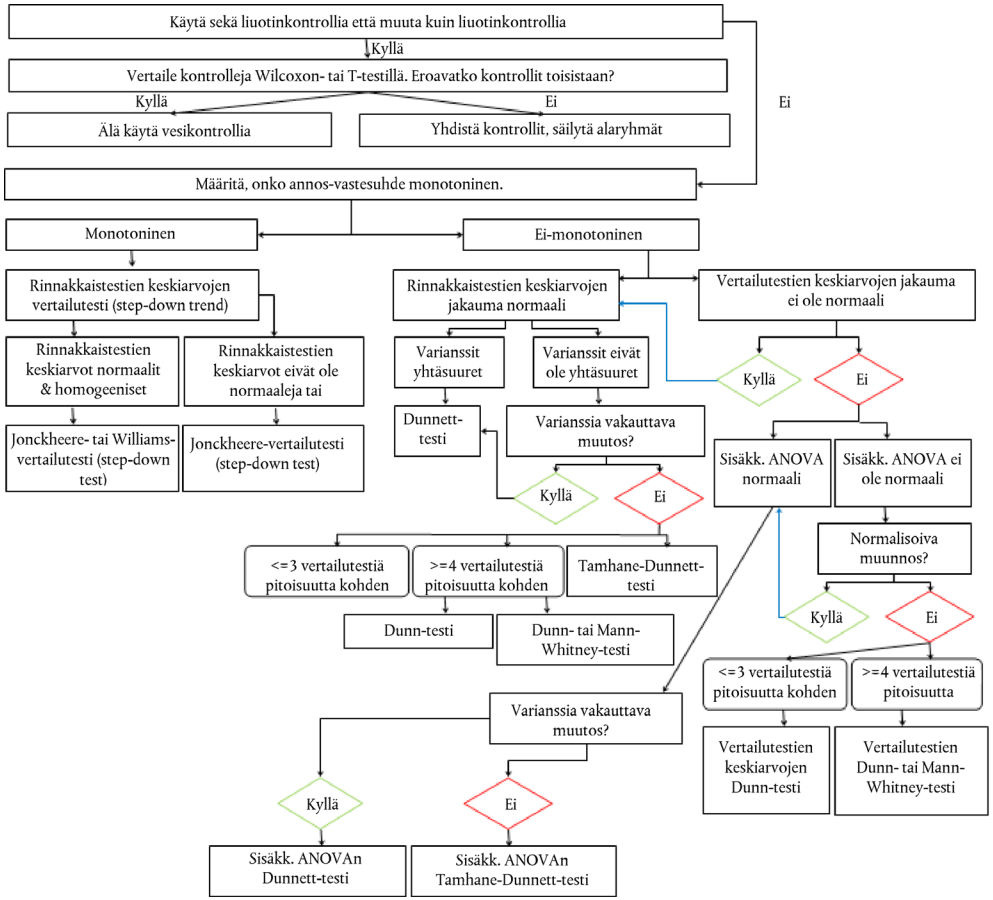
iv. Kemikaali/käsittelyryhmä

v. Päivämäärä

▼M6

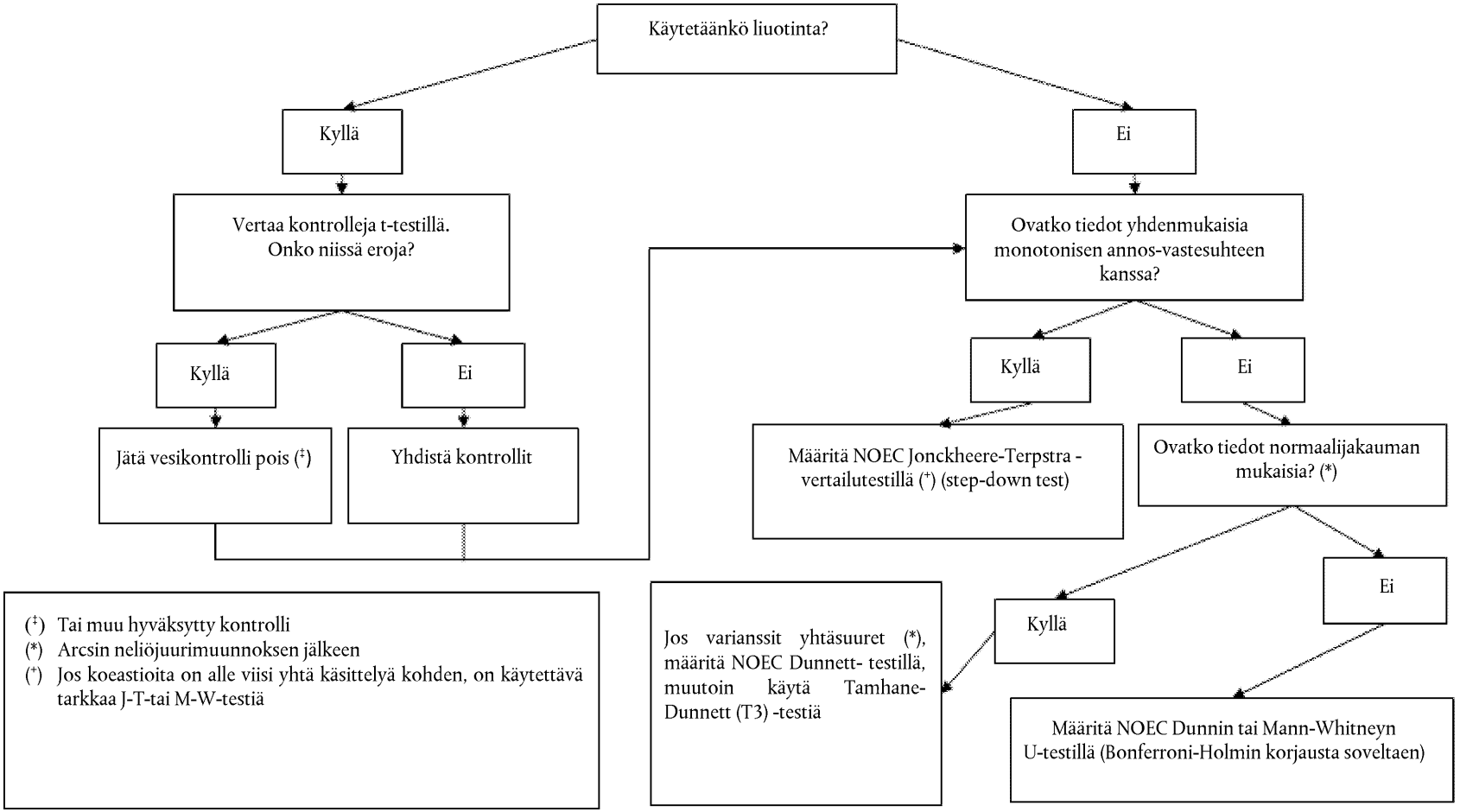
Lisäys 8

Tilastollinen vuokaavio vitellogeniinianalyysia varten



▼M6

Tilastollinen vuokaavio sukupuolijakauman analyysia varten



▼M6

Lisäys 9

Ohjeet kudosnäytteiden ottamiseen geneettisen sukupuolen määrittämistä varten ja pcr-menetelmällä toteutettavaa geneettisen sukupuolen määrittämistä varten

Kudosnäytteiden ottaminen, valmistelu ja säilytys ennen medakan geneettisen sukupuolen määrittämistä PCR-menetelmällä (ohjeet on laatinut Bayer CropScience AG:n vesieliöitä käsittelevä laboratorio)

1. Jokaiselta kalalta leikataan pienillä saksilla perä- tai selkäevä, ja se laitetaan putkeen, joka sisältää 100 µl uuttopuskuria 1 (katso tarkemmat tiedot puskurin valmistamisesta jäljempää). Sakset puhdistetaan jokaisen kalan käsittelyn jälkeen laboratoriolasissa, jossa on tislattua vettä, ja kuivataan paperipyyhkeellä.

2. Seuraavaksi eväkudokset homogenisoidaan mikroputkessa teflonsurvimella, jotta solut hajoavat. Jokaisessa putkessa käytetään uutta survinta mahdollisen kontaminoitumisen välttämiseksi. Survimet laitetaan 0,5 M:n NaOH-liuokseen yöksi, huuhdellaan viisi minuuttia tislatulla vedellä ja säilytetään etanolissa tai steriilisti autoklaavauksen jälkeen seuraavaan käyttökertaan saakka.

3. Eväkudos voidaan säilöä myös ilman uuttopuskuria 1 kuivajäällä ja sen jälkeen – 80 °C:ssa jääkaapissa DNA:n hajoamisen ehkäisemiseksi. Uutto kuitenkin sujuu paremmin, jos uutat DNA:n samaan aikaan (katso tiedot käsittelystä edeltä; näytteet on sulatettava jään päällä sen jälkeen, kun niitä on säilytetty – 80 °C:ssa, ennen kuin puskuri lisätään putkiin).

4. Homogenisoinnin jälkeen kaikki putket laitetaan vesiastiaan ja niitä keitetään 15 minuutin ajan 100 °C:ssa.

5. Tämän jälkeen jokaiseen putkeen pipetoidaan 100 µl uuttopuskuriliuosta 2 (katso tarkemmat tiedot puskurin valmistuksesta jäljempää). Näytteitä säilytetään huoneenlämmössä 15 minuutin ajan, ja silloin tällöin niitä ravistetaan varovasti käsin.

6. Tämän jälkeen kaikki putket laitetaan takaisin vesiastiaan ja niitä keitetään toiset 15 minuuttia 100 °C:ssa.

7. Putket pidetään jäädytettyinä – 20 °C:ssa analysointiin saakka.

Puskurin valmistus

PCR-puskuri 1:n ainesosat

500 mg N-lauryylisarkosiinia (valmistaja esimerkiksi Merck KGaA, Darmstadt, Saksa)

2 ml 5 M NaCl:ää

Lisää 100 ml tisl. vettä

→ Autoklaavi

PCR-puskuri 2:n aineosat:

20 g Chelex (valmistaja esimerkiksi Biorad, München, Saksa)

Anna turvota 100 ml:ssä tislattua vettä

→ Autoklaavi

Medakan geneettisen sukupuolen määrittäminen (PCR-menetelmällä) (menetelmä on laadittu Bayer CropScience AG:n vesieliöitä käsittelevässä laboratoriossa ja Würzburgin yliopiston biokeskuksessa)

Valmistellut ja jäädytetyt putket (kuvattu edellisessä kohdassa) sulatetaan. Sen jälkeen ne sentrifugoidaan Eppendorfin sentrifugissa (30 sekuntia enimmäisnopeudella huoneenlämmössä). PCR-menetelmässä käytetään sakasta erotettua kirkasta supernatanttia. Chelexin jäämien (joita on sakassa) siirtymistä PCR-reaktioon on ehdottomasti vältettävä, koska se häiritsee Taq-polymeraasin toimintaa. Supernatantti käytetään heti, mutta sitä voidaan myös säilyttää jäädytettynä (– 20 °C:ssa) ja sulattaa uudelleen useita kertoja ilman, että se vaikuttaisi kielteisesti DNA:han myöhemmissä analyyseissa.

▼**M6**

1. *Reaktioseoksen valmistus (25 µl näytettä kohti):*

	Tilavuus	Lopullinen pitoisuus
Templaatti-DNA	0,5–2 µl	
10 × PCR-puskuri + MgCl2	2,5 µl	1x
Nukleotidit (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Etualuke (10 µM) (ks. kohdat 3–5)	0,5 µl	200 nM
Taka-aluke (10 µM) (ks. kohdat 3–5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Vesi (PCR-laatu)	enintään 25 µl	
Taq E -polymeraasi	0,3 µl	1,5 U
10 × PCR-puskuri + $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 lämpötilassa 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM MgCl2, 0,1 % Tween 20		

Jokaisessa PCR:ssä (katso kohdat 3–5 jäljempänä) tarvitaan erikoisaluke uutena yhdistelmänä reaktioseoksesta ja tarvittavasta määrästä templaatti-DNA:ta jokaista näytettä (ks. edellä) varten. Nämä määrät siirretään uusiin putkiin pipeteillä. Sen jälkeen kaikki putket suljetaan ja niitä sekoitetaan (n. 10 sekuntia) ja sentrifugoidaan (10 sekuntia huoneenlämmössä). Tämän jälkeen voidaan käynnistää PCR-ohjelmat. Jokaisessa PCR-ohjelmassa käytetään lisäksi positiivista kontrollia (esimerkinomaista DNA-näytettä, jonka aktiivisuus tiedetään ja jota koskevat tulokset ovat selvät) ja negatiivista kontrollia (1 µl tislattua vettä).

2. *Agaroosigeelin (1 %) valmistaminen käynnissä olevien PCR-ohjelmien aikana:*

— Liuota 3 g agaroosia 300 ml:aan 1 × TAE-puskuria (1 %:n agaroosigeeli).

— Kuumenna liuos mikroaaltouunissa (n. 2–3 min).

— Siirrä kuuma liuos jään päällä olevaan erikoisvalulaatikkoon.

— Agaroosigeeli on valmista käytettäväksi noin 20 minuutin kuluttua.

— Säilytä agaroosigeeli 1 × TAE-puskurissa PCR-ohjelmien päättymiseen saakka.

3. *Aktiini-PCR-ohjelma:*

Tämän PCR-reaktion tarkoituksena on osoittaa, ettei näytteessä oleva DNA ole vaurioitunut.

— Erikoisaluke:

”Mact1(upper/forward)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

”Mact2(lower/reverse)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Ohjelma:

5 min 95 °C

Sykli (35-kertainen):

Denaturaatio → 45 sek., 95 °C

Jäähdytys → 45 sek., 56 °C

Pidentäminen → 1 min, 68 °C

15 min, 68 °C

▼**M6**

4. *X- ja Y-geeni-PCR-ohjelma:*

Näytteitä, joissa DNA on ehjä, käytetään tässä PCR-ohjelmassa X- ja Y-geenien löytämiseen. Koiraan DNA:ssa tulee näkyä yksi kaksoisnauha ja naaraan DNA:ssa yksi yksinkertainen nauha (värjäyksen ja geelielektroforeesin jälkeen). Tässä ohjelmassa on käytettävä yhtä positiivista kontrollia koiraille (XY-näyte) ja yhtä naaraille (XX-näyte).

— Erikoisaluke:

”PG 17.5” (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

”PG 17.6” (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Ohjelma:

5 min 95 °C

Sykli (40-kertainen):

Denaturaatio	→ 45 sek., 95 °C
Jäähdytys	→ 45 sek., 55 °C
Pidentäminen	→ 1 min 30 sek., 68 °C

15 min, 68 °C

5. *Y-geeni-PCR-ohjelma X- ja Y-geeni-PCR-ohjelman kontrollina:*

Tällä PCR-ohjelmalla vahvistetaan X- ja Y-geeni-PCR-ohjelman tulokset. Koirasnäytteissä tulee näkyä yksi nauha, ja naarasnäytteissä ei tule näkyä yhtään nauhaa (värjäyksen ja geelielektroforeesin jälkeen).

— Erikoisaluke:

”DMTYa (upper/forward)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

”DMTYd (lower/reverse)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Ohjelma:

5 min 95 °C

Sykli (40-kertainen):

Denaturaatio	→ 45 sek., 95 °C
Jäähdytys	→ 45 sek., 56 °C
Pidentäminen	→ 1 min, 68 °C

15 min, 68 °C

6. *PCR-näytteiden värjääminen:*

Värjäysliuos:

50 % glyserolia

100 mM EDTA:ta

1 % SDS:ää

0,25 % bromfenolisinistä

0,25 % ksyleenisyanolia

Pipetoi 1 µl värjäysliuosta jokaiseen yksittäiseen putkeen.

7. *Geelielektroforeesin aloittaminen:*

— Valmistettu 1-prosenttinen agaroosigeeli siirretään geelielektroforeesikammioon, joka on täytetty 1 × TAE-puskurilla.

— Jokaisesta värjätystä PCR-näytteestä pipetoidaan 10–15 µl agaroosigeelikuoppaan.

— Erilliseen kuoppaan pipetoidaan myös 5–15 µl 1kb-Ladder-valmistetta (Invitrogen).

— Aloita elektroforeesi 200 V:lla.

— Lopeta se 30–45 minuutin kuluttua.

▼**M6**

8. *Nauhojen määrittäminen*

— Puhdista agaroosigeeli tislatulla vedellä.

— Laita agaroosigeeli etidiumbromidiin 15–30 minuutin ajaksi.

— Ota agaroosigeelistä sen jälkeen kuva UV-valolaatikossa.

— Lopuksi näytteet analysoidaan vertaamalla niitä positiivisen kontrollin nauhaan (tai nauhoihin) ja kokostandardiin.

▼M6

Lisäys 10

Ohjeet kudosnäytteiden ottamiseen kolmipiikiltä (geneettisen sukupuolen määrittäminen PCR-menetelmällä)

Kudosnäytteiden ottaminen ja DNA:n uuttaminen

DNA voidaan uuttaa monilla kaupallisesti saatavilla reagensseilla ja sekä manuaalisilla että automaattisilla uuttojärjestelmillä. Cefasin laboratoriossa Weymouthissa käytettävä menetelmä kuvataan jäljempänä, ja myös vaihtoehtoisia toimintatapoja on esitetty tarpeen mukaan.

1. Jokaiselta kalalta leikataan terävillä saksilla pieni pala kudosta (10–20 mg) dorsolateraaliselta alueelta (sen jälkeen, kun pää ja pyrstö on irrotettu vitellogeniinianalyysia varten). Kudospala laitetaan putkeen, joka joko asetetaan suoraan nestemäiseen typpeen (säilytettäväksi – 80 °C:ssa) tai siihen lisätään 70-prosenttista etanolia (kuljetusta ja myöhempää säilytystä -4 °C:ssa varten). Sakset puhdistetaan jokaisen kalan käsittelyn jälkeen 70-prosenttisella etanolilla ja tislatulla vedellä ja kuivataan paperipyyhkeellä.

2. Mahdolliset etanolijäämät poistetaan imulla, ja kudos hajotetaan yön yli kestävällä proteinaasi K -käsittelyllä 400 µl:ssa ATL-puskuria (Qiagen). Alikvootti (200 µl) kudosjätteestä siirretään 96-kuoppaiseen S-blokkiin (Qiagen), ja DNA uutetaan 96-kuoppaiseen formaattiin käyttämällä Qiagen Universal BioRobotia ja QIamp Investigator BioRobot -menetelmää. DNA eluoidaan 50 µl:ssä vettä, jossa ei ole deoksiribonukleaasia eikä ribonukleaasia. Jos DNA:n uuttamisessa käytetään kovaa kudosta (kuten selkärankaa tai rintaevää), näyte voi olla tarpeen homogenisoida lyysipuskurissa käyttämällä FastPrep®-laitetta tai muuta vastaavaa kudoksen hajottamismenetelmää.

   Vaihtoehtoisesti voidaan toimia myös seuraavilla tavoilla:

   a) Kudos hajotetaan yön yli kestävällä proteinaasi K -käsittelyllä 400 µl:ssä G2-lyysipuskuria (Qiagen), ja DNA uutetaan 200 µl:sta kudosjätettä käyttämällä joko EZ 1 DNA Easy Tissue Kit -pakettia ja EZ 1 -biorobottia tai DNA Easy Tissue Mini Kit -pakettia. DNA eluoidaan 50 µl:n tilavuuteen.

   b) Kudokset käsitellään DNAzol-reagenssilla. Kudosnäytteet hajotetaan pitämällä niitä 1 ml:ssa DNAzolia 10 minuutin ajan 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkessa, minkä jälkeen niitä sentrifugoidaan (13 000 kierrosta minuutissa) viiden minuutin ajan hiukkasaineksen poistamiseksi. Näin hajotettu näyte laitetaan sen jälkeen uuteen 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen, joka sisältää 500 µl molekyylibiologisesti puhdasta 100-prosenttista etanolia. Putkea sentrifugoidaan 13 000 kierroksen nopeudella 10 minuutin ajan DNA:n saostamiseksi. Etanoli poistetaan ja sen tilalle laitetaan 400 µl molekyylibiologisesti puhdasta 70-prosenttista etanolia. Tämän jälkeen putkea sentrifugoidaan taas 13 000 kierroksen nopeudella viiden minuutin ajan, ja DNA-pelletti liuotetaan 50 µl:aan puhdasta vettä, jossa ei ole deoksiribonukleaasia eikä ribonukleaasia. Jos käytetään kovia kudoksia (rintaevää), näyte voi tässäkin olla tarpeen homogenisoida lyysipuskurissa käyttämällä FastPrep®-laitetta tai muuta vastaavaa kudoksen hajottamismenetelmää ennen DNA:n uuttamista.

3. DNA:ta säilytetään -20 °C:ssa käyttöön saakka.

Tärkeä huomautus: Näiden käsittelyjen aikana on käytettävä suojakäsineitä.

Polymeraasiketjureaktion (PCR:n) analyysi

Monistukset tehtiin käyttämällä 2,5 µl DNA-uutetta 50 µl:ssa reaktiotilavuutta Idh-paikka-alukkeiden avulla (ks. tarkempi kuvaus julkaisusta Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416–1424):

Etualuke	5′ GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3′
Taka-aluke	5′ TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3′

▼**M6**

Sopivien PCR-reagenssien toimittajia on useita. Jäljempänä kuvattua menetelmää käytetään tällä hetkellä Cefasin laboratoriossa Weymouthissa.

1. *Reaktioseoksen valmistus (50 µl näytettä kohti):*

Master mix -reaktioseos valmistetaan jäljempänä kuvatulla tavalla. Seos voidaan valmistaa etukäteen ja säilyttää käyttöön saakka jäädytettynä – 20 °C:ssa. Valmista master mix -seosta tarpeeksi myös negatiivista kontrollia varten (vain molekyylibiologisesti puhdas vesi).

	Tilavuus (varastopit.) / näyte	Lopullinen pitoisuus
5 × GoTaq®-reaktiopuskuri	10 µl	1x
$MgCl_2$	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotidit (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM kutakin)	250 µM kutakin
Etualuke	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Taka-aluke	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Molekyylibiologisesti puhdas vesi	30,75 µl	
GoTaq-polymeraasi	0,25 µl	1,25 U

— Laita 47,5 µl liuosta ohutseinäiseen 0,5 ml:n PCR-putkeen, jossa on etiketti.

— Lisää 2,5 µl puhdistettua DNA:ta asianmukaisesti merkittyyn putkeen. Toista menettely kaikkien näytteiden ja negatiivisen kontrollin osalta.

— Lisää putkiin kaksi tippaa mineraaliöljyä. Vaihtoehtoisesti voit käyttää PCR-laitetta, jossa on lämpökansi.

— Sulje kannet.

— Näytteitä denaturoitiin Peltier PTC-225 -laitteessa 94 ± 2 °C:n lämpötilassa viisi minuuttia, sen jälkeen 39 sykliä 94 ± 2 °C:ssa 1 minuutti, 55 ± 2 °C:ssa 1 minuutti, 72 ± 2 °C:ssa 1 minuutti ja lopullinen pidentäminen 72 ± 2 °C:ssa 10 minuutin ajan.

2. *Agaroosigeelin (2 %) valmistaminen:*

Tavallisesti PCR-tuotteet analysoidaan 20-prosenttisessa agaroosigeelissä, joka sisältää etidiumbromidia.

Myös kapillaaripohjaista elektroforeesijärjestelmää voi käyttää.

— Mittaa 2 g agaroosia 100 ml:aan 1 × TAE-puskuria.

— Kuumenna liuos mikroaaltouunissa (n. 2–3 min), jotta agaroosi liukenee.

— Lisää kaksi tippaa etidiumbromidia (lopullinen pitoisuus 0,5 µg/ml).

— Siirrä kuuma liuos geelivalulaitteeseen.

— Anna geelin kovettua.

3. *Geelielektroforeesi*

— Laita agaroosigeeli elektroforeesilaitteeseen ja upota se 1 × TAE-puskuriin.

— Laita 20 µl jokaisesta näytteestä erilliseen kuoppaan ja lisää molekyylipainomarkkeria (100 emäsparin DNA-kokostandardi, Promega) tyhjään kuoppaan.

— Elektroforeesi tehdään 120 V:lla ja se kestää 30–45 minuuttia.

▼**M6**

4. *Monistustuotteiden visualisointi*

Jos agaroosigeeliin lisättiin etidiumbromidia edellä kuvatun mukaisesti, DNA-tuotteet näkyvät UV-valon avulla. Toinen tapa värjätä agaroosigeeli on peittää geeli laimennetulla etidiumbromidiliuoksella (0,5 μg/ml vedessä) 30 minuutin ajaksi ennen visualisointia.

▼M6

Lisäys 11

Ohjeet kolmipiikin keinohedelmöitysmenettelyä varten

Tässä kohdassa kuvataan menetelmät, joiden avulla kolmipiikiltä saadaan hedelmöityneitä munasoluja, jotta niitä voidaan käyttää FSDT-tutkimuksessa.

Menettelyt

Maidin ottaminen koirailta

1. Hyvänvärinen koiras toivotusta populaatiosta lopetetaan.

2. Kivekset irrotetaan kalan kummaltakin puolelta. Kivekset ovat yleensä voimakkaasti pigmentoituneita sauvan muotoisia rakenteita, jotka näkyvät selvästi ruumiin sivuittaisella keskiviivalla. Käytä jompaakumpaa seuraavista menetelmistä:

3. Käytä teräviä saksia. Aloita yhteissuolen kohdalta ja tee 1–1,5 cm:n pituinen viilto yhdellä leikkauksella noin 45 asteen kulmassa.

4. Tee skalpellilla pieni viilto kalan kylkeen hieman lantion takapuolelta ja juuri ennen kylkipanssareita.

5. Irrota kivekset pienillä pinseteillä ja laita ne petrimaljaan.

6. Jokainen kives peitetään 100 µl:lla tuoretta **lopullista HBSS-liuosta** (*).

7. Kivekset leikataan pieniksi paloiksi käyttämällä partaterää tai skalpellia. Näin maiti pääsee kiveksistä ulos, ja HBSS-liuos muuttuu maitomaiseksi.

8. Maitia sisältävä neste laitetaan putkeen, ja pipetoitaessa on yritettävä välttää kiveskudoksen joutumista mukaan.

9. Putkeen lisätään 800 µl lopullista HBSS-liuosta, joka sekoitetaan hyvin.

10. Tarvittaessa koiraskalan voi säilöä kiinnittämällä se 100-prosenttisella etanolilla tai muulla halutulla kiinnitysaineella. Tämä on tärkeää etenkin silloin, jos tutkimuksessa tarkastellaan jälkeläisten alkuperää.

Tärkeä huomautus: vaikka useimmat tarvittavat varastoliuokset voidaan tehdä etukäteen, **varastoliuos 5** ja **lopullinen liuos** on valmistettava **tuoreena** sinä päivänä, kun ne käytetään.

Varastoliuos 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Tislattu vesi (TV)	100 ml
Varastoliuos 2	
Na_2HPO_4 (vedetön)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
TV	100 ml
Varastoliuos 3	
$CaCl_2$	0,72 g
TV	50 ml

(*) Hank's Buffered Salt Solution (Hankin puskuroitu suolaliuos, HBSS):

HBSS:ää tarvitaan maidin säilömiseen hedelmöitystä valmisteltaessa.

▼**M6**

Varastoliuos 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
TV	50 ml

Varastoliuos 5 (tuore)

$NaHCO_3$	0,35 g
TV	10 ml

Huomautus: Jos sinulla on jo joitakin edellä mainituista suoloista mutta jos niiden vesipitoisuus on eri (esimerkiksi $2H_2O$ vedettömän sijasta), voit käyttää niitä, kunhan mukautat ensin painon molekyylipainon perusteella.

Noudata Hankin lopullisen liuoksen osalta seuraavaa järjestystä:

Varastoliuos 1	1,0 ml
Varastoliuos 2	0,1 ml
Varastoliuos 3	0,1 ml
TV	8,6 ml
Varastoliuos 4	0,1 ml
Varastoliuos 5	0,1 ml

Sekoita hyvin ennen käyttöä.

Hedelmöitys

1. Halutusta populaatiosta valitaan suuria, kutevia naaraita. Niistä voi ottaa mätiä vasta, kun näet, että yhteissuolesta työntyy ulos mätimunia. Valmiit naaraat tunnistaa siitä, että ne uivat pää ylöspäin.

2. Painele kalaa varovasti sormella tai peukalolla kyljestä pyrstöä kohti, jotta se laskee munapussin puhtaaseen petrimaljaan. Toista menettely kalan toiselle kyljelle ja laita kala takaisin omaan säiliöönsä.

3. Munat voidaan levittää (yhteen kerrokseen) käyttämällä hienoharjaksista sivellintä. On tärkeää, että mahdollisimman paljon munia altistuu maidille. Tässä auttaa munien levittäminen mahdollisimman suurelle alalle. Tärkeä huomautus: Pidä munat kosteina peittämällä ne kauttaaltaan kostealla liinalla (on tärkeää, etteivät munat kosketa suoraan veteen, koska se voi kovettaa suonikalvon ennenaikaisesti, jolloin hedelmöityminen estyy). Se, miten paljon munia kukin naaras voi tuottaa, vaihtelee suuresti, mutta yhdeltä kutevalta naaraalta pitäisi saada helposti keskimäärin 150 munaa.

4. Munien pinnalle levitetään siveltimellä tasaisesti 25µl Hankin seoksessa olevaa maitia. Kun hedelmöittyminen on alkanut, munat kovettuvat nopeasti ja muuttavat väriään (minuutin kuluessa). Jos munien arvioitu määrä on yli 150, toista menettely. Jos munat eivät kovetu minuutissa, lisää maitia hieman. Tärkeä huomautus: jos maitia lisätään paljon, se ei välttämättä paranna hedelmöittymisastetta.

5. Munien ja maitinesteen on annettava olla ”vuorovaikutuksessa” vähintään 15 minuuttia, ja hedelmöityneet munat on asetettava altistusakvaarioihin 1,5 tunnin kuluessa hedelmöittymisen jälkeen.

6. Menettely toistetaan käyttämällä toista naarasta, kunnes haluttu määrä munia on saatu.

7. Säästä muutama muna viimeisestä erästä ja kiinnitä ne 10-prosenttiseen etikkahappoon.

▼M6

Munien laskeminen ja jakaminen testausakvaarioihin

1. Munat tulee jakaa tasaisesti jokaiseen käsittelytasoon geneettisten poikkeamien välttämiseksi. Jokainen erä hedelmöityneitä munia on eroteltava yhtä suuriin ryhmiin (joita on yhtä monta kuin käsittelytasoja) käyttämällä tylppäkärkistä instrumenttia (esimerkiksi leveäteräisiä hyönteispinsettejä tai rengaspäistä inokulointi-instrumenttia). Jos tarvitset neljä rinnakkaisnäytettä käsittelyä kohti ja jos jokaisessa käsittelyssä on 20 munaa, yhteen altistusakvaarioon on siis jaettava 80 munaa. Tärkeä huomautus: munia kannattaa lisätä 20 prosenttia enemmän (ts. 96 munaa käsittelytasoa kohti), kunnes olet varma, että hedelmöitysaste on 100 prosenttia.

2. Kolmipiikin munat ovat hyvin herkkiä sieni-infektioille koiraskalan vartioiman pesän ulkopuolella. Tämän vuoksi on erittäin tärkeää, että kaikki munat käsitellään metyleenisinellä testin viiden ensimmäisen päivän aikana. Metyleenisinestä valmistetaan varastoliuos, jonka vahvuus on 1 mg/ml, ja se lisätään altistusakvaarioihin, jolloin lopullinen enimmäispitoisuus on 2,125 mg/l. Tärkeä huomautus: kolmipiikit eivät saa altistua metyleenisinelle kuoriutumisen jälkeen, eikä järjestelmässä saa olla metyleenisineä päivästä 6 alkaen.

3. Munat tutkitaan päivittäin, ja kaikki kuolleet tai hedelmöittymättömät munat kirjataan muistiin. Tärkeä huomautus: ennen kuoriutumista munia ei saa ottaa pois vedestä edes lyhyeksi aikaa.

▼M6

C.42. BIOHAJOAVUUS MERIVEDESSÄ

YLEISJOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 306 (1992). Kun alkuperäisiä testimenetelmiä laadittiin, ei tiedetty, miten nopeaa biohajoavuutta koskevien seulontatutkimusten, joissa siirrosaineen lähteinä käytettiin makeaa vettä sekä jätevettä tai aktiivilietettä, tuloksia voitaisiin soveltaa meriympäristöön. Vaihtelevia tuloksia on raportoitu (esimerkiksi (1)).

2. Monet teollisuuden jätevedet, jotka sisältävät erilaisia kemikaaleja, päätyvät mereen joko suorina päästöinä tai suistoalueilta tai joista, joissa viipymisajat ovat lyhyitä verrattuna siihen aikaan, jota monien kemikaalien täydellinen biohajoaminen edellyttää. Koska tietoisuus tarpeesta suojella meriympäristöä alati kasvavalta kemikaalikuormitukselta ja tarpeesta arvioida merien todennäköinen kemikaalipitoisuus lisääntyy, on kehitetty testimenetelmiä, joilla tutkitaan biohajoavuutta merivedessä.

3. Tässä luvussa kuvatuissa menetelmissä käytetään luonnollista merivettä sekä vesifaasina että mikro-organismien lähteenä. Koska tavoitteena oli, että menetelmät olisivat yhdenmukaisia nopeaa biohajoavuutta makeassa vedessä koskevien menetelmien kanssa, tutkittiin ultrasuodatetun ja sentrifugoidun meriveden sekä merisedimenttien käyttöä siirrosaineen lähteenä. Nämä tutkimukset eivät kuitenkaan onnistuneet. Sen vuoksi testiaineena käytetään luonnollista merivettä, joka on esikäsitelty suurhiukkasten poistamiseksi.

4. Jotta lopullista biohajoavuutta voidaan arvioida ravistuspullomenetelmällä, testiainetta on käytettävä melko suurina pitoisuuksina, koska liuennutta orgaanista hiiltä (DOC) koskevan analyysimenetelmän herkkyys on vähäinen. Tämän vuoksi meriveteen on lisättävä mineraaliravinteita (N ja P), joiden pienet pitoisuudet rajoittaisivat muutoin liuenneen orgaanisen hiilen poistumista. Myös suljetun pullon menetelmässä veteen on lisättävä ravinteita lisätyn testiaineen pitoisuuden vuoksi.

5. Näin ollen menetelmillä ei voida testata nopeaa biohajoavuutta, koska meriveteen ei lisätä siirrosainetta siinä jo olevien mikro-organismien lisäksi. Testeillä ei myöskään simuloida meriympäristöä, koska veteen lisätään ravinteita ja koska testiaineen pitoisuus on hyvin paljon suurempi kuin se olisi meressä. Näistä syistä menetelmien kuvaamiseksi ehdotetaan uutta alakohtaa ”Biohajoavuus merivedessä”.

SOVELTAMINEN

6. Niiden testien, joita sovelletaan, kun tutkittavan aineen käyttötavat ja hävittäminen osoittavat sitä joutuvan mereen, tuloksista saadaan alustavaa tietoa aineen biohajoavuudesta merivedessä. Jos tulos on positiivinen (liuenneen orgaanisen hiilen poistuminen >70 %; teoreettinen hapenkulutus ThOD >60 %), voidaan päätellä, että biohajoaminen meriympäristössä on mahdollista. Negatiivinen tulos ei kuitenkaan tarkoita, että tämä mahdollisuus olisi poissuljettu, vaan se osoittaa, että tarvitaan lisätutkimuksia, joissa esimerkiksi käytetään testiaineesta mahdollisimman pientä pitoisuutta.

▼M6

7. Jos biohajoavuusasteesta merivedessä tietyssä paikassa tarvitaan jommassakummassa tapauksessa kuitenkin tarkempi arvo, on sovellettava monimutkaisempia ja kehittyneempiä ja siksi myös kalliimpia menetelmiä. Esimerkiksi voidaan soveltaa simulaatiotestiä, jossa testiaineesta käytetään todennäköistä ympäristöpitoisuutta lähempänä olevaa pitoisuutta. Myös tietystä paikasta otettua rikastamatonta esikäsittelemätöntä merivettä voidaan käyttää, ja primaarinen biohajoavuus voidaan määrittää tietyllä kemiallisella analyysilla. Lopullisen biohajoavuuden määrittämisessä ^{14}C-leimatut aineet ovat tarpeen, jotta voidaan mitata liukenevan orgaanisen ^{14}C:n häviämisnopeus ja $^{14}CO_2$:n tuotanto ympäristön kannalta realistisina pitoisuuksina.

MENETELMIEN VALINTA

8. Käytettävän menetelmän valinta määräytyy useiden tekijöiden perusteella. Seuraava taulukko on tarkoitettu avuksi menetelmän valintaan. Koska aineita, joiden vesiliukoisuus on vähemmän kuin noin 5 mg C/l, ei voida testata ravistuspullomenetelmällä, ainakin huonosti liukenevia aineita voidaan periaatteessa testata suljetun pullon menetelmällä.

Taulukko

Ravistuspullo- ja suljettu pullo -testin edut ja haitat

III MENETELMÄ	EDUKSI KATSOTTAVAT OMINAISUUDET	HAITAT
RAVISTUS-PULLO	— yksinkertainen laitteisto hiilianalysaattoria lukuun ottamatta — 60 päivän kesto ei ongelmallinen — ei häiriötä nitrifikaatiosta — voidaan mukauttaa haihtuville aineille	— tarvitaan hiilianalysaattori — käyttää 5–40 mg liuennutta orgaanista hiiltä litrassa, mahdollinen inhibitiovaikutus — liuenneen orgaanisen hiilen määrittäminen vaikeaa, kun pitoisuudet merivedessä ovat pienet (kloridivaikutus) — liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus joskus suurempi merivedessä.
SULJETTU PULLO	— yksinkertainen laitteisto — yksinkertainen loppumääritys — käyttää testiaineesta pieniä pitoisuuksia (2 mg/l), jolloin inhibition mahdollisuus on pienempi — helposti mukautettavissa haihtuville aineille	— pullojen ilmatiiviyden säilyttäminen voi olla hankalaa — seinämien bakteerikasvu voi johtaa vääriin arvoihin — puhtaan O_2:n kertymäarvot voivat olla suuret etenkin 28 päivän kuluttua; mahdollisesti ratkaistavissa merivettä vanhentamalla — mahdollinen häiriö nitrifikaation aiheuttamasta O_2-kertymästä.

RAVISTUSPULLOMENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä menetelmä on merivedelle tarkoitettu muunnos OECD:n muokatusta seulontatestistä, joka on kuvattu tämän liitteen luvussa C.4B (2). Se viimeisteltiin rengastestissä, jonka tanskalainen vedenlaatua tutkiva laitos järjesti Euroopan komission puolesta (3).

2. Kuten merivedellä tehtävässä suljettu pullo -menetelmässä, myöskään tämän testin tuloksia ei tule pitää merkkeinä nopeasta biohajoavuudesta, vaan niitä on käytettävä pikemminkin keinona hankkia tietoa aineiden biohajoavuudesta meriympäristössä.

▼M6

MENETELMÄN PERIAATE

3. Ennalta määritetty määrä testiainetta liuotetaan testiväliaineeseen siten, että liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuudeksi saadaan 540 mg. Jos orgaanisen hiilen analyysien herkkyysrajat paranevat, testiaineen käyttämisestä pienempinä pitoisuuksina voi olla hyötyä etenkin sellaisten aineiden kannalta, joilla on inhiboivia ominaisuuksia. Testiväliaineessa olevaa testiaineliuosta inkuboidaan hämmentämällä pimeässä tai hajavalossa aerobisissa olosuhteissa kiinteässä lämpötilassa (vaihteluväli ± 2 °C), joka on yleensä 15–20 °C. Kun tutkimuksen tavoitteena on simuloida ympäristötilanteita, testit voidaan tehdä tämän normaalin lämpötila-alueen ulkopuolellakin. Testin suositeltu enimmäiskesto on noin 60 päivää. Hajoamista arvioidaan mittaamalla liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus (lopullinen hajoaminen) ja joissakin tapauksissa tekemällä ominaisanalyysi (primaarinen hajoaminen).

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

4. Jotta tiedetään, voidaanko testiä soveltaa tiettyyn aineeseen, sen joidenkin ominaisuuksien on oltava tiedossa. Aineen orgaanisen hiilen pitoisuus on määritettävä, ja sen haihtuvuuden on oltava sellainen, ettei merkittävää häviötä tapahdu testin aikana. Lisäksi sen vesiliukoisuuden on oltava suurempi kuin 2 540 mg C/l. Testiaine ei saa myöskään imeytyä lasipintoihin merkittävästi. Tiedot testiaineen tärkeimpien ainesosien puhtaudesta tai niiden suhteellisista osuuksista ovat tarpeen, jotta saatuja tuloksia voidaan tulkita, etenkin jos tulos on lähellä hyväksyttävää raja-arvoa.

5. Tieto testiaineen myrkyllisyydestä bakteereille, esimerkiksi mitattuna lyhytaikaisissa soluhengitystesteissä (4), voi olla hyödyllinen asianmukaisia testipitoisuuksia valittaessa, ja se voi olla olennainen pienten biohajoavuusarvojen oikean tulkinnan kannalta. Nämä tiedot eivät kuitenkaan aina riitä biohajoavuustesteistä saatujen tulosten tulkintaan, ja 18 kohdassa kuvattu menettely voi olla sopivampi.

VERTAILUAINEET

6. Sopivia vertailuaineita on käytettävä, jotta merivesinäytteen mikrobien toiminta voidaan tarkistaa. Esimerkkejä tähän tarkoitukseen sopivista aineista ovat natriumbentsoaatti, natriumasetaatti ja aniliini. Vertailuaineiden tulee hajota suhteellisen lyhyen ajan kuluessa; muutoin on suositeltavaa toistaa testi käyttämällä toista merivesinäytettä.

7. Euroopan komission rengastestissä, jossa merivesinäytteitä otettiin eri paikoista ja eri aikoina vuodesta (3), natriumbentsoaatin osalta lag-vaihe (t_L) oli 1–4 päivää ja 50 prosentin biohajoamisen saavuttamiseen tarvittu aika (t_{50}), lag-vaihe pois lukien, oli 1–7 päivää. Aniliinin osalta t_L vaihteli välillä 0–10 päivää, kun taas t_{50} vaihteli välillä 1–10 päivää.

MENETELMÄN TOISTETTAVUUS JA HERKKYYS

8. Menetelmän toistettavuus todettiin rengastestissä (3). Testiaineen pienin pitoisuus, jota varten tätä menetelmää voidaan käyttää DOC-analyysin kanssa, määräytyy pitkälti orgaanisen hiilen analyysissa mahdollisen havaitsemisrajan (tällä hetkellä noin 0,5 mg C/l) sekä käytetyssä merivedessä olevan liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuuden (avomereltä otetussa vedessä yleensä suunnilleen 35 mg/l) perusteella. Liuenneen orgaanisen hiilen taustapitoisuus saisi olla enintään 20 prosenttia liuenneen orgaanisen hiilen kokonaispitoisuudesta

▼M6

testiaineen lisäämisen jälkeen. Jos tämä ei ole mahdollista, liuenneen orgaanisen hiilen taustapitoisuutta voi joskus pienentää vanhentamalla merivettä ennen testausta. Jos menetelmää käytetään ainoastaan tietyn kemiallisen analyysin kanssa (jolla mitataan primaarinen hajoaminen), tutkijan on dokumentoitava (lisätietoja antamalla), onko lopullinen hajoaminen odotettavissa. Nämä lisätiedot voivat koostua muista nopeaa tai luontaista biohajoavuutta koskevista testeistä saaduista tuloksista.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

9. Tavallinen laboratoriolaite ja lisäksi:

   a. ravistuskone, johon mahtuu 0,52 litran Erlenmeyer-pulloja ja jossa on joko automaattinen lämpötilansäätö tai jota käytetään huoneessa, jonka vakiolämpötila on 15–20 °C (vaihteluväli ± 2 °C)

   b. kapeakaulaisia 0,52 litran Erlenmeyer-pulloja

   c. kalvosuodatin tai sentrifugi

   d. kalvosuodattimia (0,2-0–0,45 μm)

   e. hiilianalysaattori

   f. ominaisanalyysia varten tarvittava laitteisto (valinnainen).

Merivesi

10. Kerää merivesinäyte huolellisesti puhdistettuun säiliöön ja kuljeta se laboratorioon mieluiten yhden tai kahden päivän kuluessa keräämisestä. Kuljetuksen aikana näytteen lämpötila ei saa ylittää testissä käytettävää lämpötilaa kovin paljoa. Määritä näytteenottopaikka tarkasti ja kuvaa myös sen saastumis- ja ravinnetilaa. Sisällytä luonnehdintaan etenkin rannikkovesien osalta heterotrofinen pesäkeluku sekä liuenneen nitraatin, ammoniumin ja fosfaatin pitoisuusmääritykset.

11. Ilmoita merivesinäytteestä myös seuraavat tiedot:

   — keräyspäivä

   — näytteenottosyvyys;

   — näytteen ulkonäkö – sameus jne.

   — lämpötila näytteenottoaikana

   — suolaisuus

   — liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus

   — näytteenoton ja testissä käyttämisen välinen aika.

12. Jos merivesinäytteen liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus todetaan liian suureksi (8 kohta), on suositeltavaa, että meriveden annetaan vanheta noin viikon ajan ennen käyttöä. Näytettä vanhennetaan säilyttämällä sitä aerobisissa olosuhteissa testilämpötilassa joko pimeässä tai hajavalossa. Ylläpidä aerobisia

▼M6

olosuhteita tarvittaessa varovaisella ilmastuksella. Vanhentamisen aikana helposti hajoavan orgaanisen aineksen pitoisuus pienenee. Rengastestissä (3) vanhennettujen ja tuoreena kerättyjen merivesinäytteiden hajoavuuspotentiaalissa ei havaittu eroa. Esikäsittele merivesi ennen käyttöä suurhiukkasten poistamiseksi esimerkiksi suodattamalla se nailonsuodattimen tai karkean paperisuodattimen läpi (ei kalvo- tai lasikuitusuodattimien läpi) tai sedimentoimalla ja dekantoimalla. Käytetty menetelmä on raportoitava. Jos merivettä on vanhennettu, esikäsittele vesi sen jälkeen.

Mineraaliravinteiden varastoliuokset

13. Valmista seuraavat varastoliuokset analyyttisen puhtaita reagensseja käyttäen:

a)	Kaliumdivetyortofosfaatti, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumvetyortofosfaatti, K_2HPO4	21,75 g
	Dinatriumvetyortofosfaattidihydraatti, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Ammoniumkloridi, NH_4Cl	0,50 g
	Liuota ja valmista yhdeksi litraksi tislatulla vedellä.	
b)	Kalsiumkloridi, $CaCl_2$	27,50 g
	Liuota ja valmista yhdeksi litraksi tislatulla vedellä.	
c)	Magnesiumsulfaattiheptahydraatti, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Liuota ja valmista yhdeksi litraksi tislatulla vedellä.	
d)	Rauta(III)kloridiheksahydraatti, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Liuota ja valmista yhdeksi litraksi tislatulla vedellä.	

Liuoksen saostuminen (d) on estettävissä lisäämällä yksi tippa konsentroitua HCl:ää tai 0,4 g etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA:ta, dinatriumsuolaa) yhteen litraan. Jos varastoliuokseen muodostuu sakkaa, vaihda se tuoreeseen liuokseen.

Testiväliaineen valmistelu

14. Lisää 1 ml jokaista edellä mainittua varastoliuosta yhteen litraan esikäsiteltyä merivettä.

Siirrosaine

15. Älä lisää tiettyä siirrosainetta merivedessä jo olevien mikro-organismien lisäksi. Määritä (valinnaisesti) pesäkkeitä muodostavien heterotrofien määrä merivesitestiväliaineessa (ja mielellään myös alkuperäisissä merivesinäytteissä) esimerkiksi laskemalla pesäkeluku Marine Agaria käyttäen. Tämä on paikallaan erityisesti tutkittaessa rannikkoalueilta tai saastuneilta paikoilta otettuja näytteitä. Tarkista heterotrofisten mikrobien toiminta merivedessä tekemällä testi vertailuaineella.

▼M6

Pullojen valmistelu

16. Varmista, että kaikki lasiastiat ovat hyvin puhtaita, eivät kuitenkaan välttämättä steriilejä (esimerkiksi käyttäen alkoholipitoista hydrokloridihappoa), huuhdeltuja ja kuivia ennen käyttöä. Näin vältetään aiemmista testeistä jääneiden jäämien aiheuttama kontaminoituminen. Pullot on pestävä myös ennen ensimmäistä käyttökertaa.

17. Arvioi testiaineet rinnakkaisnäytepulloissa samanaikaisesti yhdessä vertailuainetta sisältävän yhden pullon kanssa. Tee nollakoe rinnakkaisnäyttein (ilman testi- ja vertailuainetta) analyyttisten nollanäytteiden määrittämiseksi. Liuota testiaineet testiväliaineeseen – ne voidaan lisätä kätevästi konsentroidun varastoliuoksen kautta, jolloin saavutetaan halutut aloituspitoisuudet (liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus yleensä 540 mg/l). Vertailuaine testataan yleensä aloituspitoisuudella, joka vastaa liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuutta 20 mg/l. Jos testi- ja/tai vertailuaineista käytetään varastoliuoksia, varmista, ettei merivesiväliaineen suolaisuus ole muuttunut kovin paljoa.

18. Jos myrkyllisiä vaikutuksia on odotettavissa tai jos niitä ei voida sulkea pois, testisuunnitelmaan on syytä sisällyttää rinnakkaisnäyttein toteutettava inhibitiokoe. Lisää testi- ja vertailuaineet samaan astiaan. Vertailuaineen pitoisuus on yleensä sama kuin kontrollitestissä (esimerkiksi liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus 20 mg/l), jotta vertailu on mahdollista.

19. Laita asianmukaiset määrät testiliuoksia Erlenmeyer-pulloihin (sopiva määrä on noin puolet pullon tilavuudesta) ja peitä pullot löysällä kannella (esimerkiksi alumiinifoliolla), joka ei estä kaasunvaihtoa pullon ja ympäröivän ilman välillä. (Puuvillakorkit eivät käy, jos käytetään liuenneen orgaanisen hiilen analyysia.) Aseta astiat ravistimeen ja ravista niitä jatkuvasti kohtuullisella nopeudella (esimerkiksi 100 kierrosta minuutissa) koko testin ajan. Valvo lämpötilaa (15–20 °C, vaihteluväli ± 2 °C), ja suojaa astiat valolta, jotta niissä ei ala kasvaa levää. Varmista, ettei ilmassa ole myrkyllisiä aineita.

Fysikaalis-kemiallinen kontrollitesti (valinnainen)

20. Jos on syytä epäillä abioottisen hajoamisen tai häviämisen mekanismeja, joita ovat esimerkiksi hydrolyysi (ongelma vain ominaisanalyysin yhteydessä), haihtuminen tai adsorptio, kannattaa tehdä fysikaalis-kemiallinen kontrollikoe. Se voidaan tehdä lisäämällä elohopea(II)kloridia ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) testiainetta sisältäviin astioihin mikrobitoiminnan pysäyttämiseksi. Jos liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuus tai aineen ominaispitoisuus pienenevät merkittävästi fysikaalis-kemiallisessa kontrollitestissä, se viittaa abioottisiin poistomekanismeihin. (Elohopeakloridia käytettäessä on kiinnitettävä huomiota häiriöihin tai katalyytteihin kohdistuvaan myrkyllisyyteen liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuutta koskevissa analyyseissa.)

Pullojen määrä

21. Tyypillisessä ajossa käytetään seuraavia pulloja:

Pullot 1 & 2	sisältävät testiainetta (testisuspensio)
Pullot 3 & 4	sisältävät vain merivettä (nollanäyte)
Pullo 5	sisältää vertailuainetta (menettelyn kontrolli)
Pullo 6	sisältää testi- ja vertailuaineita (myrkyllisyyskontrolli) – valinnainen
Pullo 7	sisältää testiainetta ja sterilisoivaa ainetta (abioottinen steriili kontrolli) – valinnainen.

([1]) Elohopea(II)kloridi ($HgCl_2$) on erittäin myrkyllinen aine, jonka käsittelyssä on noudatettava asianmukaisia varotoimia. Tätä kemikaalia sisältävät nestemäiset jätteet on hävitettävä asianmukaisesti; niitä ei saa laittaa jätevesijärjestelmään.

▼M6

DOC-analyysi

22. Ota testin aikana sopivin väliajoin näytteitä DOC-analyysia varten (lisäys 1). Ota näytteet aina testin alkaessa (päivänä 0) ja päivänä 60. Näytteitä tarvitaan yhteensä vähintään viisi, jotta hajoamista voidaan kuvata ajallisesti. Näytteenottoa varten ei voida asettaa kiinteää aikaväliä, koska biohajoamisen nopeus vaihtelee. Tee DOC-määritys rinnakkaisnäyttein jokaisesta näytteestä.

Otanta

23. Tarvittavaan näytemäärään vaikuttavat analyysimenetelmä (ominaisanalyysi), käytettävä hiilianalysaattori sekä näytteiden käsittelyyn ennen hiilimääritystä valittu menetelmä (kalvosuodatus vai sentrifugointi) (25 ja 26 kohta). Varmista ennen näytteenottoa, että testiväliaine on sekoitettu hyvin ja että kaikki pullon seinämiin mahdollisesti kiinnittynyt aines on liuennut tai suspendoitunut.

24. Tee kalvosuodatus tai sentrifugointi heti näytteenoton jälkeen. Jos tarpeen, suodatettuja tai sentrifugoituja näytteitä voi säilyttää 2–4 °C:ssä enintään 48 tuntia tai alle – 18 °C:ssa pidemmän aikaa (jos tiedetään, ettei aine muutu; säädä pH-arvoksi 2 ennen säilytystä).

25. Kalvosuodattimet (0,2-0–0,45 μm) ovat sopivia, jos on varmaa, ettei niistä vapaudu hiiltä ja etteivät ne adsorboi ainetta suodatusvaiheessa (esimerkiksi polykarbonaatista valmistetut kalvosuodattimet sopivat). Jotkin kalvosuodattimet on kyllästetty pinta-aktiivisilla aineilla hydrofiilisyyden parantamiseksi, ja niistä voi vapautua huomattavia määriä liuennutta hiiltä. Valmistele tällaiset suodattimet keittämällä ne deionisoidussa vedessä tunnin ajan, ja toista käsittely kolme kertaa. Säilytä suodattimet keittämisen jälkeen deionisoidussa vedessä. Ensimmäiset 20 ml suodosta heitetään pois.

26. Näytteiden sentrifugointi voidaan valita vaihtoehdoksi kalvosuodatukselle. Sentrifugoi näytteet nopeudella 40 000 $m.s^{-2}$ (~ 4 000 g) 15 minuutin ajan mieluiten jäähdytetyssä sentrifugissa.

Huomautus: TOC:n (orgaanisen hiilen kokonaismäärän) ja DOC:n (TOC/DOC) osuuksia hyvin pieniä pitoisuuksia sentrifugoitaessa ei voida määrittää luotettavasti, koska kaikki bakteerit eivät välttämättä poistu tai bakteeriplasman orgaaninen hiili liukenee uudelleen. Suurempien testipitoisuuksien (> 10 mg hiiltä litrassa) sentrifugointivirhe vaikuttaa olevan verrattain pieni.

Näytteenottotiheys

27. Jos analyysit tehdään heti näytteenoton jälkeen, määritä seuraava näytteenottoajankohta analyyttisen määrityksen tuloksen perusteella.

28. Jos näytteet säilötään (24 kohta) myöhemmin tehtävää analyysia varten, ota vaadittua vähimmäismäärää (viisi) enemmän näytteitä. Analysoi viimeiset näytteet ensiksi. Kun näytteet valitaan analyysiin näytteenottojärjestykseen nähden päinvastaisessa järjestyksessä asteittain (”takaperin”), on mahdollista saada hyvä kuva biohajoamiskäyrästä, ja samalla tarvitaan melko vähän analyyttisia määrityksiä. Jos hajoamista ei ole tapahtunut testin loppuun mennessä, lisänäytteitä ei tarvitse analysoida, ja tällaisessa tilanteessa analyysikustannuksissa saatetaan säästää huomattavasti päinvastaisen järjestyksen noudattamisen ansiosta.

▼M6

29. Jos hajoamiskäyrässä havaitaan tasannevaihe ennen päivää 60, lopeta testi. Jos hajoaminen on selvästi alkanut päivään 60 mennessä mutta jos tasannevaihetta ei ole saavutettu, jatka koetta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

30. Merkitse analyysin tulokset liitteenä olevaan tietolomakkeeseen (lisäys 2), ja laske sekä testi- että vertailuaineen biohajoavuusarvot seuraavalla yhtälöllä:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

Jossa

D_t = hajoaminen DOC-poistumaprosenttina tai tietyn aineen poistumaprosenttina ajassa t

C_o = DOC:n tai tietyn aineen aloituspitoisuus testiväliaineessa

C_t = DOC:n tai tietyn aineen pitoisuus testiväliaineessa ajassa t

$C_{bl(0)}$ = DOC:n tai tietyn aineen aloituspitoisuus nollanäytteessä

$C_{bl(t)}$ = DOC:n tai tietyn aineen pitoisuus nollanäytteessä ajassa t.

31. Ilmoita hajoaminen DOC-poistumaprosenttina (lopullinen hajoaminen) tai tietyn aineen poistumaprosenttina ajassa t. Laske DOC-pitoisuudet lähimpään 0,1 mg:aan litraa kohti, ja pyöristä D_t-arvojen keskiarvot lähimpään kokonaiseen prosenttilukuun.

32. Kuvaa hajoamisen etenemistä graafisesti kaavakuvassa kohdassa ”Validiteetti ja tulosten tulkinta” olevan kuvan mukaisesti. Jos tietoja on riittävästi, laske käyrästä lag-vaihe (t_L) ja aika, joka kului 50 prosentin poistuman saavuttamiseen lag-vaiheen lopusta alkaen (t_{50}).

Testiraportti

33. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— tunnistetiedot.

Testiolosuhteet:

— näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus; saaste- ja ravinnetila (pesäkeluku, nitraatti, ammonium, fosfaatti, jos tarpeen)

— näytteen ominaisuudet (näytteenottopäivä ja -syvyys, ulkonäkö, lämpötila, suolaisuus, DOC (valinnainen), näytteenoton ja testissä käyttämisen välinen viive

▼M6

— meriveden (mahdollisessa) vanhentamisessa käytetty menetelmä

— meriveden esikäsittelyssä (suodatus/sedimentointi) käytetty menetelmä

— DOC-määrityksessä käytetty menetelmä

— ominaisanalyysissa käytetty menetelmä (valinnainen)

— meriveden heterotrofien lukumäärän määrittämisessä käytetty menetelmä (pesäkeluvun laskeminen tai jokin muu menetelmä) (valinnainen)

— muut meriveden luonnehtimisessa käytetyt menetelmät (valinnainen) (ATP-mittaukset jne.).

Tulokset:

— tietolomakkeella (lisäys 2) raportoidut analyysitiedot

— hajoamistestin eteneminen esitetään graafisesti kaavakuvassa, jossa näkyy lag-vaihe (t_L), kulmakerroin ja aika (lag-vaiheen lopusta alkaen), joka kului 50 prosentin poistuman (t_{50}) saavuttamiseen. Lag-vaihe voidaan arvioida graafisesti kohdassa ”Validiteetti ja tulosten tulkinta” olevan kuvan mukaisesti, tai se voidaan ilmoittaa helpommin aikana, joka kului 10 prosentin hajoamisen saavuttamiseen.

— hajoamisen prosenttiosuus mitattuna 60 päivän kuluttua tai testin lopussa.

Tulosten pohdinta.

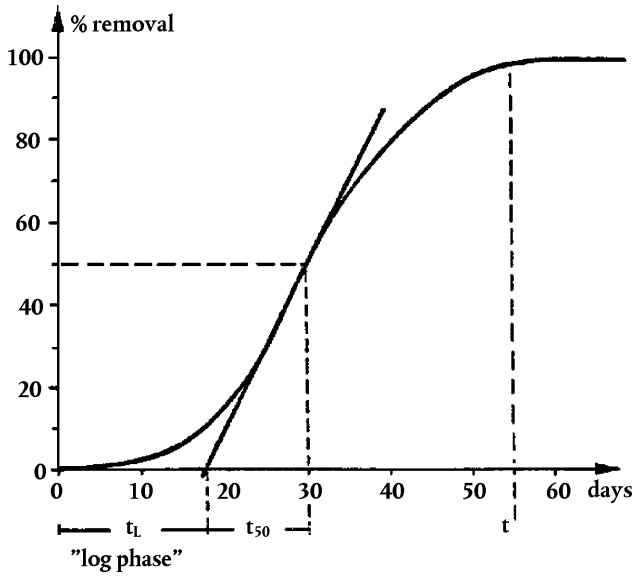
Validiteetti ja tulosten tulkinta

34. Vertailuaineista (esimerkiksi natriumbentsoaatti, natriumasetaatti tai aniliini) saatujen tulosten tulisi olla verrattavissa rengastestissä (3) saatuihin tuloksiin (ks. kohta ”Vertailuaineet”, 7 kohta). Jos vertailuaineista saadut tulokset ovat epätyypillisiä, testi on toistettava käyttämällä toista merivesinäytettä. Vaikka inhibitiotestien tuloksia ei aina voida tulkita suoraviivaisesti, koska testiaine vaikuttaa liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuuteen, sen kokonaispitoisuuden poistumanopeuden merkittävä pieneneminen kontrolliin verrattuna on positiivinen merkki myrkyllisistä vaikutuksista.

35. Koska käytetyt testipitoisuudet ovat varsin suuria verrattuna useimpiin luonnollisiin järjestelmiin (ja koska testiaineiden ja muiden hiililähteiden pitoisuuksien välinen suhde on siksi epäsuotuisa), menetelmää on pidettävä alustavana testinä, jota voidaan käyttää sen osoittamiseksi, onko aine nopeasti biohajoava vai ei. Toisaalta jos testin tulokseksi saadaan pieniä arvoja, se ei välttämättä tarkoita, etteikö testiaine olisi biohajoava meriympäristössä. Sen sijaan tällainen tulos viittaa siihen, että asian selvittämiseksi tarvitaan lisää tutkimuksia.

Jäljempänä olevassa kuvassa on esimerkki teoreettisesta hajoamiskokeesta, joka edustaa mahdollista tapaa arvioida arvot t_L (”lag-vaiheen” pituus) ja t_{50} (aikaväli, alkaa ajasta t_L), joka tarvitaan 50 prosentin poistuman saavuttamiseen.

▼M6



SULJETTU PULLO -MENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä menetelmä on meriveteen sovellettava muunnos suljetun pullon testistä (5), ja sen viimeisteli tanskalainen vedenlaatua tutkiva laitos, joka järjesti rengastestin Euroopan komission puolesta (3).

2. Kuten merivedellä tehtävässä ravistuspullomenetelmässä, myöskään tämän testin tuloksia ei tule pitää merkkeinä nopeasta biohajoavuudesta, vaan niitä on käytettävä pikemminkin keinona hankkia tietoa aineiden biohajoavuudesta meriympäristössä.

MENETELMÄN PERIAATE

3. Ennalta määritetty määrä testiainetta liuotetaan testiväliaineeseen pitoisuutena, joka on yleensä 210 mg testiainetta litrassa (yhtä tai useampaa pitoisuutta voidaan käyttää). Liuosta pidetään täytetyssä suljetussa pullossa pimeässä ja hauteessa, jonka lämpötila on vakio, tai kotelossa, jonka lämpötilaksi on säädetty 15–20 °C (vaihteluväli ± 1 °C). Kun tutkimuksen tavoitteena on simuloida ympäristötilanteita, testit voidaan tehdä tämän normaalin lämpötila-alueen ulkopuolellakin, kunhan lämpötilansäätöön tehdään tarvittavat mukautukset. Hajoamista seurataan happianalyyseillä 28 päivän ajanjaksolla.

4. Rengastesti osoitti, että kun testiä jatkettiin yli 28 päivää, useimmissa tapauksissa ei saatu hyödyllistä tietoa vakavien häiriöiden takia. Nollanäytteen biokemiallisen hapenkulutuksen (BOD) arvot olivat erittäin suuret luultavasti pullon seinämien bakteerikasvuston, sekoituksen puuttumisen ja nitrifikaation takia. Näin ollen testin suositeltu kesto on 28 päivää, mutta jos nollanäytteen BOD-arvo on edelleen 30 prosentin rajan sisällä (15 ja 40 kohta), testiä voidaan pidentää.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

5. Jotta tiedetään, voidaanko testiä soveltaa tiettyyn aineeseen, sen joidenkin ominaisuuksien on oltava tiedossa. Jotta teoreettinen hapenkulutus (ThOD) voidaan laskea (ks. lisäys 3), on tiedettävä aineen empiirinen kaava. Muussa tapauksessa on määritettävä aineen kemiallinen hapenkulutus (COD) vertailuarvoksi. COD-arvon käyttämistä ei suositella, koska jotkin aineet eivät hapetu täysin COD-testissä.

▼M6

6. Aineen liukoisuuden tulisi olla vähintään 2 mg/l, joskin periaatteessa myös huonommin liukenevia aineita voidaan testata (esimerkiksi käyttämällä ultraäänikäsittelyä), kuten myös haihtuvia aineita. Tiedot testiaineen tärkeimpien ainesosien puhtaudesta tai niiden suhteellisista osuuksista ovat tarpeen, jotta saatuja tuloksia voidaan tulkita, etenkin jos tulos on lähellä hyväksyttävää raja-arvoa.

7. Tieto testiaineen myrkyllisyydestä bakteereille, esimerkiksi mitattuna lyhytaikaisissa soluhengitystesteissä (4), voi olla hyödyllinen asianmukaisia testipitoisuuksia valittaessa, ja se voi olla olennainen pienten biohajoavuusarvojen oikean tulkinnan kannalta. Nämä tiedot eivät kuitenkaan aina riitä biohajoavuustesteistä saatujen tulosten tulkintaan, ja 27 kohdassa kuvattu menettely voi olla sopivampi.

VERTAILUAINEET

8. Sopivia vertailuaineita on käytettävä, jotta merivesinäytteen mikrobien toiminta voidaan tarkistaa. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää (esimerkiksi) aniliinia, natriumasetaattia tai natriumbentsoaattia. Näiden aineiden on hajottava vähintään 60-prosenttisesti (niiden ThOD-arvosta) melko lyhyessä ajassa. Muussa tapauksessa suositellaan, että testi toistetaan käyttämällä toista merivesinäytettä.

9. Euroopan komission rengastestissä, joissa merivesinäytteitä otettiin eri paikoista ja eri aikoina vuodesta, natriumbentsoaatin osalta lag-vaihe (t_L) oli 0–2 päivää ja 50 prosentin biohajoamisen saavuttamiseen tarvittu aika (t_{50}), lag-vaihe pois lukien, oli 1–4 päivää. Aniliinin osalta t_L-arvo oli 0–7 päivää ja t_{50}-arvo 2–12 päivää.

TOISTETTAVUUS

10. Menetelmien toistettavuus todettiin Euroopan komission rengastestissä (3).

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

11. Tavallinen laboratoriolaitteisto ja lisäksi:

a) 250–300 ml:n BOD-pulloja, joissa on lasikorkit, tai kapeakaulaisia 250 ml:n pulloja, joissa on lasikorkit

b) useita 2, 3 ja 4 litran pulloja, joissa on litran merkit, kokeen valmisteluun ja BOD-pullojen täyttämiseen

c) vesihaude tai tila, jonka lämpötila on vakio, jotta pulloja voidaan pitää vakiolämpötilassa (± 1 °C) ja pimeässä

d) laitteisto liuenneen hapen analysointiin

e) kalvosuodattimia, 0,2–0,45 μm (valinnainen)

f) ominaisanalyysia varten tarvittava laitteisto (valinnainen).

Merivesi

12. Kerää merivesinäyte huolellisesti puhdistettuun säiliöön ja kuljeta se laboratorioon mieluiten yhden tai kahden päivän kuluessa keräämisestä. Kuljetuksen aikana näytteen lämpötila ei saa ylittää testissä käytettävää lämpötilaa kovin paljoa.

▼M6

13. Määritä näytteenottopaikka tarkasti ja kuvaa myös sen saastumis- ja ravinnetilaa. Sisällytä luonnehdintaan etenkin rannikkovesien tai saastuneiden vesien osalta heterotrofinen pesäkeluku sekä liuenneen nitraatin, ammoniumin ja fosfaatin pitoisuusmääritykset.

14. Ilmoita merivesinäytteestä myös seuraavat tiedot:

— keräyspäivä

— näytteenottosyvyys;

— näytteen ulkonäkö – sameus jne.

— lämpötila näytteenottoaikana

— suolaisuus

— liuennut orgaaninen hiili (DOC)

— näytteenoton ja testissä käyttämisen välinen aika.

15. Jos näytteen DOC-pitoisuuden havaitaan olevan suuri tai jos oletetaan, että nollanäytteen BOD-arvo olisi 28 päivän kuluttua enemmän kuin 30 prosenttia vertailuaineiden arvosta, on suositeltavaa, että meriveden annetaan vanhentua noin viikon ajan ennen käyttöä.

16. Näytettä vanhennetaan säilyttämällä sitä aerobisissa olosuhteissa testilämpötilassa joko pimeässä tai hajavalossa. Ylläpidä aerobisia olosuhteita tarvittaessa varovaisella ilmastuksella. Vanhentamisen aikana helposti hajoavan orgaanisen aineksen pitoisuus pienenee. Rengastestissä (3) vanhennettujen ja tuoreena kerättyjen merivesinäytteiden hajoavuuspotentiaalissa ei havaittu eroa.

17. Esikäsittele merivesi ennen käyttöä suurhiukkasten poistamiseksi esimerkiksi suodattamalla se nailonsuodattimen tai karkean paperisuodattimen läpi (ei kalvo- tai lasikuitusuodattimien läpi) tai sedimentoimalla ja dekantoimalla. Ilmoita käytetty menetelmä. Esikäsittele vesi vanhentamisen jälkeen, jos sitä on käytetty.

Mineraaliravinteiden varastoliuokset

18. Valmista seuraavat varastoliuokset analyyttisen puhtaita reagensseja käyttäen:

a)	Kaliumdivetyortofosfaatti, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumvetyortofosfaatti, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriumvetyortofosfaattidihydraatti, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Ammoniumkloridi, NH_4Cl	0,50 g
	Liuota ja valmista yhdeksi litraksi tislatulla vedellä.	
b)	Kalsiumkloridi, $CaCl_2$	27,50 g
	Liuota ja valmista yhdeksi litraksi tislatulla vedellä.	
c)	Magnesiumsulfaattiheptahydraatti, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Liuota ja valmista yhdeksi litraksi tislatulla vedellä.	
d)	Rauta(III)kloridiheksahydraatti, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Liuota ja valmista yhdeksi litraksi tislatulla vedellä.	

▼M6

Liuoksen saostuminen (d) on estettävissä lisäämällä yksi tippa konsentroitua HCl:ää tai 0,4 g etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA:ta, dinatriumsuolaa) yhteen litraan. Jos varastoliuokseen muodostuu sakkaa, vaihda se tuoreeseen liuokseen.

Testiväliaineen valmistelu

19. Lisää yhteen litraan esikäsiteltyä merivettä 1 ml jokaista edellä mainittua varastoliuosta. Kyllästä testiväliaine ilmalla testilämpötilassa ilmastamalla sitä puhtaalla paineilmalla noin 20 minuutin ajan. Määritä liuenneen hapen pitoisuus vertailua varten. Liuenneen hapen kyllästetty pitoisuus suolaisuuden ja lämpötilan funktiona voidaan lukea nomogrammista, joka on tämän testimenetelmän liitteenä (lisäys 4).

Siirrosaine

20. Älä lisää tiettyä siirrosainetta merivedessä jo olevien mikro-organismien lisäksi. Määritä (valinnaisesti) pesäkkeitä muodostavien heterotrofien määrä merivesitestiväliaineessa (ja mielellään myös alkuperäisissä merivesinäytteissä) esimerkiksi laskemalla pesäkeluku Marine Agaria käyttäen. Tämä on paikallaan erityisesti tutkittaessa rannikkoalueilta tai saastuneilta paikoilta otettuja näytteitä. Tarkista heterotrofisten mikrobien toiminta merivedessä tekemällä testi vertailuaineella.

Testipullojen valmistelu

21. Tee kaikki tarvittavat käsittelyt, mukaan luettuina meriveden vanhentaminen ja esikäsittely, valitussa testilämpötilassa (välillä 15–20 °C), ja varmista, että kaikki lasiastiat ovat puhtaita mutta eivät steriilejä.

22. Valmistele rinnakkaiset ryhmät BOD-pulloja, joiden avulla voidaan toteuttaa rinnakkaisia koesarjoja testi- ja vertailuaineen BOD-arvojen määritystä varten. Tee kaikki analyysit rinnakkaisnäytepulloilla (nollanäytteet, vertailu- ja testiaineet), ts. valmista jokaista määritystä varten kaksi pulloa. Tee analyysit vähintään päivinä 0, 5, 15 ja 28 (neljä määritystä). Happianalyyseissa neljään määritykseen tarvitaan yhteensä $3 \times 2 \times 4 = 24$ pulloa (nollanäyte, vertailuaine ja testiaine) ja siis noin kahdeksan litraa testiväliainetta (yhtä testiainepitoisuutta varten).

23. Valmista testi- ja vertailuaineista erilliset liuokset riittävän suuriin pulloihin (11 kohta). Lisää osittain täytettyihin suuriin pulloihin ensin testi- ja vertailuaineet joko suoraan tai käyttämällä konsentroitua varastoliuosta. Lisää sen jälkeen testiväliainetta halutun lopullisen pitoisuuden saavuttamiseksi. Jos testi- ja/tai vertailuaineista käytetään varastoliuoksia, varmista, ettei merivesiväliaineen suolaisuus ole muuttunut kovin paljoa.

24. Valitse testi- ja vertailuaineiden pitoisuudet ottamalla huomioon seuraavat seikat:

a) liuenneen hapen liukoisuus merivedessä testissä vallitsevan lämpötilan ja suolaisuuden yhteydessä (ks. liitteenä oleva nomogrammi, lisäys 4)

b) meriveden nollanäytteen BOD-arvo

c) testiaineen odotettu biohajoavuus.

▼M6

25. Kun lämpötila on 15–20 °C ja kun suolaisuus on 32 tuhannesosaa (valtamerivesi), liuennen hapen liukoisuus on noin 8,1 ja 7,4 mg/l. Meriveden hapenkulutus (nollanäytteen soluhengitys) on 2 mg O_2/l tai enemmän, jos merivesi ei ole vanhentunut. Jotta voidaan varmistaa, että jäljelle jäävä happipitoisuus on merkittävä testiaineen hapettumisen jälkeen, käytä testiaineen aloituspitoisuutena suurin piirtein arvoa 2–3 mg/l (ThOD-arvon mukaan) sellaisille aineille, joiden odotetaan hajoavan kokonaan testiolosuhteissa (kuten vertailuaineet). Testaa huonommin hajoavat aineet suurempina pitoisuuksina (noin 10 mg/l) edellyttäen, ettei myrkyllisiä vaikutuksia ilmene. Voi olla hyödyllistä tehdä rinnakkaiset testit testiaineen pienellä pitoisuudella (noin 2 mg/l) ja suurella pitoisuudella (noin 10 mg/l).

26. Hapen nollanäyte on määritettävä rinnakkain pulloista, jotka eivät sisällä testiainetta eivätkä vertailuainetta.

27. Jos on tarkoitus määrittää inhiboivia vaikutuksia, valmistele seuraavat liuokset erillisiin suuriin pulloihin (13 kohta):

a) nopeasti hajoavaa ainetta, esimerkiksi mitä tahansa mainittua vertailuainetta, 2 mg/l

b) testiainetta × mg/l (x on yleensä 2)

c) nopeasti hajoavaa ainetta 2 mg/l sekä testiainetta × mg/l.

Fysikaalis-kemiallinen kontrollitesti (valinnainen)

28. Jos hyödynnetään mahdollisuutta käyttää ominaisanalyyseja, voidaan tehdä fysikaalis-kemiallinen koe sen tarkistamiseksi, poistuuko testiainetta abioottisten mekanismien, kuten hydrolyysin tai adsorption, kautta. Fysikaalis-kemiallinen kontrollitesti voidaan tehdä lisäämällä elohopea(II)kloridia ($HgCl_2$) ([1]) (50—100 mg/l) testiainetta sisältäviin rinnakkaisnäytepulloihin mikrobitoiminnan pysäyttämiseksi. Jos aineen ominaispitoisuus pienenee merkittävästi testin aikana, se viittaa abioottisiin poistomekanismeihin.

BOD-pullojen lukumäärä tyypillisessä ajossa

29. Tyypillisessä ajossa käytetään seuraavia pulloja:

— vähintään 8 pulloa, jotka sisältävät testiainetta

— vähintään 8 pulloa, jotka sisältävät vain ravinteilla rikastettua merivettä

— vähintään 8 pulloa, jotka sisältävät vertailuainetta, ja tarvittaessa

— 6 pulloa, jotka sisältävät testi- ja vertailuaineita (myrkyllisyyskontrolli).
MENETTELY

30. Täytä kukin BOD-pulloryhmä lappamalla kutakin liuosta heti valmistuksen jälkeen jokaisen suuren pullon alemmasta neljänneksestä (ei pohjalta) BOD-pulloihin. Analysoi heti liuenneen hapen nollakontrollit (aika nolla) (33 kohta) tai säilö ne myöhemmin tehtävää kemiallista analyysia varten saostamalla ne $MnCl_2$:lla (manganeesi(II)kloridilla) ja NaOH:lla (natriumhydroksidilla).

([1]) Elohopea(II)kloridi ($HgCl_2$) on erittäin myrkyllinen aine, jonka käsittelyssä on noudatettava asianmukaisia varotoimia. Tätä kemikaalia sisältävät nestemäiset jätteet on hävitettävä asianmukaisesti; niitä ei saa laittaa jätevesijärjestelmään.

▼M6

31. Inkuboi loput rinnakkaiset BOD-pullot testilämpötilassa (15–20 °C), pidä ne pimeässä, poista ne inkubointialueelta sopivin väliajoin (esimerkiksi vähintään 5, 15 ja 28 päivän kuluttua) ja analysoi niistä liuennut happi (33 kohta).

32. Kalvosuodata (0,2-0–0,45 μm) tai sentrifugoi (15 minuuttia) näytteet ominaisanalyysia varten (valinnainen). Säilytä näytteitä enintään 48 tuntia 2-4 °C:ssa tai pitempiä aikoja – 18 °C:ssa, jos niitä ei analysoida välittömästi (jos tiedetään, ettei testiaine muutu; säädä pH-arvoksi 2 ennen säilytystä).

Liuenneen hapen määritys

33. Määritä liuenneen hapen pitoisuus käyttämällä kemiallista tai sähkökemiallista menetelmää, joka on hyväksytty kansallisesti tai kansainvälisesti.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

34. Merkitse analyysitulokset liitteenä oleviin tietolomakkeisiin (lisäys 5).

35. Laske BOD nollanäytteen ja testiaineliuoksen välisenä hapen häviämisen erotuksena testiolosuhteissa. Jaa hapen nettohäviäminen aineen pitoisuudella (massaprosenttina tilavuutta kohden, w/v), jotta voit ilmoittaa BOD-arvon kaavalla ”BOD x mg yhdessä mg:ssa testiainetta”. Hajoaminen määritellään biokemiallisen hapenkulutuksen suhteena joko teoreettiseen hapenkulutukseen (ThOD) tai kemialliseen hapenkulutukseen (COD), ja se ilmoitetaan prosenttiosuutena (ks. 36 kohta).

36. Laske biohajoavuusarvot jokaista näytteenottokertaa kohti sekä testi- että vertailuaineille käyttämällä jompaakumpaa seuraavista yhtälöistä:

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mg tested\ substance}{mg\ ThOD/mg tested\ substance} \times 100$$

$$\%\ biodegradation = \frac{mg\ O_2/mg tested\ substance}{mg\ COD/mg tested\ substance} \times 100$$

jossa

ThOD = teoreettinen hapenkulutus (laskenta, ks. lisäys 3)

COD = kemiallinen hapenkulutus.

Huomautus: Joskus näillä kahdella laskentatavalla (prosenttiosuus ThOD:sta tai COD:sta) ei saada samoja tuloksia. Siksi on parempi kyttää ThOD:ta, koska jotkin aineet eivät hapetu kokonaan COD-testissä.

37. Kuvaa hajoamisen etenemistä graafisesti kaavakuvassa (katso esimerkki kohdasta ”Validiteetti ja tulosten tulkinta”). Jos tietoja on riittävästi, laske biohajoamiskäyrästä lag-vaihe (t_L) ja aika, joka kului 50 prosentin poistuman saavuttamiseen lag-vaiheen lopusta alkaen (t_{50}).

38. Jos käytetään ominaisanalyysia (valinnainen), ilmoita primaarisen hajoamisen prosenttiosuus prosenttiosuutena aineen ominaispoistumasta testin aikana (korjattu analyyttisten nollakokeiden osalta).

▼M6

Testiraportti

39. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— tunnistetiedot.

Testiolosuhteet:

— näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus: saaste- ja ravinnetila (pesäkeluku sekä nitraatti, ammonium ja fosfaatti, jos tarpeen)

— näytteen ominaisuudet (näytteenottopäivä ja -syvyys, ulkonäkö, lämpötila, suolaisuus, DOC (valinnainen), näytteenoton ja testissä käyttämisen välinen viive

— meriveden (mahdollisessa) vanhentamisessa käytetty menetelmä

— meriveden esikäsittelyssä (suodatus/sedimentointi) käytetty menetelmä

— COD-määrityksessä (jos tehty) käytetty menetelmä

— happimittauksissa käytetty menetelmä

— dispersiomenetelmä aineille, jotka liukenevat huonosti testiolosuhteissa

— meriveden heterotrofien lukumäärän määrittämisessä käytetty menetelmä (pesäkeluvun laskeminen tai jokin muu menetelmä)

— meriveden DOC-arvon määrittämisessä käytetty menetelmä (valinnainen)

— ominaisanalyysissa käytetty menetelmä (valinnainen)

— muut meriveden luonnehtimisessa käytetyt valinnaiset menetelmät (ATP-mittaukset jne.).

Tulokset:

— tietolomakkeella (liitteenä, lisäys 5) raportoidut analyysitiedot

— hajoamistestin eteneminen esitetään graafisesti kaavakuvassa, jossa näkyy lag-vaihe (t_L), kulmakerroin ja aika (lag-vaiheen lopusta alkaen), joka kului siihen, että testiaineen hapettumisen aiheuttamasta lopullisesta hapenkulutuksesta oli saavutettu 50 prosenttia (t_{50}). Lag-vaihe voidaan arvioida graafisesti liitteenä olevassa kuvassa esitetyn mukaisesti, tai se voidaan ilmoittaa helpommin aikana, joka kului 10 prosentin hajoamisen saavuttamiseen.

— hajoamisen prosenttiosuus 28 päivän jälkeen mitattuna.

Tulosten pohdinta.

Validiteetti ja tulosten tulkinta

40. Nollanäytteen respiraatio saa olla enintään 30 prosenttia testipullossa olevasta hapesta. Jos tätä kriteeriä ei voida täyttää käyttämällä tuoretta kerättyä merivettä, merivesi on vanhennettava (stabiloitava) ennen käyttöä.

41. On otettava huomioon myös se mahdollisuus, että typpeä sisältävät aineet saattavat vaikuttaa tuloksiin.

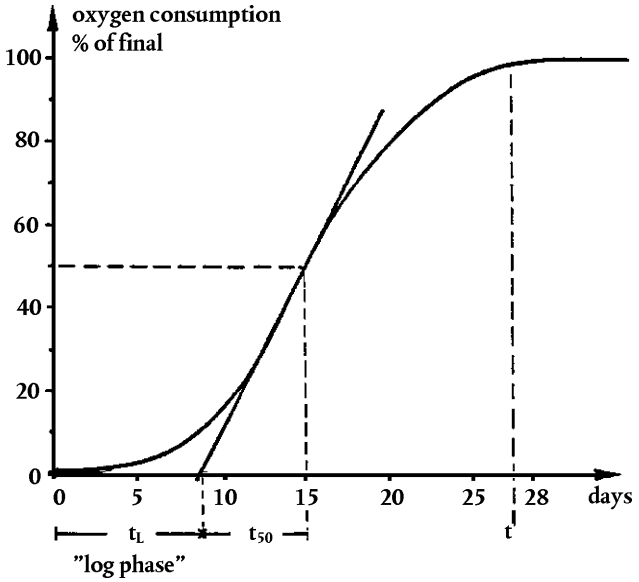
▼M6

42. Vertailuaineista natriumbentsoaatti ja aniliini saatujen tulosten tulisi olla verrattavissa rengastestissä (3) saatuihin tuloksiin (9 kohta). Jos vertailuaineista saadut tulokset ovat epätyypillisiä, testi on toistettava käyttämällä toista merivesinäytettä.

43. Testiaineen voidaan katsoa olevan bakteereita inhiboiva (käytetyllä pitoisuudella), jos vertailu- ja testiaineiden seoksen BOD-arvo on pienempi kuin näiden kahden aineen erillisten liuosten BOD-arvojen summa.

44. Koska käytetyt testipitoisuudet ovat varsin suuria verrattuna useimpiin luonnollisiin järjestelmiin (ja koska testiaineiden ja muiden hiililähteiden pitoisuuksien välinen suhde on siksi epäsuotuisa), menetelmää on pidettävä alustavana testinä, jota voidaan käyttää sen osoittamiseksi, onko aine nopeasti biohajoava vai ei. Toisaalta jos testin tulokseksi saadaan pieniä arvoja, se ei välttämättä tarkoita, etteikö testiaine olisi biohajoava meriympäristössä. Sen sijaan tällainen tulos viittaa siihen, että asian selvittämiseksi tarvitaan lisää tutkimuksia.

Jäljempänä olevassa kuvassa on esimerkki teoreettisesta hajoamiskokeesta, joka edustaa mahdollista tapaa arvioida arvot t_L (”lag-vaiheen” pituus) ja t_{50} eli aikaväli (alkaa ajasta tL), joka tarvitaan siihen, että testiaineen hapettumisen aiheuttamasta lopullisesta hapenkulutuksesta saavutetaan 50 prosenttia.



LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561–573.

(2) Tämän liitteen luku C.4-B: Biohajoavuuden määritys, OECD:n muunnellun seulontakokeen osa III.

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984–1985, March 1987, Commission of the European Communities.

(4) Tämän liitteen luku C.11. Biologinen hajoaminen – aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

(5) Tämän liitteen luku C.4-E: Biohajoavuuden määritys, osa VI, suljetun pullon menetelmä.

▼M6

Lisäys 1

Orgaanisen hiilen määritys merivedestä

RAVISTUSPULLOMENETELMÄ

Jotta vesinäytteestä voidaan määrittää orgaanisen hiilen pitoisuus, näytteen orgaaniset yhdisteet hapetetaan hiilidioksidiksi käyttämällä yleensä jotakin kolmesta seuraavasta tekniikasta:

— märkähapetus persulfaatilla/UV-säteilytyksellä

— märkähapetus persulfaatilla / suuremmassa lämpötilassa (116–130 °C)

— polttaminen.

Muodostunut CO_2 kvantifioidaan infrapunaspektrometrialla tai titrimetrialla. Vaihtoehtoisesti CO_2 pelkistetään metaaniksi, joka kvantifioidaan liekki-ionisaatioilmaisimella.

Persulfaatti/UV-menetelmää käytetään tavallisesti analysoitaessa ”puhdasta” vettä, jonka hiukkasainepitoisuus on pieni. Kahta jälkimmäistä menetelmää voidaan soveltaa useimpiin vesinäytetyyppeihin. Persulfaatti / suurempi lämpötila -menetelmä on sopivin menetelmä näytteisiin, joiden pitoisuudet ovat pienet, ja polttamistekniikkaa voidaan soveltaa näytteisiin, joiden haihtumattoman orgaanisen hiilen (NVOC) -pitoisuus on selvästi alle 1 mg hiiltä litrassa.

Häiriöt

Kaikkiin kolmeen menetelmään vaikuttaa näytteessä olevan epäorgaanisen hiilen eliminoituminen tai kompensoituminen. CO_2:n puhdistaminen happamoitetusta näytteestä on yleisimmin käytetty menetelmä epäorgaanisen hiilen eliminoimiseksi, joskin se aiheuttaa haihtuvien orgaanisten yhdisteiden häviämistä (1). Epäorgaanisen hiilen täydellinen eliminoituminen tai kompensoituminen on varmistettava jokaisesta näytematriisista, ja haihtuva orgaaninen hiili on määritettävä haihtumattoman orgaanisen hiilen lisäksi näytetyypin mukaisesti.

Suuret kloridipitoisuudet vähentävät hapetustehoa, kun käytetään persulfaatti/UV-menetelmää (2). Tämä häiriö voidaan kuitenkin poistaa käyttämällä hapetusreagenssia, jota on muunneltu lisäämällä elohopea(II)nitraattia. Kunkin klorideja sisältävän näytetyypin arvioinnissa on suositeltavaa käyttää suurinta mahdollista (siedettyä) näytetilavuutta. Polttomenetelmällä analysoidun näytteen suuret suolapitoisuudet voivat aiheuttaa sen, että katalyyttiin muodostuu suolapinnoite ja että polttoputki syöpyy liiallisesti. Varotoimia on noudatettava valmistajan käsikirjan mukaisesti.

Hyvin sameat näytteet ja hiukkasainesta sisältävät näytteet saattavat hapettua epätäydellisesti persulfaatti/UV-menetelmää käytettäessä.

Esimerkki sopivasta menetelmästä

Haihtumaton orgaaninen hiili määritetään hapettamalla näyte persulfaatti/UV-säteilytysmenetelmällä, ja tästä muodostunut CO_2 kvantifioidaan ei-dispersiivisellä infrapunaspektrometrialla.

Hapetusreagenssi muunnetaan kirjallisuusviitteessä (2) esitetyn mukaisesti, kuten valmistajan käsikirjassa on kuvattu:

a) 8,2 g $HgCl_2$:ta ja 9,6 g $Hg(NO_3)_2$. H_2O:ta liuotetaan muutamaan sataan millilitraan reagenssivettä, jonka hiilipitoisuus on pieni.

b) 20 g $K_2S_2O_8$:aa liuotetaan elohopeasuolaliuokseen.

▼**M6**

c) Seokseen lisätään 5 ml HNO_3:a (kons.).

d) Reagenssi laimennetaan 1 000 ml:ksi.

Kloridin aiheuttama häiriö poistetaan käyttämällä 40 µl:n näytetilavuutta 10-prosenttiselle kloridille ja 200 µl:n näytetilavuutta 1,9-prosenttiselle kloridille. Näytteet, joiden kloridipitoisuudet ovat suuria, ja/tai suuremmat näytemäärät voidaan analysoida tällä menetelmällä, kunhan kloridin kertyminen hapetusastiaan on estetty. Myös haihtuvan orgaanisen hiilen määritys voidaan tehdä, jos sillä on merkitystä kyseisen näytetyypin kannalta.

LÄHDELUETTELO

(1) ISO, Water quality determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Myös hyödyllinen lähde (kuvaus autoanalyysijärjestelmästä):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137–142.

▼**M6**

Lisäys 2

Biohajoavuus merivedessä

RAVISTUSPULLOMENETELMÄ

TIETOLOMAKE

1. **LABORATORIO:**

2. **TESTIN ALOITUSPÄIVÄMÄÄRÄ:**

3. **TESTIAINE:**

Nimi:

Varastoliuoksen pitoisuus:		mg/l aineena
Alkupitoisuus väliaineessa, t_o:		mg/l aineena
	:	mg DOC/l

4. **MERIVESI:**

Lähteet:

Keräyspäivä:

Näytteenottosyvyys:

Ulkonäkö keruuhetkellä (sameus jne.):

Suolaisuus keruuhetkellä:	‰
Lämpötila keruuhetkellä:	°C
DOC ”x” tuntia keruun jälkeen:	mg/l

Esikäsittely ennen testausta (esimerkiksi suodatus, sedimentointi, vanhentaminen jne.):

Pesäkeluku	— alkuperäinen näyte:	pesäkettä/ml
	— testin alussa:	pesäkettä/ml

Muut ominaisuudet:

5. **HIILIMÄÄRITYKSET:**

Hiilianalysaattori:

	Pullon nro:		DOC n päivän kuluttua (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testi: ravinnerikastettu merivesi, jossa testiainetta	1	a_1					
		a_2					
		keskiarvo, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		keskiarvo, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Pullon nro:		DOC n päivän kuluttua (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Nollanäyte: ravinnerikastettu merivesi, ilman testiainetta	1	c_1					
		c_2					
		keskiarvo, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		keskiarvo, $C_{d(t)}$					
	keskiarvo, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **RAAKATIETOJEN ARVIOINTI:**

Pullon nro:	Tulosten laskeminen	Prosentuaalinen hajoaminen n päivän jälkeen				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Keskiarvo (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Jos D_1- ja D_2-arvojen ero on suuri, arvojen keskiarvoa ei pidä käyttää.

Huomautus: Arvioitaessa hajoamista ominaisanalyysilla sekä vertailuaineiden ja myrkyllisyyskontrollien osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

7. **ABIOOTTINEN HAJOAVUUS (valinnainen)**

	loppupiste	
	0	t
Steriilin vertailunäytteen DOC-pitoisuus (mg/l)	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Lisäys 3

Teoreettisen biokemiallisen hapenkulutuksen laskeminen

SULJETTU PULLO -MENETELMÄ

Aineen $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$, jonka molekyylipaino (MW) on x, ThOD-arvo lasketaan seuraavasti:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Tässä laskelmassa oletetaan, että C mineralisoituu CO_2:ksi, H mineralisoituu H_2O:ksi, P P_2O_5:ksi ja Na Na_2O:ksi. Halogeeni eliminoituu vetyhalidina ja typpi ammoniakkina.

Esimerkki:

Glukoosi $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \ \ mg\ O_2/mg\ glucose$$

Muiden kuin alkalimetallien suolojen molekyylipainot lasketaan olettaen, että suolat ovat hydrolysoituneet.

Rikin oletetaan hapettuvan siten, että sen hapetusluvuksi tulee + 6.

Esimerkki:

Natrium-n-dodekyylibentseenisulfonaatti $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \ \ mg\ O_2/mg\ substance$$

Typpeä sisältävien aineiden yhteydessä typpi voi eliminoitua ammoniakiksi, nitriitiksi tai nitraatiksi erilaisen teoreettisen biokemiallisen hapenkulutuksen mukaan.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

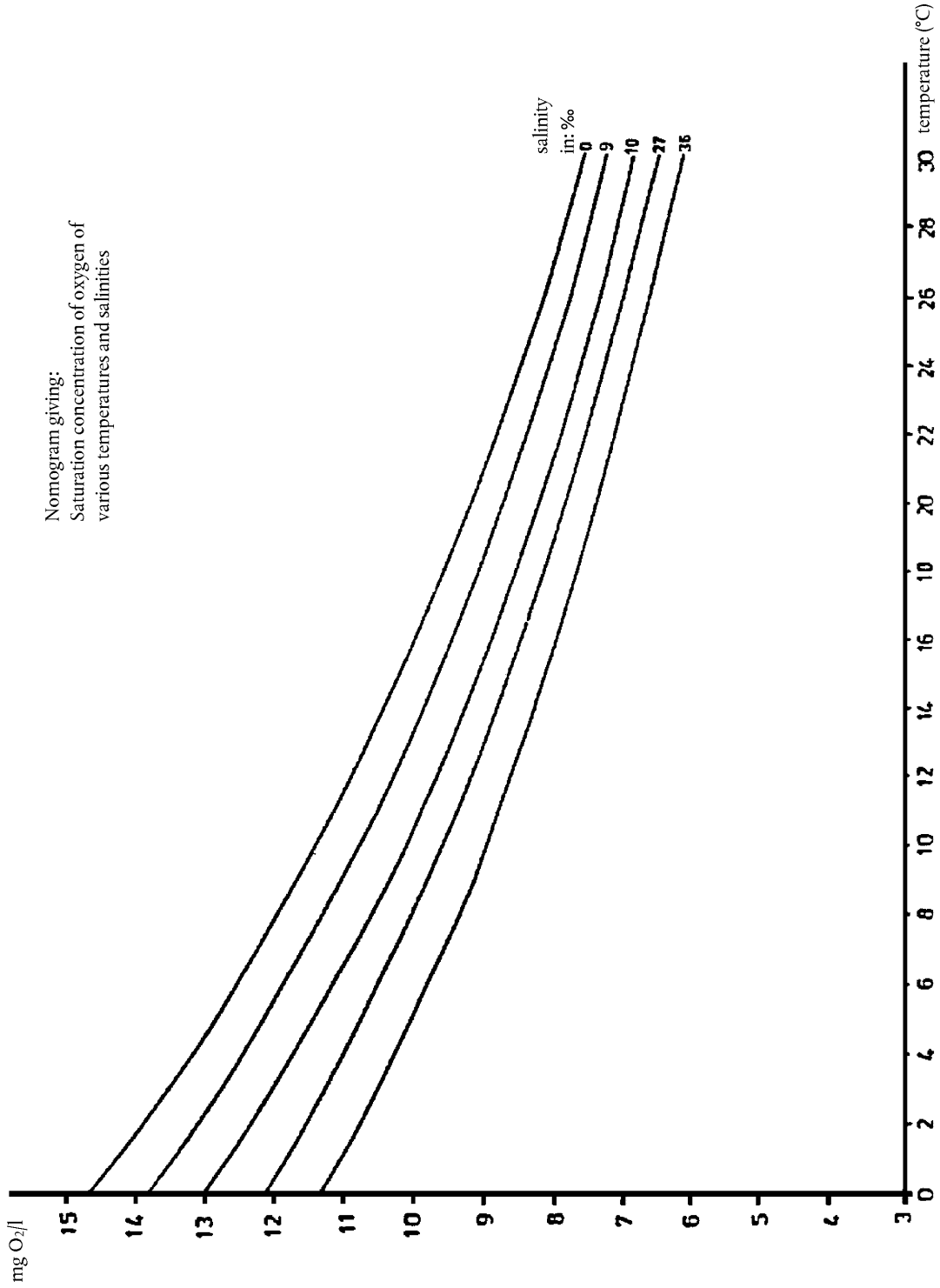
Oletetaan, että sekundäärisen amiinin tapauksessa analyysissa on havaittu täydellinen nitrifikaatio:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \ \ mg\ O_2/mg\ substance$$

▼**M6**

Lisäys 4


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of
various temperatures and salinities
salinity
in: ‰
0
9
10
27
36
mg O2/l
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
temperature (°C)

▼**M6**

Lisäys 5

Biohajoavuus merivedessä

SULJETTU PULLO -MENETELMÄ

TIETOLOMAKE

1. **LABORATORIO:**

2. **TESTIN ALOITUSPÄIVÄMÄÄRÄ:**

3. **TESTIAINE:**

Nimi:

Varastoliuoksen pitoisuus:	mg/l
Alkuperäinen pit. merivesiväliaineessa:	mg/l
ThOD tai COD:	mg O_2/mg testiainetta

4. **MERIVESI:**

Lähteet:

Keräyspäivä:

Näytteenottosyvyys:

Ulkonäkö keruuhetkellä (sameus jne.):

Suolaisuus keruuhetkellä:	‰
Lämpötila keruuhetkellä:	°C
DOC ”x” tuntia keruun jälkeen:	mg/l

Esikäsittely ennen testausta (esimerkiksi suodatus, sedimentointi, vanhentaminen jne.)

Pesäkeluku	— alkuperäinen näyte:	pesäkettä/ml
	— testin alussa:	pesäkettä/ml

Muut ominaisuudet:

5. **TESTIVÄLIAINE:**

Lämpötila ilmastuksen jälkeen:	°C
O_2-pitoisuus ilmastuksen ja seisottamisen jälkeen ennen testin alkamista:	mg O_2/l

6. **DO-MÄÄRITYS:**

Menetelmä: Winkler/elektrodi

	Pullon nro:		mg O_2/l n päivän kuluttua			
			0	5	15	28
Testi: Ravinnerikastettu merivesi, jossa on testiainetta	1	a_1				
	2	a_2				
	Testin keskiarvo	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	Pullon nro:		mg O_2/l n päivän kuluttua			
			0	5	15	28
Nollanäyte: Ravinne-rikastettu merivesi ilman testiainetta	1	c_1				
	2	c_2				
	Nollanäytteen keskiarvo	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Huomautus: Vertailuaineiden ja myrkyllisyyskontrollien osalta tiedot voidaan esittää samalla tavoin kuin tässä.

7. **DO-VÄHENNYS: PROSENTUAALINEN HAJOAMINEN (% D):**

	DO-vähennys n päivän kuluttua		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ ([1])			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)([1])}{test\ \ substance(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

([1]) Tässä oletetaan, että $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, jossa
$m_{b(o)}$ = nolla-arvo päivänä 0,
$m_{t(o)}$ = testiaineen arvo päivänä 0.
Jos $m_{b(o)}$ ei ole yhtä kuin $m_{t(o)}$, käytä kaavaa $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, jossa
$m_{b(x)}$ = nolla-arvo päivänä x,
$m_{t(x)}$ = testiaineen arvo päivänä x.

▼M6

C.43. ORGAANISTEN AINEIDEN ANAEROBINEN BIOHAJOAVUUS MÄDÄTYSLIETTEESSÄ: MITTAUSKOHTEENA KAASUNTUOTANTO

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 311 (2006). On olemassa koko joukko seulontatestejä, joilla arvioidaan orgaanisten aineiden aerobista biohajoavuutta (testimenetelmät C.4, C.9, C.10 ja C.11 (1) ja OECD:n testiohje (TG) nro 302C (2)). Näiden menetelmien soveltamisesta saatuja tuloksia on käytetty menestyksekkäästi ennustettaessa aineiden käyttäytymistä aerobisessa ympäristössä ja etenkin jätevedenkäsittelyn aerobisissa vaiheissa. Myös erisuuruisia määriä veteen liukenemattomia aineita sekä sellaisia aineita, jotka adsorboituvat jäteveden kiinteään ainekseen, käsitellään aerobisesti, koska niitä on selkeytetyssä jätevedessä. Suurempia fraktioita näistä aineista sitoutuu kuitenkin selkeytettyyn lietteeseen, joka erotetaan raakajätevedestä selkeytysaltaissa, ennen kuin selkeytetty tai supernatantti jätevesi käsitellään aerobisesti. Liete, joka sisältää joitakin liukenevia aineita huokosnesteessä, ohjataan sen jälkeen lämmitettyyn mädätyslaitokseen anaerobista käsittelyä varten. Tällä hetkellä ei ole testejä, joilla arvioidaan anaerobista biohajoavuutta anaerobisissa mädätyslaitoksissa, ja tämän testin tarkoituksena on täyttää tämä aukko. Se ei ole välttämättä sovellettavissa ympäristön muihin anaerobisiin osa-alueisiin.

2. Respirometrisia tekniikoita, joilla mitataan tuotetun kaasun, pääasiassa metaanin (CH_4) ja hiilidioksidin (CO_2), määriä anaerobisissa olosuhteissa, on käytetty menestyksekkäästi anaerobisen biohajoavuuden arvioinnissa. Birch ja muut (3) arvioivat nämä menetelmät ja totesivat, että Sheltonin ja Tiedjen (4) työ, joka perustui aiempiin tutkimuksiin (5)(6)(7), oli kattavin. Tällä menetelmällä (4), jonka kehittämistä muut jatkoivat (8) ja josta on tullut amerikkalainen standardi (9)(10), ei kuitenkaan ratkaistu ongelmia, jotka liittyivät CO_2:n ja CH_4:n erilaisiin liukoisuuksiin testiväliaineessa ja testiaineen teoreettisen kaasuntuotannon laskemiseen. ECETOCin raportissa (3) suositeltiin, että lisäksi mitataan supernatanttinesteen liuenneen epäorgaanisen hiilen pitoisuus. Tämän ansiosta tekniikkaa voitiin alkaa soveltaa laajemmin. ECETOCin menetelmä kalibroitiin kansainvälisesti (tai sille tehtiin rengastesti), ja siitä tuli ISO-standardi, ISO 11734 (11).

3. Tässä ISO 11734 -standardiin (11) perustuvassa testimenetelmässä kuvataan seulontamenetelmä, jolla voidaan arvioida orgaanisten aineiden mahdollista anaerobista biohajoavuutta tietyissä olosuhteissa (ts. anaerobisessa mädätyslaitteistossa tiettynä aikana, kun mikro-organismien pitoisuus vaihtelee). Koska testissä käytetään laimennettua lietettä, jossa on melko suuri pitoisuus testiainetta, ja koska testi kestää yleensä pidempään kuin mikä on lietteen retentioaika anaerobisissa mädätyslaitteissa, testin olosuhteet eivät välttämättä vastaa anaerobisten mädätyslaitteiden olosuhteita, eikä sitä voida soveltaa orgaanisten aineiden anaerobisen biohajoavuuden arviointiin, kun ympäristöolosuhteet ovat erilaiset. Liete altistetaan testiaineelle jopa 60 päivän ajaksi, mikä on pitempi aika kuin lietteen normaali retentioaika (25–30 päivää) anaerobisissa mädätyslaitteistoissa, joskin teollisuudessa retentioajat voivat olla paljon pidemmät. Tämän testin tulosten perusteella ei voida tehdä yhtä vakuuttavia ennusteita kuin aerobisen biohajoavuuden yhteydessä: testiaineiden käyttäytymisestä ”nopeissa” aerobisissa testeissä sekä simulaatiotesteissä ja aerobisessa ympäristössä kertyneitä todisteita on riittävästi, jotta voidaan luotettavasti todeta, että yhteys on olemassa. Samankaltaisia todisteita anaerobisesta ympäristöstä on sen sijaan vähän. Anaerobisen biohajoavuuden voidaan olettaa olevan täydellistä, jos teoreettisesta kaasuntuotannosta saavutetaan 75–80 prosenttia. Näissä testeissä käytetyt suuret aineen ja biomassan väliset suhteet tarkoittavat, että aine, joka läpäisee testin, todennäköisesti hajoaa anaerobisessa mädätyslaitteistossa. Lisäksi aineet, joita ei onnistuta muuttamaan kaasuksi testissä, eivät välttämättä kestä, kun aineen ja biomassan suhteet ovat ympäristön kannalta realistisemmat. Myös muita sellaisia

▼M6

anaerobisia reaktioita tapahtuu, joissa aineet hajoavat ainakin osittain (esimerkiksi deklorinaatiossa), mutta tällä testillä näitä reaktioita ei havaita. Aineen häviämistä voidaan kuitenkin seurata soveltamalla tiettyjä analyysimenetelmiä testiaineen määrittämiseen (ks. 6, 30, 44 ja 53 kohta).

TESTIN PERIAATE

4. Pesty mädätetty liete ([1]), joka sisältää pieniä (< 10 mg/l) pitoisuuksia epäorgaanista hiiltä, laimennetaan noin kymmenkertaisesti, kunnes kokonaiskiintoainepitoisuus on 1–3 g/l. Sen jälkeen lietettä inkuboidaan sinetöidyissä astioissa, joissa testiainetta on 20–100 mg C/l, 35 °C:ssa (± 2 °C) enintään 60 päivän ajan. Lietteen aktiivisuuden mittaamisessa on käytettävä rinnakkaisia nollakontrolleja, joiden väliaineessa on lietesiirrosainetta mutta ei testiainetta.

5. Astioista mitataan kaasutilan paineen lisääntyminen, joka johtuu hiilidioksidin ja metaanin tuotannosta. Tuotetusta CO_2:sta liukenee hyvin paljon nestefaasiin, tai se muuttuu karbonaatiksi tai vetykarbonaatiksi testin olosuhteissa. Tämä epäorgaaninen hiili mitataan testin lopussa.

6. Testiaineen biohajoavuudesta syntyvän hiilen (epäorgaaninen ja metaani) määrä lasketaan nestefaasin nettokaasuntuotannon ja epäorgaanisen hiilen nettomuodostumisen perusteella nollakontrolliarvojen lisäksi. Biohajoavuuden laajuus lasketaan tuotetun epäorgaanisen hiilen ja metaanihiilen kokonaispitoisuuden perusteella prosenttiosuutena testiaineena lisätyn hiilen mitatusta tai lasketusta määrästä. Biohajoavuuden etenemistä voidaan seurata tekemällä välimittauksia vain kaasuntuotannosta. Lisäksi primaarinen biohajoavuus voidaan määrittää ominaisanalyyseilla testin alussa ja lopussa.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

7. Testiaineen puhtauden, vesiliukoisuuden sekä haihtuvuus- ja adsorptio-ominaisuuksien on oltava tiedossa, jotta tulokset voidaan tulkita oikein. Testiaineen orgaanisen hiilen pitoisuus (painoprosenttina) on tiedettävä joko sen kemiallisen rakenteen tai mittauksen perusteella. Haihtuvien testiaineiden osalta mitatusta tai lasketusta Henryn lain vakiosta on apua päätettäessä, voidaanko testiä soveltaa tietyssä tapauksessa. Tiedot testiaineen myrkyllisyydestä anaerobisille bakteereille ovat hyödyllisiä, kun valitaan sopivaa testipitoisuutta ja kun tulkitaan tuloksia, joiden mukaan biohajoavuus on heikko. On suositeltavaa käyttää myös inhibitiokontrollia, ellei tiedetä, ettei testiaine inhiboi anaerobisten mikrobien toimintaa (ks. 21 kohta ja ISO 13641-1 (12)).

([1]) Mädätetty liete on seos, joka muodostuu selkeytetystä jätevedestä ja aktiivilietteestä, kun niitä on inkuboitu anaerobisessa mädätyslaitteistossa noin 35 °C:ssa biomassan ja hajuongelmien vähentämiseksi ja lietteen vedenpoistokyvyn parantamiseksi. Se koostuu hiilidioksidia ja metaania tuottavien anaerobisten fermentatiivisten ja metanogeenisten bakteerien assosioitumisesta.

▼M6

TESTIMENETELMÄN SOVELLETTAVUUS

8. Testimenetelmää voidaan soveltaa vesiliukoisiin aineisiin. Sitä voidaan soveltaa myös heikosti liukeneviin ja liukenemattomiin aineisiin, kunhan käytetään tarkan annostelun takaavaa menetelmää (ks. esimerkiksi ISO 10634 (13)). Haihtuvien aineiden osalta päätös on tehtävä yleensä tapauskohtaisesti. Tiettyihin toimiin on kenties ryhdyttävä esimerkiksi siksi, ettei kaasua vapaudu testin aikana.

VERTAILUAINEET

9. Menetelmän tarkistamiseksi vertailuainetta testataan valmistamalla asianmukaiset astiat normaalien testiajojen rinnalle. Vertailuaineina voidaan käyttää esimerkiksi fenolia, natriumbentsoaattia ja polyetyleeniglykoli 400:aa, ja niiden hajoavuuden oletetaan olevan yli 60 prosenttia teoreettisesta kaasuntuotannosta (ts. metaani ja epäorgaaninen hiili) 60 päivän aikana (3) (14)).

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

10. Kansainvälisessä rengastestissä (14) kaasunpaineen mittausten (kolmet astiat) toistettavuus oli hyvä. Suhteellinen keskihajonta (variaatiokerroin, COV) oli valtaosin alle 20 prosenttia, joskin tämä arvo suureni usein yli 20 prosenttiin myrkyllisten aineiden yhteydessä tai 60 päivän inkubaatiojakson loppua kohti. Suurempaa hajontaa tavattiin myös tilavuudeltaan alle 150 ml:n astioiden yhteydessä. Testiväliaineiden lopulliset pH-arvot olivat välillä 6,5–7,0.

11. Rengastestissä saatiin seuraavassa taulukossa esitetyt tulokset.

Testiaine	Koko aineisto n_1	Keskim. hajoavuus (koko aineistosta) (%)	Suhteellinen keskihajonta (koko aineistosta) (%)	Validi aineisto n_2	Keskim. hajoavuus (validista aineistosta) (%)	Suhteell. keskihajonta (validista aineistos-ta) (%)	Aineisto > 60 % hajoavuus valideissa testeissä n_3
Palmitiinihappo	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyeteeniglykoli 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Osuus $n_{2:sta}$

12. Kaikkien palmitiinihaposta ja polyeteeniglykoli 400:sta saatujen arvojen keskiarvon variaatiokertoimet olivat jopa 45 prosenttia (n = 36) ja 3 prosenttia (n = 38). Kun laskelmista poistettiin arvot, jotka olivat < 40 prosenttia ja > 100 prosenttia (edellisen arveltiin johtuvan suboptimaalisista olosuhteista, jälkimmäisen tuntemattomista syistä), variaatiokertoimet pienenivät 26 prosenttiin ja 23 prosenttiin. ”Validien” arvojen (jolloin hajoavuus oli vähintään 60 prosenttia) osuus oli palmitiinihapon osalta 70 prosenttia ja polyeteeniglykoli 400:n osalta 83 prosenttia. DIC-mittauksista johdetut biohajoavuuden prosenttiosuudet olivat melko pienet mutta vaihtelevat. Palmitiinihapon osalta vaihteluväli oli 0–35 prosenttia, keskiarvo 12 prosenttia ja variaatiokerroin 92 prosenttia. Polyeteeniglykoli 400:n osalta vaihteluväli oli 0–40 prosenttia, keskiarvo 24 prosenttia ja variaatiokerroin 54 prosenttia.

TESTIMENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

13. Testissä tarvitaan tavallinen laboratoriolaitteisto ja seuraavat välineet:

a. Inkubaattori – kipinänkestävä, lämpötilaksi säädetty 35 °C ± 2 °C.

▼M6

b. Paineenkestäviä lasisia testiastioita, joiden nimelliskoko on sopiva ([1]) ja joista jokaisessa on kaasutiivis tulppa, joka kestää noin kahden baarin paineen. Kaasutilan tilavuuden tulisi olla noin 10–30 prosenttia kokonaistilavuudesta. Jos biokaasua vapautetaan säännöllisesti, noin 10 prosentin kaasutilan tilavuus on sopiva, mutta jos kaasua vapautetaan vasta testin lopussa, 30 prosentin tilavuus on sopiva. Jos painetta lasketaan ulos jokaisella näytteenottokerralla, testissä suositellaan käytettäväksi lasisia seerumipulloja, joiden nimellistilavuus on 125 ml ja kokonaistilavuus noin 160 ml ja jotka voidaan sulkea seerumitulpalla ([2]) ja reunatuilla alumiinirenkailla.

c. Paineenmittauslaite ([3]), jolla voi sekä mitata että ilmata tuotettua kaasua; esimerkiksi kädessä pidettävä tarkkuuspainemittari, johon on liitetty sopiva injektioneula. Kaasutiiviin kolmitieventtiilin avulla voidaan poistaa liiallista painetta (lisäys 1). Paineanturin putken ja venttiilin sisäisen tilavuuden tulee olla mahdollisimman pieni, jotta virheet, jotka aiheutuvat laitteiston tilavuuden huomiotta jättämisestä, ovat merkityksettömiä.

Huomio – Painelukemia käytetään suoraan kaasutilassa tuotetun hiilen määrän laskemiseksi (42–44 kohta). Vaihtoehtoisesti painelukemat voidaan muuntaa tuotetun kaasun tilavuuksiksi (35 °C:ssa, ilmanpaine) käyttämällä muuntokaavaa. Kaava muodostuu tiedoista, jotka saadaan injektoimalla tietty tilavuus typpikaasua testiastioihin (esimerkiksi seerumipulloihin) lämpötilassa 35 ° +/– 2 °C ja kirjaamalla muistiin tulokseksi saadut tasapainottuneet painelukemat (ks. lisäys 2). Laskentatapa kuvataan 44 kohdassa olevassa huomautuksessa.

Varoitus – Ole varovainen, jos käytät mikroruiskuja, jotta et saa neulanpistovammoja.

d. Hiilianalysaattori, jolla voidaan määrittää epäorgaaninen hiili suoraan vaihteluvälillä 1–200 mg/l.

e. Ruiskuja, joiden tarkkuus on suuri, kaasu- ja nestenäytteitä varten

f. Magneettisekoittimia ja -sauvoja (valinnainen).

g. Hansikaskaappi (suositeltava).

Reagenssit

14. Käytä pelkästään analyysilaatuisia reagensseja.

([1]) Suositeltu koko on 0,1–1 litraa.

([2]) Kaasutiiviiden silikonitulppien käyttö on suositeltavaa. Lisäksi suositellaan, että tulppien, etenkin butyylikumitulppien, kaasutiiviys testataan, koska monet kaupallisesti saatavilla olevat tulpat eivät ole riittävän tiiviitä metaanin suhteen, ja jotkin tulpat eivät pysy tiiviinä, kun ne puhkaistaan neulalla testiolosuhteissa.

([3]) Laitetta tulisi käyttää ja se olisi kalibroitava säännöllisin väliajoin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Jos testissä käytetään kuvatun mukaista painemittaria (esimerkiksi sellaista, jossa on teräskalvo), sitä ei tarvitse kalibroida laboratoriossa. Kalibroinnin tarkkuus voidaan tarkistaa laboratoriossa yksipistemittauksella 1×10^5 Pa:n paineella sellaisella painemittarilla, jossa on mekaaninen näyttö. Kun tämä piste mitataan oikein, myös lineaarisuus pysyy muuttumattomana. Jos testissä käytetään muita mittauslaitteita (joilla ei ole valmistajan sertifioimaa kalibrointia), kalibrointi on suositeltavaa tehdä koko asteikolla säännöllisin väliajoin.

▼M6

Vesi

15. Tislattu tai deionisoitu vesi (josta on poistettu happi syöttämällä siihen typpikaasua ja joka sisältää vähemmän kuin 5 µl/l happea), joka sisältää liuennutta orgaanista hiiltä vähemmän kuin 2 mg/l.

Testiviljelyaine

16. Valmista laimennusväliaine, joka sisältää ilmoitetut määrät seuraavia ainesosia:

Vedetön kaliumdivetyfosfaatti (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatriumvetyfosfaattidodekahydraatti ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Ammoniumkloridi (NH_4Cl)	0,53 g
Kalsiumkloridihydraatti ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Magnesiumkloridiheksahydraatti ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Rauta(II)kloriditetrahydraatti ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resatsuriini (happi-indikaattori)	0,001g
Natriumsulfidinonahydraatti ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Hivenaineiden varastoliuokset (valinnainen, 18 kohta)	10 ml
Lisää hapetonta vettä (15 kohta)	yhteen litraan saakka

Huomautus: Testissä tulisi käyttää tuoretta natriumsulfidia, tai se on pestävä ja kuivattava ennen käyttöä riittävän pelkistyskyvyn varmistamiseksi. Testi voidaan tehdä käyttämättä hansikaskaappia (ks. 26 kohta). Tässä tapauksessa natriumsulfidin lopullinen pitoisuus väliaineessa tulee suurentaa 0,20 grammaan $Na_2S \cdot 9H_2O$:ta litrassa. Natriumsulfidi voidaan lisätä myös asianmukaisesta anaerobisesta varastoliuoksesta suljettujen testiastioiden tulpan kautta. Näin pienennetään hapettumisen riskiä. Natriumsulfidin tilalla voidaan käyttää titaani(III)sitraattia, joka lisätään suljettujen testiastioiden tulpan kautta lopullisena pitoisuutena, joka on 0,8–1,0 mmol/l. Titaani(III)sitraatti on erittäin tehokas pelkistävä aine, jonka myrkyllisyys on pieni, ja sitä valmistetaan seuraavasti: Liuota 2,94 g trinatriumsitraattidihydraattia 50 ml:aan hapetonta vettä (jotta saat liuoksen, jonka pitoisuus on 200 mmol/l) ja lisää 5 ml 15-prosenttista (p/p) titaani(III)kloridiliuosta. Neutraloi liuos pH-arvoon 7 ± 0,2 mineraaliemäksellä ja laita se sopivaan astiaan typpivirtauksen alla. Tässä varastoliuoksessa titaani(III)sitraatin pitoisuus on 164 mmol/l.

17. Sekoita testiväliaineen muut ainesosat paitsi pelkistävä aine (natriumsulfidi-titaanisitraatti) ja syötä liuokseen typpikaasua noin 20 minuutin ajan hieman ennen käyttöä hapen poistamiseksi. Lisää sen jälkeen tuoreeseen liuokseen tarkoituksenmukainen määrä pelkistävää ainetta (valmistettu hapettomassa vedessä) hieman ennen väliaineen käyttöä. Säädä väliaineen pH tarvittaessa laimennetulla mineraalihapolla tai emäksellä arvoon 7 ± 0,2.

▼M6

Hivenaineiden varastoliuos (valinnainen)

18. On suositeltavaa, että testiväliaine sisältäisi seuraavia hivenaineita anaerobisen hajoamisprosessin edistämiseksi etenkin, jos siirrosainetta käytetään pieninä pitoisuuksina (esimerkiksi 1 g/l) (11).

Manganeesikloriditetrahydraatti ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Boorihappo (H_3BO_3)	5 mg
Sinkkikloridi ($ZnCl_2$)	5 mg
Kupari(II)kloridi ($CuCl_2$)	3 mg
Dinatriummolybdaattidihydraatti ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Kobolttikloridiheksahydraatti ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nikkelikloridiheksahydraatti ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dinatriumseleniitti (Na_2SeO_3)	5 mg
Lisää hapetonta vettä (15 kohta)	yhteen litraan saakka

Testiaine

19. Lisää testiaine varastoliuoksena, suspensiona, emulsiona tai suoraan kiinteänä aineena tai nesteenä taikka lasikuitusuodattimeen absorboituna, jotta saat pitoisuuden, joka sisältää enintään 100 mg/l orgaanista hiiltä. Jos käytät varastoliuoksia, valmista siitä veden kanssa sopiva liuos (15 kohta) (josta on poistettu happi aiemmin typpikaasua syöttämällä), jonka vahvuus on sellainen, että lisätty tilavuus on vähemmän kuin viisi prosenttia reaktioseoksen kokonaistilavuudesta. Säädä varastoliuoksen pH:ksi tarvittaessa 7 ± 0,2. Katso ISO 10634 -standardista (13) veteen huonosti liukenevia testiaineita koskevia lisäohjeita. Jos käytät liuotinta, valmista lisäkontrolli, jossa liuotinta lisätään ainoastaan siirrosainetta sisältävään väliaineeseen. Sellaisten orgaanisten liuottimien, joiden tiedetään estävän metaanin tuotantoa, kuten kloroformin ja hiilitetrakloridin, käyttöä tulee välttää.

Varoitus – Käsittele varovasti myrkyllisiä testiaineita ja sellaisia aineita, joiden ominaisuudet eivät ole tiedossa.

Vertailuaineet

20. Esimerkiksi natriumbentsoaatin, fenolin ja polyetyleeniglykoli 400:n kaltaisia vertailuaineita on käytetty menetelmän tarkistamisessa menestyksekkäästi, ja ne hajoavat yli 60-prosenttisesti 60 päivän aikana. Valmista valitusta vertailuaineesta varastoliuos (hapettomassa vedessä) samaan tapaan kuin testiaineesta ja säädä pH:ksi tarvittaessa 7 ± 0,2.

Inhibitiokontrolli (valinnainen)

21. Jotta saadaan tietoa testiaineen myrkyllisyydestä anaerobisille mikro-organismeille ja jotta myös sopivin testipitoisuus voidaan valita, lisää testiainetta ja vertailuainetta astiaan, joka sisältää testiväliainetta (ks. 16 kohta), kumpaakin samoina pitoisuuksina kuin niitä on lisätty (ks. 19 ja 20 kohta sekä ISO 13641-1 -standardi (12)).

▼M6

Mädätetty liete

22. Kerää mädätettyä lietettä sellaisen jätteenkäsittelylaitoksen mädätyslaitteistosta, jossa käsitellään pääasiassa talousjätevettä. Lietettä tulee luonnehtia kattavasti, ja sen taustatiedot on raportoitava (ks. 54 kohta). Jos testissä on määrä käyttää muokattua siirrosainetta, voidaan harkita myös teollisuusjätevedenkäsittelylaitoksesta peräisin olevaa mädätettyä lietettä. Käytä mädätetyn lietteen keräämiseen leveäkaulaisia pulloja, jotka on valmistettu suurtiheyspolyeteenistä (HDPE:stä) tai vastaavasta, laajenevasta materiaalista. Täytä pullot lietteellä noin yhden cm:n päähän pullonsuusta ja sulje ne tiiviisti mieluiten varoventtiilillä. Laboratorioon kuljettamisen jälkeen kerätty liete voidaan käyttää välittömästi tai laittaa laboratoriotason mädättimeen. Vapauta liiallinen biokaasu avaamalla lietepullot varovasti. Vaihtoehtoisesti siirrosaineen lähteenä voidaan käyttää laboratoriossa kasvatettua anaerobista lietettä, mutta sen toimintakirjo on voinut heikentyä.

Varoitus – Mädätetty liete sisältää syttyviä kaasuja, joista aiheutuu tulipaloja räjähdysriskejä. Niissä voi olla myös patogeenisia organismeja, joten noudata asianmukaisia varotoimia lietettä käsitellessäsi. Älä kerää lietettä lasiastioihin turvallisuussyistä.

23. Taustakaasun tuotannon vähentämiseksi ja nollakontrollien vaikutuksen pienentämiseksi lietteen esimädätystä on syytä harkita. Jos esimädätys on tarpeen, lietteen on annettava mädätä lisäämättä ravinteita tai substraatteja 35 °C:ssa (± 2 °C) enintään seitsemän päivän ajan. On todettu, että noin viiden päivän mittainen esimädätys vähentää kaasuntuotantoa nollanäytteessä ihanteellisesti ilman, että joko lag-vaihe tai inkubointivaihe pidentyisivät liikaa testivaiheen aikana tai että aktiivisuus vähenisi ainakaan muutaman testatun aineen osalta.

24. Lietteen esialtistusta testiaineelle kannattaa harkita sellaisten aineiden yhteydessä, jotka ovat tai joiden oletetaan olevan heikosti biohajoavia, jotta saadaan paremmin mukautettu siirrosaine. Tässä tapauksessa lisää testiainetta (kun orgaanisen hiilen pitoisuus on 5–20 mg/l) mädätettyyn lietteeseen ja inkuboi sitä enintään kaksi viikkoa. Pese esialtistettu liete huolellisesti ennen käyttöä (ks. 25 kohta) ja ilmoita testiraportissa esialtistuksen olosuhteet.

Siirrosaine

25. Pese liete (ks. 22–24 kohta) juuri ennen käyttöä, jotta lopullisen testisuspension epäorgaanisen hiilen pitoisuus on pienempi kuin 10 mg/l. Sentrifugoi liete suljetuissa putkissa (esimerkiksi 3 000 g, 5 min) ja poista supernatantti. Suspendoi pelletti hapettomaan väliaineeseen (16 ja 17 kohta), sentrifugoi suspensio uudelleen ja poista supernatanttineste. Jos epäorgaanisen hiilen pitoisuus ei ole pienentynyt tarpeeksi, lietteen pesumenettelyn voi toistaa enintään kaksi kertaa. Tämä ei näytä vaikuttavan mikro-organismeihin haitallisesti. Suspendoi pelletti lopuksi testiväliaineen tarvittavaan tilavuuteen ja määritä kiintoaineiden kokonaispitoisuus [esimerkiksi ISO 11923 (15)]. Testiastioiden kiintoaineiden lopullisen kokonaispitoisuuden tulisi olla 1–3 g/l (tai noin 10 prosenttia laimentamattoman mädätetyn lietteen pitoisuudesta). Tee edellä mainitut toimenpiteet siten, että liete on mahdollisimman vähän kosketuksissa happeen (käytä esimerkiksi typpi-ilmakehää).

▼**M6**

TESTAUSMENETTELY

26. Tee seuraavat alustavat toimenpiteet käyttämällä tekniikoita, joilla mädätetty liete on niin vähän kosketuksissa hapen kanssa kuin käytännöllisesti on mahdollista. Voi olla tarpeen työskennellä esimerkiksi hansikaskaapissa käyttämällä typpi-ilmakehää ja/tai puhdistaa pullot typellä (4).

Testin ja kontrollitestien valmistelu

27. Valmistele ainakin kolmet testiastiat (ks. 13b kohta) testiaineelle, nollakontrolleille, vertailuaineelle, inhibitiokontrolleille (ehdollinen) ja paineensäätökammioille (valinnainen menettely) (ks. 7 ja 19–21 kohta). Voit valmistella myös ylimääräiset astiat primaarisen biohajoavuuden arviointiin, jossa käytetään testiaineen ominaisanalyyseja. Samaa nollakontrollisarjaa voidaan käyttää useille testiaineille samassa testissä, kunhan kaasutilan tilavuudet ovat yhdenmukaiset.

28. Valmistele laimennettu siirrosaine ja lisää se sen jälkeen astioihin esimerkiksi leveäsuisella pipetillä. Lisää alikvootit hyvin sekoitetusta siirrosaineesta (25 kohta), jotta kiintoaineiden kokonaispitoisuus on sama kaikissa astioissa (1–3 g/l). Lisää testi- ja vertailuaineen varastoliuokset sen jälkeen, kun pH:ksi on säädetty 7 ± 0,2, jos tarpeen. Testiaine ja vertailuaine on lisättävä käyttämällä sopivinta annostelutapaa (19 kohta).

29. Orgaanisen hiilen testipitoisuuden tulisi yleensä olla 20–100 mg/l (4 kohta). Jos testiaine on myrkyllinen, testipitoisuutta tulee pienentää arvoon 20 mg C/l tai vielä pienemmäksi, jos tarkoituksena on mitata vain primaarinen biohajoavuus ominaisanalyyseilla. Todettakoon, että testitulosten vaihtelu lisääntyy pienemmillä testipitoisuuksilla.

30. Lisää nollanäyteastioihin se määrä kantoainetta, jonka verran testiainetta annosteltiin varastoliuoksen, suspension tai emulsion sijasta. Jos testiainetta annosteltiin lasikuitusuodattimia tai orgaanisia liuottimia käyttäen, lisää nollanäytteisiin suodatin tai se määrä liuotinta, joka on haihtunut. Valmistele testiaineesta ylimääräinen rinnakkaisnäyte pH-arvon mittaamista varten. Säädä pH:ksi 7 ± 0,2, jos tarpeen, pienellä määrällä laimennettua mineraalihappoa tai -emästä. Kaikkiin testiastioihin tulee lisätä samat määrät neutraloivia aineita. Näitä aineita ei yleensä tarvitse lisätä, koska testi- ja vertailuaineiden varastoliuosten pH on jo säädetty (ks. 19 ja 20 kohta). Jos tarkoitus on mitata primaarinen hajoavuus, pH-kontrolliastiasta tai ylimääräisestä testiastiasta on otettava asianmukainen näyte, ja testiaineen pitoisuus on mitattava ominaisanalyyseja käyttäen. Kaikkiin testiastioihin voi lisätä päällystetyn magneetin, jos reaktioseoksia täytyy sekoittaa (valinnainen).

31. Varmista, että nesteen kokonaistilavuus V_l ja kaasutilan tilavuus V_h ovat samat kaikissa astioissa. Tarkista V_l- ja V_h-arvot ja merkitse ne muistiin. Kukin astia on suljettava kaasutulpalla ja siirrettävä hansikaskaapista (ks. 26 kohta) inkubaattoriin (ks. 13a kohta).

▼M6

Liukenemattomat testiaineet

32. Lisää punnitut määrät aineita, jotka liukenevat huonosti veteen, suoraan valmisteltuihin astioihin. Kun liuottimen käyttö on tarpeen (ks. 19 kohta), siirrä testiaineliuos tai -suspensio tyhjiin astioihin. Mikäli mahdollista, haihduta liuotin syöttämällä astioihin typpikaasua ja lisää sen jälkeen muut ainesosat eli laimennettu liete (25 kohta) ja hapeton vesi tarpeen mukaan. Myös ylimääräinen liuotinkontrolli on valmisteltava (ks. 19 kohta). Lisätietoja muista menetelmistä, joilla liukenemattomia aineita voidaan lisätä, on ISO 10634 -standardissa (13). Nestemäisiä testiaineita voidaan annostella ruiskulla valmiisiin suljettuihin astioihin, jos oletetaan, että alkuperäinen pH-arvo on enintään 7 ± 1. Muussa tapauksessa aine annostellaan edellä kuvatulla tavalla (ks. 19 kohta).

Inkubointi ja kaasunpaineen mittaukset

33. Inkuboi valmisteltuja astioita lämpötilassa 35 °C ± 2 °C noin tunnin ajan, jotta liete tasapainottuu ja liiallinen kaasu purkautuu ilmakehään. Ravistele jokaista astiaa vuorotellen, paina painemittarin neula (13c kohta) tulpan läpi ja avaa venttiiliä, kunnes painemittarin lukema on nolla. Jos kaasutilan paine on tässä vaiheessa tai välimittauksia tehtäessä pienempi kuin ilmakehän paine, astiaan on syötettävä typpikaasua, jotta paine on taas sama kuin ilmakehän paine. Sulje venttiili (ks. 13c kohta) ja jatka inkubointia pimeässä. Varmista, että mädätyslämpötila säilyy kaikissa astioiden osissa. Tarkkaile astioita inkuboinnin jälkeen 24–48 tuntia. Poista astiat testistä, jos astioiden sisältämä supernatanttineste värjäytyy pinkiksi, eli jos resatsuriini (ks. 16 kohta) on muuttanut väriään merkiksi siitä, että astiassa on happea (ks. 50 kohta). Järjestelmä saattaa sietää pieniä määriä happea, mutta isommat pitoisuudet voivat estää anaerobisen biohajoamisen etenemistä voimakkaasti. Satunnaisen yksittäisen astian poistaminen kolmen rinnakkaisnäytteen sarjasta voidaan hyväksyä, mutta jos tällaisia tapauksia ilmenee useammin, koemenettelyt on syytä tutkia, ja testi on toistettava.

34. Sekoita jokaisen astian sisältö huolellisesti sekoittamalla tai ravistamalla astiaa muutamia minuutteja vähintään 2–3 kertaa viikossa ja hieman ennen jokaista paineenmittauskertaa. Ravistaminen suspendoi siirrosaineen uudelleen ja varmistaa kaasutasapainon. Kaikki paineenmittaukset on tehtävä nopeasti, koska testiastioiden lämpötila voi laskea, mikä johtaa vääriin lukemiin. Painetta mitattaessa koko testiastian, kaasutila mukaan luettuna, on pysyttävä mädätyslämpötilassa. Mittaa kaasunpaine esimerkiksi painamalla tulpan läpi injektioneula (13c kohta), joka on liitetty paineenvalvontamittariin. Mittauksessa on oltava huolellinen, jotta injektioneulaan ei pääse vettä. Jos näin käy, märät osat on kuivattava ja laitteistoon on vaihdettava uusi neula. Paine tulee mitata millibaareina (ks. 42 kohta). Astioiden kaasunpaine voidaan mitata säännöllisesti, esimerkiksi viikoittain, ja liiallinen kaasu voidaan valinnaisesti päästää ilmakehään. Vaihtoehtoisesti paine mitataan vain testin päättyessä tuotetun biokaasun määrän määrittämiseksi.

35. Kaasunpaineen välimittaukset ovat suositeltavia, koska paineen suurenemisen avulla saadaan merkkejä siitä, milloin testi olisi lopetettava, ja sen perusteella voidaan seurata myös kinetiikkaa (ks. 6 kohta).

▼M6

36. Yleensä testi lopetetaan 60 päivän inkubaatioajan kuluttua, ellei paineenmittauksista saatu biohajoavuuskäyrä ole saavuttanut tasannevaihetta ennen sitä. Tasannevaihe tarkoittaa, että enimmäishajoavuus on saavutettu ja biohajoavuuskäyrä on tasoittunut. Jos tasannearvo on vähemmän kuin 60 prosenttia, tulkinta on ongelmallista, koska tämä viittaa siihen, että vain osa molekyylistä on mineralisoitunut tai että on tapahtunut virhe. Jos normaalin inkubaatioajan lopussa kaasuntuotanto jatkuu edelleen mutta tasannevaihetta ei selvästi ole saavutettu, on harkittava testin jatkamista, jotta voidaan tarkistaa, saavutetaanko tasanne (>60 prosenttia).

Epäorgaanisen hiilen mittaaminen

37. Anna lietteen asettua testin lopussa viimeisen kaasunpaineen mittauksen jälkeen. Avaa jokainen astia vuorotellen ja ota välittömästi näyte supernatanttinesteen epäorgaanisen hiilen pitoisuuden (mg/l) määrittämistä varten. Supernatanttinestettä ei pidä sentrifugoida eikä suodattaa, koska siinä häviäisi liuennutta hiilidioksidia liikaa, mitä ei voida hyväksyä. Jos nestettä ei voida analysoida heti näytteenoton jälkeen, sitä voidaan säilyttää suljetussa ampullissa (ilman kaasutilaa) jäähdytettynä 4 °C:een enintään kahden päivän ajan. Mittaa pH-arvo ja kirjaa se muistiin epäorgaanisen hiilen mittauksen jälkeen.

38. Vaihtoehtoisesti supernatantin epäorgaanisen hiilen pitoisuus voidaan määrittää epäsuorasti vapauttamalla liuennutta epäorgaanista hiiltä hiilidioksidina, joka voidaan mitata kaasutilasta. Säädä kaasunpaineen viimeisen mittauksen jälkeen jokaisen astian paine ilmakehän paineeseen. Happamoita kunkin astian sisällöt suurin piirtein pH-arvoon 1 lisäämällä suljettujen astioiden tulpan läpi konsentroitua mineraalihappoa (esimerkiksi H_2SO_4:ää). Inkuboi ravistettuja astioita 35 °C:ssa (± 2 °C) noin 24 tuntia ja mittaa muodostuneesta hiilidioksidista syntynyt kaasunpaine painemittarilla.

39. Ota samat lukemat myös nollanäyte- ja vertailuaineastioista sekä tarvittaessa inhibitiokontrolliastioista (ks. 21 kohta).

40. Joissakin tapauksissa – eritoten jos samoja kontrolliastioita käytetään useiden testiaineiden kanssa – testi- ja kontrolliastioiden epäorgaanisen hiilen pitoisuuden välimittauksia on syytä harkita tarpeen mukaan. Tässä tapauksessa kaikkia välimittauksia varten on valmisteltava riittävän monta astiaa. Tämä toimenpide on parempi kuin kaikkien näytteiden ottaminen vain yhdestä astiasta. Jälkimmäinen toimenpide voidaan tehdä vain silloin, jos liuenneen epäorgaanisen hiilen analyysissa tarvittavan tilavuuden ei katsota olevan liian suuri. Liuenneen epäorgaanisen hiilen mittaus tulee tehdä sen jälkeen, kun kaasunpaine on mitattu vapauttamatta liiallista kaasua seuraavassa kuvatulla tavalla:

— Ota mahdollisimman pieni määrä näytteitä supernatantista injektioneulalla tulpan läpi astioita avaamatta ja määritä näytteestä epäorgaanisen hiilen pitoisuus.

— Kun olet ottanut näytteen, voit joko vapauttaa liiallisen kaasun tai olla tekemättä sitä.

— On otettava huomioon, että vaikka supernatantin tilavuus pienenisi vain vähän (esimerkiksi noin yhden prosentin), kaasutilan kaasun tilavuus (V_h) saattaa lisääntyä huomattavasti.

— Yhtälöt (ks. 44 kohta) korjataan suurentamalla arvoa V_h yhtälössä 3 tarvittaessa.

▼M6

Ominaisanalyysit

41. Jos primaarinen anaerobinen hajoaminen (ks. 30 kohta) on tarkoitus määrittää, ota testiainetta sisältävistä astioista tarkoituksenmukainen määrä näytettä ominaisanalyyseja varten testin alussa ja lopussa. Jos analyysit tehdään, huomaa, että kaasutilan (V_h) ja nesteen (V_l) tilavuudet muuttuvat. Ota tämä huomioon kaasuntuotannon tuloksia laskettaessa. Vaihtoehtoisesti näytteet ominaisanalyyseja varten voidaan ottaa ylimääräisistä seoksista, jotka on tehty aiemmin tätä tarkoitusta varten (30 kohta).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

42. Käytännöllisistä syistä kaasunpaine mitataan millibaareina (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), tilavuus litroina ja lämpötila Celsius-asteina.

Kaasutilassa oleva hiili

43. Koska yksi mooli metaania ja yksi mooli hiilidioksidia sisältää kumpikin 12 g hiiltä, hiilen massa tietyssä tilavuudessa muodostunutta kaasua voidaan ilmaista seuraavasti:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Yhtälö [1]}$$

jossa

m = hiilen massa (mg) tietyssä tilavuudessa muodostunutta kaasua

12 = hiilen suhteellinen atomimassa

n = kaasun moolien lukumäärä tietyssä tilavuudessa.

Jos muita kaasuja kuin metaania tai hiilidioksidia (esimerkiksi N_2O:ta) muodostuu huomattavia määriä, kaavaa [1] on muutettava, jotta voidaan kuvata muodostuneiden kaasujen vaikutusten mahdollisuutta.

44. Kaasulakien perusteella n voidaan ilmaista seuraavasti:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Yhtälö [2]}$$

jossa

p = kaasun paine (Pascalia)

V = kaasun tilavuus (m^3)

R = moolinen kaasuvakio [8,314J/(mol K)]

T = inkubaatiolämpötila (Kelviniä).

Yhtälöt [1] ja [2] yhdistämällä ja yksinkertaistamalla voidaan määrittää kaasuntuotanto nollanäytteessä:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Yhtälö [3]}$$

jossa

m_h = kaasuna kaasutilassa tuotetun nettohiilen massa (mg)

Dp = testiastioiden alku- ja loppupaineiden keskimääräinen ero, josta on vähennetty nollanäyteastioiden vastaava keskiarvo (millibaareina)

▼**M6**

V_h = astian kaasutilan tilavuus (l)

0,1 = muuntokerroin muunnettaessa newtonit/m^2 millibaareiksi ja m^3 litroiksi.

Yhtälöä [4] tulee käyttää normaalia inkubaatiolämpötilaa 35 °C (308 K) varten:

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Yhtälö [4]}$$

Huomautus: Vaihtoehtoinen tilavuudenlaskentatapa. Painemittarin lukemat muunnetaan millilitroiksi tuotettua kaasua käyttämällä vakiokäyrää, joka saadaan piirtämällä käyrä injektoidusta tilavuudesta (ml) mittarilukemaan nähden (lisäys 2). Kaasun moolien lukumäärä jokaisen astian kaasutilassa lasketaan jakamalla kumulatiivinen kaasuntuotanto (ml) arvolla 25 286 ml/mooli, joka on yhtä kuin yhden kaasumoolin viemä tilavuus 35 °C:ssa ja ilmakehän paineessa. Koska yksi mooli CH_4:ää ja yksi mooli CO_2:ta sisältää kumpikin 12 g hiiltä, hiilen määrä (mg) kaasutilassa (m_h) saadaan yhtälöstä [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Yhtälö [5]}$$

Yksinkertaistus nollanäytteen kaasuntuotannon laskemiseksi:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Yhtälö [6]}$$

jossa

m_h = kaasuna kaasutilassa tuotetun nettohiilen massa (mg)

DV = testiastioiden ja nollanäyteastioiden kaasutilassa tuotetun kaasun tilavuuden eron keskiarvo

25286 = yhden kaasumoolin viemä tila 35 °C:ssa, yksi ilmakehä.

45. Biohajoavuuden etenemistä voidaan seurata piirtämällä käyrä kumulatiivisesta paineennoususta Dp (millibaareina) suhteessa aikaan, jos tarpeen. Määritä tästä käyrästä lag-vaihe (päiviä) ja kirjaa se muistiin. Lag-vaihe on aika, joka kuluu testin alkamisesta siihen saakka, kunnes huomattava hajoaminen alkaa (ks. esimerkki lisäyksestä 3). Jos supernatantista otettiin ja analysoitiin välinäytteet (ks. 40, 46 ja 47 kohta), vain kumulatiivisen paineen sijasta voidaan piirtää käyrä tuotetun hiilen (kaasussa ja nesteessä) kokonaismäärästä.

Nesteessä oleva hiili

46. Metaanin määrä nesteessä jätetään huomiotta, koska sen vesiliukoisuuden tiedetään olevan hyvin huono. Laske testiastioiden nesteessä olevan epäorgaanisen hiilen massa käyttämällä yhtälöä [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Yhtälö [7]}$$

jossa

m_l = nesteessä olevan epäorgaanisen hiilen massa (mg)

C_{net} = testiastioissa olevan epäorgaanisen hiilen pitoisuus vähennettynä kontrolliastioiden pitoisuudella testin lopussa (mg/l)

V_h = astiassa olevan nesteen tilavuus (l).

▼M6

Kaasuksi muuttuneen hiilen kokonaismäärä

47. Laske kaasuksi muuttuneen hiilen kokonaismassa astiassa käyttämällä yhtälöä [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Yhtälö [8]}$$

jossa

m_t = kaasuksi muuttuneen hiilen kokonaismassa (mg)

m_h ja m_l edellä olevien määritelmien mukaisesti.

Testiaineessa oleva hiili

48. Laske testiastioissa olevan hiilen massa johdettuna lisätystä testiaineesta käyttämällä yhtälöä [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Yhtälö [9]}$$

jossa

m_v = testiaineessa olevan hiilen massa (mg)

C_c = testiaineessa olevan hiilen pitoisuus testiastiassa (mg/l)

V_l = testiastiassa olevan nesteen tilavuus (l).

Biohajoavuuden määrä

49. Laske biohajoavuuden prosenttiosuus kaasutilan kaasusta käyttämällä yhtälöä [10] ja biohajoavuuden kokonaisprosenttiosuus käyttämällä yhtälöä [11]:

$$D_h = (m_h / m_v) \times 100 \quad \text{Yhtälö [10]}$$

$$D_t = (m_t / m_v) \times 100 \quad \text{Yhtälö [11]}$$

jossa

D_h = biohajoavuus kaasutilan kaasun perusteella (%)

D_t = kokonaisbiohajoavuus (%)

m_h, m_v ja m_t edellä olevien määritelmien mukaisesti.

Primaarisen biohajoavuuden aste lasketaan (valinnaisista) testiaineen pitoisuuden mittauksista inkuboinnin alussa ja lopussa käyttämällä yhtälöä [12]:

$$D_p = (1 - S_e / S_i) \times 100 \quad \text{Yhtälö [12]}$$

jossa

D_p = testiaineen primaarinen hajoavuus (%)

S_i = testiaineen alkupitoisuus (mg/l)

S_e = testiaineen pitoisuus testin lopussa (mg/l).

Jos analyysimenetelmä viittaa siihen, että testiaineen pitoisuus muuttamattomassa anaerobisen lietteen siirrosaineessa on huomattava, käytä yhtälöä [13]:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Yhtälö [13]}$$

jossa

$D_p^{\,1}$ = testiaineen korjattu primaarinen hajoavuus (%)

S_{ib} = testiaineen alkuperäinen ”ilmeinen” pitoisuus nollakontrolleissa (mg/l)

S_{eb} = testiaineen ”ilmeinen” pitoisuus nollakontrolleissa testin lopussa (mg/l).

Tulosten luotettavuus

50. Painelukemia tulee käyttää vain niistä astioista, joiden väri ei ole muuttunut pinkiksi (ks. 33 kohta). Happikontaminaatio minimoidaan käyttämällä asianmukaisia anaerobisia käsittelytekniikoita.

51. On otettava huomioon, että testi on validi, jos vertailuaine saavuttaa tasanteen, joka edustaa yli 60 prosentin biohajoavuutta. ([1])

52. Jos pH-arvo testin lopussa on yli 7 ± 1 ja jos biohajoavuus on ollut epätäydellistä, toista testi lisäämällä väliaineen puskurikapasiteettia.

Hajoamisen estyminen

53. Kaasuntuotannon astioissa, jotka sisältävät sekä testiainetta että vertailuainetta, tulisi olla vähintään yhtä suurta kuin astioissa, jotka sisältävät vain vertailuainetta. Muussa tapauksessa merkit viittaavat kaasuntuotannon estymiseen. Joissakin tapauksissa kaasuntuotanto astioissa, jotka sisältävät testiainetta mutta eivät vertailuainetta, on vähäisempää kuin nollakontrolleissa, mikä viittaa siihen, että testiaine on inhiboiva.

Testiraportti

54. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava ja merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet).

Testiolosuhteet:

— laimennetun mädätysnesteen (V_l) ja kaasutilan (V_h) tilavuus astiassa

— testiastioiden kuvaus, biokaasumittauksen ja epäorgaanisen hiilen analysaattorin pääpiirteet (esimerkiksi painemittarin tyyppi)

— testiaineen ja vertailuaineen applikointi testijärjestelmään: käytetty testipitoisuus ja mahdollinen liuottimien käyttö

— tarkat tiedot käytetystä siirrosaineesta: jätevedenkäsittelylaitoksen nimi, kuvaus käsitellyn jäteveden lähteestä (esimerkiksi käyttölämpötila, lietteen retentioaika, tieto siitä, onko kyseessä pääasiassa talousjätevesi jne.), pitoisuus, sen perustelemiseen tarvittavat tiedot sekä tiedot siirrosaineen mahdollisesta esikäsittelystä (esimerkiksi esimädätys, esialtistus)

— inkubointilämpötila

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

([1]) Tämä on arvioitava uudelleen, jos testissä käytetään adsorptiivisia ja liukenemattomia vertailukemikaaleja.

▼M6

Tulokset:

— pH-arvo ja epäorgaanisen hiilen määrä testin lopussa

— testiaineen pitoisuus testin alussa ja lopussa, jos ominaismittaus on tehty

— kaikki kerätyt mittaustiedot testi-, nolla- ja vertailuaineista sekä inhibitiokontrolliastioista, tarvittaessa (esimerkiksi paine millibaareina, epäorgaanisen hiilen pitoisuus (mg/l)), taulukkomuodossa (kaasutilan ja nesteen mittaustiedot tulee ilmoittaa erikseen)

— tietojen tilastollinen käsittely, testin kesto ja kaavakuva testiaineen, vertailuaineen ja inhibitiokontrollin biohajoavuudesta

— testiaineen ja vertailuaineen prosentuaalinen biohajoavuus

— syyt mahdolliseen testitulosten hylkäämiseen

— tulosten pohdinta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Tämän liitteen seuraavat luvut:

C.4, Biohajoavuuden määritys

C.9 Biologinen hajoaminen – Zahn-Wellens-testi;

C.10 Simulaatiotestit – Aerobinen jätevedenkäsittely:

A: Aktiivilieteyksiköt, B: Biofilmit

C.11 Biologinen hajoaminen – Aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris.

(3) 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. (Julkaistu myös ECETOCin teknisenä raporttina nro 28, kesäkuu 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Microbiology, 47, 850–857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485–492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84–89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441–2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.

▼**M6**

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality – Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.

(12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

(13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

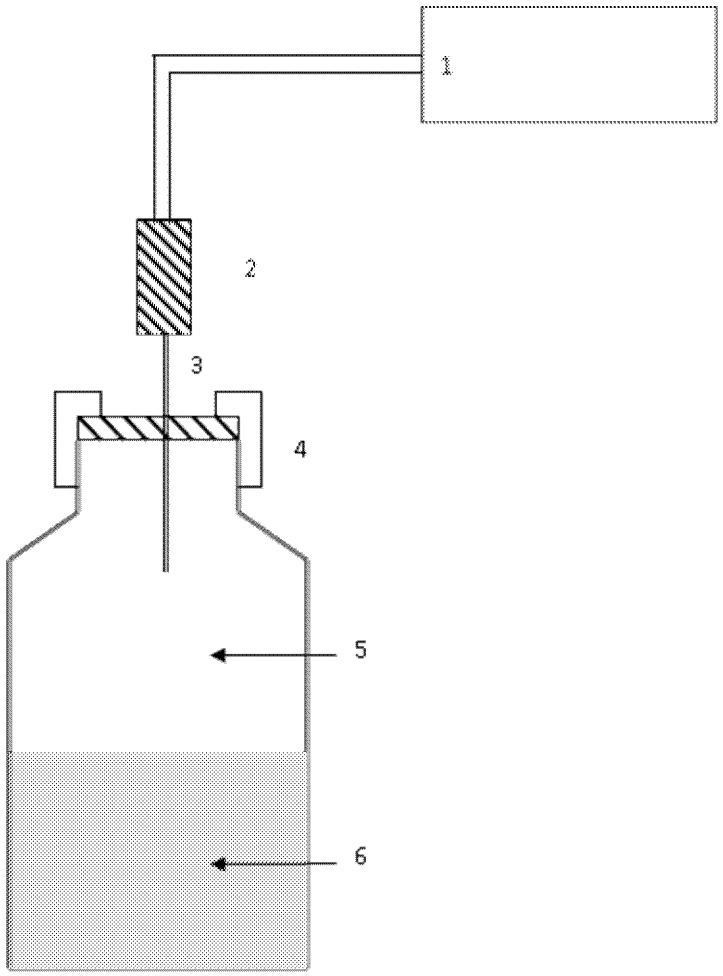
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499–1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Lisäys 1

Esimerkki laitteistosta, jolla mitataan biokaasun tuotantoa kaasunpaineen perusteella



Selitykset:

1 – painemittari

2 – kaasutiivis kolmitieventtiili

3 – injektioneula

4 – kaasutiivis tulppa (kiristysholkki ja tulppa)

5 – kaasutila (V_h)

6 – siirrosaine (mädätetty liete) (V_l)

Testiastioiden käyttölämpötila on 35 °C ± 2 °C.

▼M6

Lisäys 2

Painemittarin muuntaminen

Painemittarin lukemat voidaan liittää kaasutilavuuksiin vakiokäyrällä, joka saadaan injektoimalla tietty tilavuus ilmaa lämpötilassa 35 °C ± 2 °C seerumipulloihin, jotka sisältävät reaktioseoksen tilavuutta V_R vastaavan tilavuuden vettä:

— Laita viiteen seerumipulloon V_R ml alikvootteja vedestä, jota on pidetty lämpötilassa 35 °C ± 2 °C. Sulje pullot ja laita ne vesihauteeseen (35 °C) tasapainottumana tunnin ajaksi.

— Kytke painemittari päälle, anna sen tasapainottua ja säädä se nollaan.

— Paina injektioneula yhden pullon tulpan läpi, avaa venttiiliä, kunnes painemittarin lukema on nolla, ja sulje venttiili.

— Toista toimenpide muille pulloille.

— Injektoi jokaiseen pulloon 1 ml ilmaa lämpötilassa 35 °C ± 2 °C. Paina (painemittarin) neula yhden pullon tulpan läpi ja anna painelukeman asettua. Merkitse painelukema muistiin. Avaa venttiiliä, kunnes painelukema on nolla, ja sulje venttiili.

— Toista toimenpide muille pulloille.

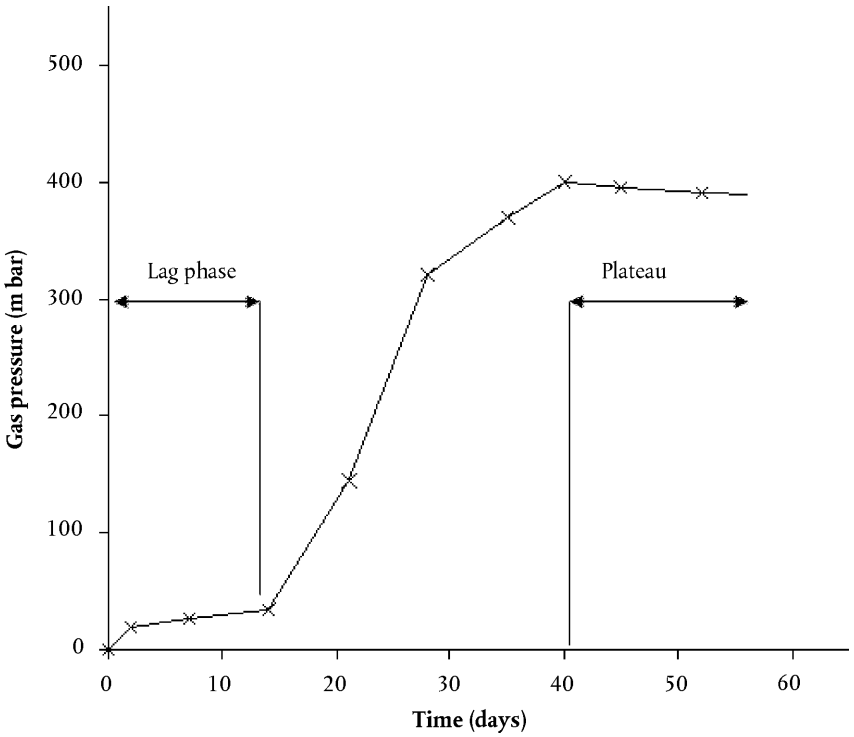
— Toista koko toimenpide käyttämällä 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml ja 50 ml ilmaa.

— Piirrä paineen (Pa) muuntokäyrä injektoituun kaasutilavuuteen Vb (ml) nähden. Instrumentin vaste on lineaarinen välillä 0–70 000 Pa ja kaasuntuotannon osalta välillä 0–50 ml.

▼**M6**

Lisäys 3

Esimerkki hajoamiskäyrästä (paineen kumulatiivinen nettolisäys)



▼M6

Lisäys 4

Esimerkkejä anaerobisen biohajoavuustestin tietolomakkeista – Testiainetta koskeva tietolomake

Laboratorio: ..... Testiaine: ..... Testin nro: .....

Testilämpötila:(°C): ..... Kaasutilan tilavuus (V_h): .....(l) Nesteen tilavuus (V_l): .....(l)

Testiaineen hiilipitoisuus $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v [1]: .....(mg)

Päivä	p_1 (testi) (mbar)	p_2 (testi) (mbar)	p_3 (testi) (mbar)	p (testi) keskiarvo (mbar)	p_4 (nolla) (mbar)	p_5 (nolla) (mbar)	p_6 (nolla) (mbar)	p (nolla) Keskiarvo (mbar)	p (netto) testi – nolla-keskiarvo (mbar)	Dp (netto) Kertymä (mbar)	m_h kaasutilan C [2] (mg)	D_h Biohajoavuus [3] (%)
	$C_{IC,\ 1}$ 1.3.2NRTC-testi: (mg)	$C_{IC,\ 2}$ 1.3.2NRTC-testi: (mg)	$C_{IC,\ 3}$ 1.3.2NRTC-testi: (mg)	C_{IC} testin keski-arvo (mg)	$C_{IC,\ 4}$ tyhjä (mg)	$C_{IC,\ 5}$ tyhjä (mg)	$C_{IC,\ 6}$ tyhjä (mg)	C_{IC} nollan keski-arvo (mg)	$C_{IC,\ net}$ testi – nolla Keskiarvo (mg)	m_l nesteen C [4] (mg)	m_t C yhteensä [5] (mg)	D_t Biohajoavuus [6](%)
IC (lopussa)												
pH (lopussa)												

[1] Testiastian hiilipitoisuus, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

[2] Kaasutilan hiilipitoisuus m_h (mg) normaalissa inkubointilämpötilassa (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

[3] Biohajoavuus laskettuna kaasutilan kaasusta, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

[4] Nesteen hiilipitoisuus, ml (mg): ml $= C_{IC,net} \times$ Vl

[5] Kaasuksi muuttuneen hiilen kokonaismäärä, mt (mg): $m_t + m_l$

[6] Kokonaisbiohajoavuus, Dt (%): Dt = (mt×100) / m_v

02008R0440 — FI — 16.10.2019 — 008.001 — 2374

▼M6

Laboratorio: ..... Vertailuaine: ..... Testin nro: .....

Testilämpötila:(°C): ..... Kaasutilan tilavuus (V_h): .....(l) Nesteen tilavuus (V_l) (litraa): .....

Vertailuaineen hiilipitoisuus $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v (1) (mg):

Päivä	p_1 (vert.) (mbar)	p_2 (vert.) (mbar)	p_3 (vert.) (mbar)	p (vert.) Keskiarvo (mbar)	p_4 (inhib.) (mbar)	p_5 (inhib.) (mbar)	p_6 (inhib.) (mbar)	p (inhib.) Keskiarvo (mbar)	p (vert.) vert. – nolla (mbar)	$D\,p$ (vert.) kertymä (mbar)	m_h kaasutilan C (2) (mg)	D_h Biohajoavuus (3) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ vert. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ vert. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ vert. (mg)	C_{IC} vert. keskiarvo (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg)	C_{IC} inhib. keski-arvo (mg)	$C_{IC,\ net}$ vert. – inhib. (mg)	m_l nesteen C (4) (mg)	m_t C yhteensä (5) (mg)	D_t Biohajoavuus (6) (%)
IC (lopussa)												
pH (lopussa)												

(1) Testiastian hiilipitoisuus, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
(1) Kaasutilan hiilipitoisuus, m_h (mg) normaalissa inkubointilämpötilassa (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$
(3) Biohajoavuus laskettuna kaasutilan kaasusta, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$
(4) Nesteen hiilipitoisuus, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
(5) Kaasuksi muuttuneen hiilen kokonaismäärä, m_t (mg): $m_t + m_l$
(6) Kokonaisbiohajoavuus, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

C.44. UUTTUMINEN MAAKOLONNEISSA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 312 (2004). Keinotekoiset kemikaalit voivat kulkeutua maaperään tarkoituksellisesti (kuten maatalouskemikaalit) tai epäsuoria reittejä pitkin (esimerkiksi jäteveden → lietteen → maaperän tai ilman → kautta märkä- tai kuivalaskeumaksi). Näihin kemikaaleihin liittyvien riskien arvioinnissa on tärkeää selvittää, missä määrin ne voivat muuttua maaperässä ja kulkeutua (uuttua) syvempiin maakerroksiin ja mahdollisesti pohjaveteen.

2. Käytettävissä on useita menetelmiä, joilla kemikaalien uuttumisen potentiaalia maaperässä voidaan mitata valvotuissa laboratorio-olosuhteissa, esimerkiksi seuraavat: maaperän ohutkerroskromatografia, maaperän paksukerroskromatografia, maakolonnikromatografia sekä adsorptio-desorptiomittaukset (1) (2). Ionisoitumattomien kemikaalien yhteydessä n-oktanoli-vesijakaantumiskertoimen (P_{ow}) avulla voidaan tehdä alustava arviointi niiden adsorptio- ja uuttumispotentiaalista (3)(4)(5).

3. Tässä testimenetelmässä kuvattava menetelmä perustuu häiriintyneen maaperän maakolonnikromatografiaan (ks. määritelmä lisäyksestä 1). Testimenetelmässä tehdään kahdentyyppisiä kokeita, joilla määritetään i) testikemikaalin uuttumispotentiaali ja ii) hajoamistuotteiden uuttumispotentiaali (tutkitaan vanhentuneilla jäämillä) maanäytteissä kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa ([1]). Testimenetelmä perustuu olemassa oleviin menetelmiin (6) (7) (8) (9) (10)(11).

4. Tässä testimenetelmässä käytettävien maanäytteiden määrästä ja tyypistä on sovittu maalajin ja sedimentin valintaa käsitelleessä OECD:n työryhmässä, joka kokoontui Belgiratessa Italiassa vuonna 1995 (12). Työryhmä antoi myös suosituksia uuttumiskokeiden maanäytteiden keräämisestä, käsittelystä ja varastoinnista.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

5. Sopivasta inertistä materiaalista (kuten lasista, ruostumattomasta teräksestä, alumiinista, teflonista, PVC:stä jne.) valmistettuihin kolonneihin laitetaan maa-ainesta, ja ne kyllästetään ja tasapainotetaan keinosadeliuoksella (ks. määritelmä lisäyksestä 1), minkä jälkeen niiden annetaan kuivua. Sen jälkeen jokaisen maakolonnin pinta käsitellään testikemikaalilla ja/tai sen vanhentuneilla jäämillä. Sitten maakolonneihin applikoidaan keinosadetta ja suotovesi kerätään. Uuttomenettelyn jälkeen maa-aines poistetaan kolonneista ja jaotellaan asianmukaiseen määrään segmenttejä sen mukaan, mitä tietoja tutkimuksesta on tarkoitus saada. Tämän jälkeen jokaisesta maasegmentistä ja suotovedestä analysoidaan testikemikaalin ja tarvittaessa hajoamistuotteiden tai muiden asiaankuuluvien kemikaalien pitoisuus.

TESTIMENETELMÄN SOVELLETTAVUUS

6. Testimenetelmää voidaan soveltaa testikemikaaleihin (joita ei ole tai jotka on radioleimattu esimerkiksi ^{14}C:lla), joiden analysointiin on olemassa riittävän tarkka ja herkkä menetelmä. Testimenetelmää ei tule soveltaa kemikaaleihin, jotka haihtuvat maasta tai vedestä ja jotka eivät näin ollen pysy maassa ja/tai suotovedessä tämän testimenetelmän mukaisissa koeolosuhteissa.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

7. Radioleimaamattomia tai -leimattuja testikemikaaleja voidaan käyttää, kun mitataan uuttumiskäyttäytymistä maakolonneissa. Hajoamistuotteiden (testikemikaalin vanhentuneiden jäämien) uuttumista tutkittaessa ja massatasemäärityksiä tehtäessä tarvitaan radioleimattuja materiaaleja. ^{14}C-leimaus on suositeltava, mutta muutkin isotoopit, kuten ^{13}C, ^{15}N,^{3}H, ^{32}P, voivat

([1]) Kasvinsuojeluaineilla tehtävistä kolonniuuttumistutkimuksista voidaan saada tietoa testikemikaalin ja sen hajoamistuotteiden kulkeutumista, ja niillä voidaan täydentää eräkohtaisia sorptiotutkimuksia.

▼**M6**

olla hyödyllisiä. Leiman pitäisi mahdollisuuksien mukaan sijaita molekyylin stabiileimmassa osassa tai osissa. Testikemikaalin puhtausasteen tulisi olla vähintään 95 prosenttia.

8. Useimmat kemikaalit tulisi applikoida yksittäisenä aineena. Kasvinsuojelutuotteiden tehoaineiden yhteydessä voidaan kuitenkin käyttää kaupallisia tuotteita, kun tutkitaan alkuperäisen testiaineen uuttumista, mutta niiden testaus on tarpeen etenkin silloin, kun seos todennäköisesti vaikuttaa vapautumisen määrään (ts. raemaiset valmisteet tai valmisteet, joista tehoaine vapautuu kontrolloidusti). Testiasetelman seoskohtaiset vaatimukset kannattaa selvittää sääntelyviranomaiselta ennen testin tekemistä. Vanhentuneiden jäämien uuttumista koskevissa tutkimuksissa tulisi käyttää puhdasta alkuperäistä testiainetta.

9. Ennen maakolonnien uuttumistestien tekemistä testikemikaalista on mielellään oltava saatavilla seuraavat tiedot:

   (1) liukoisuus veteen [testimenetelmä A.6] (13)

   (2) liukoisuus orgaanisiin liuottimiin;

   (3) höyrynpaine [testimenetelmä A.4] (13) ja Henryn lain vakio

   (4) n-oktanoli/vesi-jakaantumiskerroin [testimenetelmät A.8 ja A.24] (13)

   (5) adsorptiokerroin (K_d, K_f tai K_{OC}) [testimenetelmät C.18 ja/tai C.19] (13)

   (6) hydrolyysi [testimenetelmä C.7] (13)

   (7) dissosiaatiovakio (pK_a) [OECD:n testiohje (TG) nro 112] (25)

   (8) aerobinen ja anaerobinen hajoaminen maaperässä [testimenetelmä C.23] (13).

   Huomautus: Lämpötila, jossa nämä mittaukset tehtiin, on raportoitava testiraporteissa.

10. Maakolonneihin on applikoitava riittävästi testikemikaalia, jotta vähintään 0,5 prosenttia applikoidusta annoksesta voidaan havaita mistä tahansa yksittäisestä segmentistä. Kasvinsuojelutuotteiden tehoaineiden osalta applikoitavan testikemikaalin määrä voi vastata suositeltua enimmäiskäyttömäärää (kerta-applikaatio).

11. Testikemikaalin ja tarvittaessa sen hajoamistuotteiden kvantifioimiseksi maaperässä ja suotovedessä on oltava käytettävissä asianmukainen analyysimenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan. Myös testikemikaalin ja sen merkittävien hajoamistuotteiden (yleensä vähintään kaikki hajoamistuotteet, joita on havaittu vähintään 10 prosenttia käytetyssä annoksessa hajoamisreittitutkimuksissa, mutta mieluiten kaikki merkittävät ja huolta aiheuttavat hajoamistuotteet) analyyttinen havaitsemisraja on tunnettava (ks. 17 kohta).

▼M6

VERTAILUKEMIKAALIT

12. Testikemikaalin suhteellista kulkeutumista maaperässä arvioitaessa tulee käyttää vertailukemikaaleja, joiden uuttumiskäyttäytyminen tunnetaan, kuten atratsiinia tai mononuronia, joiden voidaan katsoa uuttuvan maaperään kohtalaisesti (1) (8) (11). Myös ei-sorboivat ja hajoamattomat polaariset vertailukemikaalit (kuten tritium, bromidi, fluoreseiini ja eosiini), joilla voidaan jäljittää veden liikkumista kolonnissa, voivat olla hyödyllisiä, kun vahvistetaan maakolonnin hydrodynaamisia ominaisuuksia.

13. Analyyttisistä standardikemikaaleista voi niin ikään olla hyötyä, kun luonnehditaan ja/tai määritetään hajoamistuotteita, joita on löydetty maasegmenteistä ja suotovesistä kromatografisilla, spektroskooppisilla tai muilla sopivilla menetelmillä.

MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

14. Ks. liite 1.

LAATUKRITEERIT

Talteenotto

15. Uuttumiskokeen saanto on yhtä kuin maasegmenteistä ja kolonnin suotovedestä uuttumisen jälkeen löytyneen testikemikaalin prosenttiosuuksien summa. Saantojen tulisi olla 90–110 prosenttia, kun käytetään radioleimattuja kemikaaleja (11), ja 70–110 prosenttia, kun käytetään leimaamattomia kemikaaleja (8).

Analyysimenetelmän toistettavuus ja herkkyys

16. Analyysimenetelmän toistettavuus testikemikaalin ja hajoamistuotteiden kvantifioimiseksi voidaan tarkistaa tekemällä rinnakkaisanalyysi samasta maasegmentin tai suotoveden uutoksesta (ks. 11 kohta).

17. Analyysimenetelmän havaitsemisraja (LOD) testikemikaalille ja hajoamistuotteille on oltava vähintään 0,01 mg · kg^{-1} jokaisessa maasegmentissä tai suotovedessä (testikemikaalina) tai 0,5 prosenttia applikoidusta annoksesta missä tahansa yksittäisessä segmentissä sen mukaan, kumpi on pienempi. Määritysraja (LOQ) on myös määritettävä.

TESTIMENETELMÄN KUVAUS

Testijärjestelmä

18. Tässä testissä käytetään sopivasta inertistä materiaalista (lasista, ruostumattomasta teräksestä, alumiinista, teflonista, PVC:stä jne.) valmistettuja uuttokolonneja, joiden sisähalkaisija on vähintään 4 cm ja korkeus vähintään 35 cm. Kolonnin materiaalit on testattava mahdollisten yhteisvaikutusten varalta testikemikaalin ja/tai sen hajoamistuotteiden kanssa. Esimerkkejä sopivista kolonneista, jotka ovat tai eivät ole jaettavissa osiin, on lisäyksessä 2.

19. Maakolonnien täyttämisessä ja tiivistämisessä käytetään lusikkaa, survinta ja tärinälaitetta.

20. Keinosade voidaan applikoida maakolonneihin mäntä- tai peristalttipumpuilla, suihkupäillä, Mariotte-pulloilla tai yksinkertaisilla tiputussuppiloilla.

▼M6

Laboratoriolaitteisto ja kemikaalit

21. Kokeeseen tarvitaan vakiolaboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

(1) analyyttiset laitteet, kuten GLC-, HPLC- ja TLC-laitteet, mukaan luettuina radioleimattujen tai -leimaamattomien kemikaalien osoittamiseen soveltuvat järjestelmät tai käänteinen isotooppilaimennusmenetelmä

(2) tunnistukseen käytettävät laitteet (esimerkiksi MS-, GC-MS-, HPLC-MS-spektrometri tai NMR-laite)

(3) nestetuikelaskin radioleimattua testikemikaalia varten

(4) hapetin leimatun materiaalin polttamista varten

(5) uuttovälineet (esimerkiksi sentrifugiputkia kylmäuuttoa varten ja Soxhlet-uuttolaite jatkuvaa takaisinvirtausuuttoa varten)

(6) liuosten ja uutteiden konsentrointivälineet (esimerkiksi pyöröhaihdutin).

22. Käytettäviin kemikaaleihin kuuluvat analyyttisen puhtaat orgaaniset liuottimet, kuten asetoni, metanoli jne., tuikeneste, 0,01 M $CaCl_2$-liuos tislatussa tai deionisoidussa vedessä (= keinosade).

Testikemikaali

23. Testikemikaali on liotettava (deionisoituun tai tislattuun) veteen, jotta sen voi applikoida maakolonniin. Jos testikemikaali liukenee veteen huonosti, sen voi applikoida joko kaupallisesti saatavana valmisteena (tarvittaessa sen jälkeen, kun se on suspendoitu tai emulgoitu veteen) tai johonkin orgaaniseen liuottimeen. Jos käytetään orgaanista liuotinta, sitä on käytettävä mahdollisimman vähän, ja sen on annettava haihtua maakolonnin pinnalta ennen uuttomenettelyn aloittamista. Kiinteät valmisteet, kuten rakeet, tulee applikoida kiinteässä muodossa ilman vettä. Jotta tällainen valmiste jakautuu tasaisemmin maakolonnin pinnalle, kaupallisesti saatavaan tuotteeseen voi sekoittaa hieman kvartsihiekkaa (noin yhden gramman) ennen applikointia.

24. Maakolonneihin on applikoitava riittävästi testikemikaalia, jotta vähintään 0,5 prosenttia applikoidusta annoksesta voidaan havaita mistä tahansa yksittäisestä segmentistä. Kasvinsuojelutuotteiden tehoaineiden osalta tämä voi perustua suositeltuun enimmäiskäyttömäärään (kerta-applikointimäärä), ja sekä alkuperäisen aineen että vanhentuneiden jäämien uuttumisen tulee liittyä käytetyn maakolonnin pinta-alaan ([1]).

Vertailukemikaali

25. Uuttumiskokeissa on käytettävä vertailukemikaalia (ks. 12 kohta). Sitä on applikoitava maakolonnin pinnalle samalla tavoin kuin testikemikaalia ja

([1]) Lieriönmuotoisiin maakolonneihin applikoitava määrä voidaan laskea seuraavalla kaavalla:

$$M\,[\mu g] = \frac{A\,[kg/ha] \cdot 10^9[\mu g/kg] \cdot d^2[cm^2] \cdot \pi}{10^8[cm^2/ha] \cdot 4}$$

jossa
M = kolonnia kohti applikoitava määrä [µg]
A = applikoitava määrä [$kg \cdot ha^{-1}$]
d = maakolonnin halkaisija [cm]
π = 3,14.

▼M6

riittävä määrä, jotta se voidaan havaita asianmukaisesti joko sisäisenä standardina yhdessä testikemikaalin kanssa samasta maakolonnista tai yksinään erillisessä maakolonnissa. Kumpikin kemikaali suositellaan laitettavaksi samaan kolonniin, paitsi jos ne on leimattu samalla tavalla.

Maa-ainekset

Muunnoksen valinta

26. Uuttumistutkimuksissa, joissa käytetään alkuperäistä testikemikaalia, tulisi käyttää kolmea tai neljää maa-ainesnäytettä, joiden pH, orgaanisen hiilen pitoisuus ja rakenne vaihtelevat (12). Jäljempänä olevassa taulukossa 1 on ohjeita uuttumistestien maa-ainesten valintaan. Ionisoituvia testikemikaaleja varten tulisi valita maa-aineksia, joiden pH vaihtelee suuresti, jotta voidaan arvioida kemikaalin kulkeutuvuutta sen ionisoituneessa ja ionisoitumattomassa muodossa. Vähintään kolmen maa-aineksen pH:n tulisi olla sellainen, jossa testikemikaali on kulkeutuvassa muodossaan.

Taulukko 1

Ohjeet uuttumistutkimusten maa-ainesten valintaan

Maa-aineksen nro	pH-luku	Orgaaninen hiili %	Savipitoisuus %	Rakenne (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	hiuesavi
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	hiesusavi
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	savikko
4	< 4,0–6,0	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 §	savinen hiekka
5	< 4,5	> 10 #	< 10	savinen hiekka / hiekka

(*) FAO- ja USDA-järjestelmän mukaisesti (14).

§ Vastaavien muuttujien arvojen tulisi olla ilmoitetun vaihteluvälin mukaisia. Jos sopivan maa-aineksen löytäminen on hankalaa, myös ilmoitettua vähimmäisarvoa pienempiä arvoja voidaan hyväksyä.

‡ Maa-ainekset, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus on vähemmän kuin 0,3 prosenttia, saattavat häiritä orgaanisen pitoisuuden ja adsorption välistä korrelaatiota. Siksi on suositeltavaa käyttää maa-ainesta, jonka orgaanisen hiilen vähimmäispitoisuus on 0,3 prosenttia.

Maa-aineksia, joiden hiilipitoisuus on hyvin suuri (esimerkiksi > 10 prosenttia), ei välttämättä hyväksytä laillisesti esimerkiksi torjunta-aineiden rekisteröintitarkoituksiin.

27. Toisinaan myös muuntyyppiset maa-ainekset voivat olla tarpeen, jotta viileämmät, lauhkeammat ja trooppiset alueet olisivat edustettuina. Jos muuntyyppisiä maa-aineksia käytetään, niitä on luonnehdittava samoilla parametreilla ja niiden ominaisuuksien tulee vaihdella samalla tavalla kuin uuttumistutkimusten maa-ainesten valintaa koskevissa ohjeissa on kuvattu (ks. taulukko 1 edellä), vaikka ne eivät varsinaisesti täytäkään kriteerejä.

28. Uuttumistutkimuksissa, joissa hyödynnetään vanhentuneita jäämiä, on käytettävä yhtä maa-ainesnäytettä (12). Sen hiekkapitoisuuden olisi oltava >70 prosenttia ja orgaanisen hiilen pitoisuuden välillä 0,5–1,5 prosenttia (esimerkiksi taulukon 1 maa-aines nro 4). Useampien maa-ainestyyppien käyttö voi olla tarpeen, jos tiedot hajoamistuotteista ovat tärkeitä.

29. Kaikista maa-aineksista on luonnehdittava vähintään seuraavat ominaisuudet: rakenne [hiekan, hiesun ja saven prosenttiosuudet FAO:n ja USDA:n luokitusjärjestelmien mukaan (14)], pH, kationinvaihtokyky, orgaanisen hiilen pitoisuus, maamassan tiheys (häiriintynyt maa-aines) ja vedenpidätyskyky.

▼M6

Mikrobibiomassan mittaaminen on tarpeen vain sellaisesta maa-aineksesta, jota käytetään ennen vanhentuneiden jäämien uuttumiskoetta edeltävän vanhentamis- tai inkubointivaiheen aikana. Tiedot maa-aineksen muista ominaisuuksista (esimerkiksi maa-aineksen luokittelu, saven mineraloginen koostumus, ominaispinta-ala) voivat olla hyödyllisiä tämän tutkimuksen tuloksia tulkittaessa. Maa-aineksen ominaisuuksia voidaan määrittää lähteissä (15), (16), (17), (18) ja (19) suositeltujen menetelmien avulla.

Maanäytteiden kerääminen ja varastointi

30. Maanäytteet tulisi ottaa pintakerroksesta (A-tasolta) enintään 20 cm:n syvyydestä. Näytteistä on poistettava kasvijätteet, makrofauna ja kivet. Maa-ainekset (paitsi ne, joita käytetään testikemikaalin vanhentamiseen) ilmakuivataan huoneenlämmössä (lämpötila mielellään 20–25 C). Kokonaisuuden pilkkominen on suoritettava mahdollisimman varovasti, jotta maaperän alkuperäinen rakenne muuttuisi mahdollisimman vähän. Maa-ainekset siivilöidään siivilässä, jonka tiheys on ≤ 2 mm. Huolellista homogenointia suositellaan sen vuoksi, että se parantaa tulosten uusittavuutta. Ennen käyttöä maa-aineksia voidaan säilyttää huoneenlämmössä ja pitää ilmakuivattuina (12). Säilytykselle ei suositella varsinaista takarajaa, mutta maa-ainekset, joita on säilytetty yli kolme vuotta, on analysoitava uudelleen ennen käyttöä niiden orgaanisen hiilen pitoisuuden, pH:n ja kationinvaihtokyvyn (CEC) osalta.

31. Yksityiskohtaiset taustatiedot maanäytteiden keruupaikoista on oltava saatavilla. Näihin tietoihin kuuluvat tarkka sijainti [määritettynä tarkasti UTM-projektiolla (Universal Transversal Mercator-Projection / European Horizontal Datum) tai maantieteellisillä koordinaateilla], kasvipeite, käsittelyt kasvinsuojelukemikaaleilla, käsittelyt orgaanisilla ja epäorgaanisilla lannoitteilla, biologisten materiaalien lisäykset tai tahaton kontaminaatio (12). Uuttumistutkimuksissa ei pitäisi käyttää maannoksia, joita on käsitelty testikemikaalilla tai sen kanssa rakenteellisesti analogisella aineella neljän edeltävän vuoden aikana (10) (15).

Testiolosuhteet

32. Testijakson aikana maa-ainesta sisältävät uuttokolonnit on pidettävä pimeässä ja huoneenlämmössä, kunhan lämpötila pysyy ± 2 °C:n vaihteluvälin rajoissa. Suositeltava lämpötila on 18–25 °C.

33. Maakolonnien pinnalle on applikoitava jatkuvasti keinosadetta (0,01 M $CaCl_2$) 200 mm:n nopeudella 48 tunnin ajan ([1]). Tämä nopeus vastaa 251 ml:n applikointia kolonniin, jonka sisähalkaisija on 4 cm. Myös muita keinosademääriä tai pidempää kestoa voidaan soveltaa, jos se on testin tarkoituksen kannalta tarpeen.

Testin suorittaminen

Uuttuminen alkuperäisellä testikemikaalilla

34. Vähintään kahteen uuttokolonniin laitetaan käsittelemätöntä, ilmakuivattua ja siivilöityä maa-ainesta (< 2 mm) noin 30 cm:n korkeudelta. Yhtenäisen täytön aikaansaamiseksi maa-ainesta laitetaan kolonneihin lusikalla pieniä määriä, ja ainesta painetaan survimella samalla, kun kolonnia tärisytetään kevyesti, kunnes maakolonnin pinta ei enää laske. Yhtenäinen täyttö on

([1]) Tämä simuloi erittäin suurta sademäärää. Esimerkiksi Keski-Euroopan vuotuinen sademäärä on keskimäärin 800–1 000 mm.

▼M6

tarpeen siksi, että uuttokolonneista saatavat tulokset olisivat toistettavissa. Tarkempia tietoja kolonnien täyttötekniikoista on lähdeviitteissä (20), (21) ja (22). Jotta täyttömenetelmän toistettavuutta voidaan valvoa, kolonneihin täytetyn maa-aineksen kokonaispaino on määritettävä ([1]); rinnakkaisnäytekolonnien on oltava samanpainoisia.

35. Täyttämisen jälkeen maakolonnit esikostutetaan keinosateella (0,01 M $CaCl_2$) alhaalta ylöspäin, jotta vesi syrjäyttää maa-aineksen huokosissa olevan ilman. Sen jälkeen maakolonnien annetaan tasoittua ja ylimääräinen vesi poistetaan painovoiman avulla. Kolonnin kyllästämismenetelmiä on käsitelty lähdeviitteessä (23).

36. Seuraavaksi maakolonneihin applikoidaan testikemikaalia ja/tai vertailukemikaalia (ks. myös 23–25 kohta). Testi- ja/tai vertailukemikaaliliuokset, -suspensiot tai -emulsiot on applikoitava maakolonnien pinnalle tasaisesti, jotta ne jakautuvat homogeenisesti. Jos jokin testikemikaali suositellaan applikoitavaksi maa-aineksen sisään, se on sekoitettava pieneen määrään (n. 20 g) maa-ainesta ja lisättävä sen jälkeen maakolonnin pinnalle.

37. Tämän jälkeen maakolonnien pinnat peitetään lasisintterilevyllä, lasihelmillä, lasikuitusuodattimella tai pyöreällä suodatinpaperilla, jotta keinosade voidaan jakaa tasaisesti koko pinnalle ja jotta sadepisarat eivät häiritse maa-aineksen pintaa. Mitä suurempi kolonnin halkaisija on, sitä huolellisemmin keinosade on applikoitava maakolonneihin, jotta se jakautuu tasaisesti maa-aineksen pinnalle. Keinosade lisätään maakolonneihin pisaroittain mäntä- tai peristalttipumpulla tai tiputussuppilolla. Suotovedet on kerättävä mieluiten fraktioina, ja niiden tilavuudet on kirjattava muistiin ([2]).

38. Uuttumisen ja kolonnien kuivumisen jälkeen maakolonnit jaotellaan segmentteihin, joiden määrään vaikuttaa se, millaisia tietoja tutkimuksesta on määrä saada. Segmentit uutetaan asianmukaisilla liuottimilla tai liuotinseoksilla, ja niistä analysoidaan testikemikaalin pitoisuus, tarvittaessa hajoamistuotteiden osalta myös kokonaisradioaktiivisuus sekä vertailukemikaali. Suotovedet tai niiden fraktiot analysoidaan suoraan tai samoilla tuotteilla uuttamisen jälkeen. Kun käytetään radioleimattua testikemikaalia, kaikki fraktiot, jotka sisältävät ≥ 10 prosenttia applikoidusta radioaktiivisuudesta, on määritettävä.

Uuttuminen vanhentuneilla jäämillä

39. Tuore maa-aines (jota ei ole ilmakuivattu aiemmin) käsitellään sellaisella määrällä radioleimattua testikemikaalia, joka vastaa maakolonnien pinta-alaa (ks. 24 kohta), ja inkuboidaan aerobisissa olosuhteissa testimenetelmän C.23 (13) mukaisesti. Inkubointiajan (vanhentamisajan) tulisi olla riittävän

([1]) Esimerkkejä häiriintyneen maan maamassan tiheydestä:hiekkamaa 1,66 g · ml^{-1}
hiesupitoinen hiekkamaa 1,58 g · ml^{-1}
hiesumaa 1,17 g · ml^{-1}
silttimaa 1,11 · g ml^{-1}

([2]) Suotoveden tyypilliset määrät ovat noin 230–260 ml, mikä vastaa noin 92–104 prosenttia applikoidun keinosateen kokonaismäärästä (251 ml), kun käytetään maakolonneja, joiden halkaisija on 4 cm ja pituus 30 cm.

▼M6

pitkä, jotta hajoamistuotteita muodostuu huomattavia määriä. Vanhentamisajaksi suositellaan testikemikaalin yhtä puoliintumisaikaa ([1]), mutta se ei saa olla pidempi kuin 120 päivää. Ennen uuttumista vanhennetusta maa-aineksesta analysoidaan testikemikaali ja sen hajoamistuotteet.

40. Uuttumiskolonneihin täytetään 28 cm:n korkeudelta samaa maa-ainesta (joka on kuitenkin ilmakuivattu), jota käytettiin 34 kohdassa kuvatussa vanhentamiskokeessa, ja myös täytettyjen maakolonnien kokonaispaino määritetään. Sen jälkeen maakolonnit esikostutetaan 35 kohdassa kuvatulla tavalla.

41. Seuraavaksi maakolonnien pinnalle applikoidaan testikemikaalia ja sen hajoamistuotteita vanhentuneina maa-ainesjääminä (ks. 39 kohta) kahden senttimetrin paksuiseksi maasegmentiksi. Maakolonnien kokonaiskorkeus (käsittelemätön maa-aines ja vanhennettu maa-aines) saisi olla korkeintaan 30 cm (ks. 34 kohta).

42. Uuttuminen toteutetaan 37 kohdassa kuvatun mukaisesti.

43. Uuttumisen jälkeen maasegmenteistä ja suotovesistä analysoidaan 38 kohdan mukaisesti testikemikaali, sen hajoamistuotteet ja uuttumaton radioaktiivisuus. Sen määrittämiseksi, kuinka paljon vanhentunutta jäämää on pysynyt kahden senttimetrin korkuisessa ylimmässä kerroksessa, kyseinen segmentti on analysoitava erikseen.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

44. Testikemikaalin, hajoamistuotteiden, uuttumattomien aineiden ja vertailukemikaalin (jos sitä on käytetty) määrät on esitettävä prosenttiosuutena applikoidusta alkuperäisestä annoksesta jokaisen maasegmentin ja suotovesifraktion osalta. Jokaisesta kolonnista on laadittava graafinen esitys, jossa näytetään todetut prosenttiosuudet maa-aineksen syvyyksien funktiona.

45. Kun näihin kolonniuuttumistutkimuksiin sisältyy vertailukemikaali, kemikaalin uuttumista voidaan arvioida suhteellisella asteikolla käyttäen suhteellisen kulkeutumisen kertoimia (RMF, ks. määritelmä lisäyksestä 3) (1) (11), joiden avulla voidaan vertailla eri maa-ainestyypeistä saatuja eri kemikaalien uuttumistietoja. Esimerkkejä monien kasvinsuojelukemikaalien RMF-kertoimista on lisäyksessä (3).

46. Myös estimaatit K_{oc}-kertoimesta (orgaanisen hiilen normalisoitu adsorptiokerroin) ja K_{om}-kertoimesta (orgaanisen aineksen normalisoitu jakaantumiskerroin) voidaan saada kolonnin uuttumistuloksista käyttämällä keskimääräistä uuttumisetäisyyttä tai määrittämällä RMF-kertoimen ja K_{om}- tai K_{oc}-kertoimen väliset korrelaatiot (4) taikka soveltamalla yksinkertaista kromatografista teoriaa (24). Jälkimmäisen menetelmän käytössä on kuitenkin oltava varovainen etenkin kun otetaan huomioon, ettei uuttumisprosessi koostu pelkästään kyllästetyistä virtausolosuhteista vaan pikemminkin kyllästymättömistä järjestelmistä.

([1]) Maa-aineksessa voi muodostua useampi kuin yksi pääasiallinen hajoamistuote, ja niitä voi muodostua myös eri aikoina hajoamistutkimuksen aikana. Tällaisessa tapauksessa voi olla tarpeen tehdä uuttumistutkimuksia eri-ikäisillä vanhentuneilla jäämillä.

▼M6

Tulosten tulkinta

47. Tässä menetelmässä kuvatuilla kolonniuuttumistutkimuksilla voidaan määrittää testikemikaalin (alkuperäisen kemikaalin uuttumistutkimus) ja/tai sen hajoamistuotteiden (vanhentuneiden jäämien uuttumistutkimus) uuttumista tai kulkeutumispotentiaalia maaperässä. Näillä testeillä ei voida määrällisesti ennustaa uuttumiskäyttäytymistä kenttäolosuhteissa, mutta niiden avulla voidaan vertailla yhden kemikaalin ”uuttuvuutta” toisiin kemikaaleihin, joiden uuttumiskäyttäytyminen saattaa olla tiedossa (24). Näillä testeillä ei voida myöskään määrällisesti mitata, kuinka monta prosenttia applikoidusta kemikaalista päätyy pohjaveteen (11). Kolonniuuttumistutkimusten tuloksista voi kuitenkin olla apua päätettäessä, ovatko osittaiset tai kokonaiset kenttätestit tarpeen sellaisille kemikaaleille, joiden kulkeutuvuuspotentiaali on ollut laboratoriotesteissä suuri.

Testiraportti

48. Testiraportin tulee sisältää seuraavat tiedot:

Testikemikaali ja vertailukemikaali (jos käytetty):

— yleisnimi, kemiallinen nimi (IUPAC- ja CAS-nimikkeistö), CAS-numero, kemiallinen rakenne (sekä leiman sijainti, jos radioleimattua materiaalia on käytetty) sekä oleelliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— testikemikaalin puhtaus (epäpuhtaudet)

— merkkiaineella leimatun kemikaalin radiokemiallinen puhtaus ja spesifinen aktiivisuus (tapauksen mukaan).

Testimaannokset:

— keruupaikkaa koskevat tiedot

— maa-ainesten ominaisuudet, kuten pH, orgaanisen hiilen ja saven pitoisuus, rakenne ja massatiheys (häiriintyneen maan osalta)

— maa-aineksen mikrobitoiminta (vain testikemikaalin vanhentamisessa käytetystä aineksesta)

— maa-aineksen säilytyksen pituus ja säilytysolosuhteet.

Testiolosuhteet:

— testien suorituspäivämäärät;

— uuttumiskolonnien pituus ja halkaisija

— maakolonnien maa-aineksen kokonaispaino

— testikemikaalin määrä ja applikoidun vertailukemikaalin määrä tarvittaessa

— keinosateen määrä sekä applikointitiheys ja -kesto

— koejärjestelmän lämpötila

— rinnakkaisnäytteiden määrä (vähintään kaksi)

— testikemikaalin, hajoamistuotteiden ja tarvittaessa vertailukemikaalin analyysimenetelmät (pitoisuudet eri maasegmenteissä ja suotovesissä)

— maasegmenteissä ja suotovesissä olevien hajoamistuotteiden luonnehdinta- ja määritysmenetelmät.

▼**M6**

Testitulokset:

— tulostaulukko, jossa tulokset on ilmoitettu pitoisuuksina ja prosenttiosuutena maasegmentteihin ja suotovesiin applikoidusta annoksesta

— massatase, jos tarpeen

— suotovesimäärät

— uuttumisetäisyydet ja tarvittaessa suhteellisen kulkeutumisen kertoimet

— kaavakuva maasegmenteissä havaittujen pitoisuuksien prosenttiosuuksista maasegmentin syvyyteen nähden

— tulosten tarkastelu ja tulkinta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Ind. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem. 29, 1050–1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227–231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26–33.

(6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) Komission direktiivin 95/36/EY, annettu 14 päivänä heinäkuuta 1995, kasvinsuojeluaineiden markkinoille saattamisesta annetun neuvoston direktiivin 91/414/ETY muuttamisesta (ETA:n kannalta merkityksellinen teksti), liite I, EYVL L 172, 22.7.1995, s. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. G jakso: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OECD (1995). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

(13) Tämän liitteen seuraavat luvut:

Luku A.4 Höyrynpaine

Luku A.6 Vesiliukoisuus

▼**M6**

Luku A.8 Jakaantumiskerroin (ravistuspullomenetelmä)

Luku A.25 Jakaantumiskerroin (HPLC-menetelmä)

Luku C.7 Hajoaminen – abioottinen hajoaminen: hydrolyysi pH:n funktiona

Luku C.18 Adsorptio/desorptio erätasapainomenetelmää käyttäen

Luku C.23 Kemikaalien aerobinen ja anaerobinen hajoaminen maaperässä.

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Ind. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Methods (A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. and Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73–78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190–200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Soc. Amer. J. 60(1): 49–53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177–217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115–133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät ja yksiköt

Vanhentuneessa maa-aineksessa oleva jäämä: maa-aineksessa oleva testikemikaali ja sen hajoamistuotteet applikoinnin jälkeen ja kun kulkeutumis-, adsorptio-, metabolia- ja häviämisprosessien kannalta riittävän pitkä aika applikoidun kemikaalin jakaantumisen ja kemiallisten ominaisuuksien muuttumiseksi ainakin osittain (1).

Keinosade: 0,01 M $CaCl_2$-liuos tislatussa tai deionisoidussa vedessä.

Keskimääräinen uuttumisetäisyys: sen maa-ainesosan pohja, jossa kemikaalin kumulatiivinen saanto = 50 prosenttia testikemikaalin kokonaissaannosta [normaali uuttumiskoe] tai (sen maa-ainesosan pohja, jossa kemikaalin kumulatiivinen saanto = 50 prosenttia testikemikaalin kokonaissaannosta) – ((vanhentuneiden jäämien kerroksen paksuus)/2) [vanhentuneiden jäämien uuttumistutkimus].

Kemikaali: aine tai seos.

Suotovesi: vesifaasi, joka on suodattunut maalajien tai maakolonnin läpi (1).

Uuttuminen: prosessi, jossa kemikaali kulkeutuu maalajien tai maakolonnin läpi alaspäin (1).

Uuttumisetäisyys: syvin maasegmentti, josta löytyi ≥ 0,5 prosenttia applikoidusta testikemikaalista tai vanhentuneesta jäämästä uuttumisprosessin jälkeen (sama kuin tunkeutumissyvyys).

Havaitsemisraja (LOD) ja **määritysraja (LOQ)**: havaitsemisraja (limit of detection, LOD) on se kemikaalin pitoisuus, jonka alapuolella ainetta ei voida erottaa määritysartefakteista. Määritysraja (limit of quantification, LOQ) on se kemikaalin pitoisuus, jonka alapuolella pitoisuutta ei voida määrittää hyväksyttävällä tarkkuudella.

RMF Relative Mobility Factor, suhteellisen kulkeutumisen kerroin: (testikemikaalin uuttumisetäisyys (cm)) / (vertailukemikaalin uuttumisetäisyys (cm))

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Hajoamistuote: kaikki kemikaalit, jotka syntyvät testiaineen bioottisista tai abioottisista hajoamisreaktioista, mukaan luettuina CO_2 ja tuotteet, jotka ovat sitoutuneet jäämiin.

Maaperä: pienten organismien (pääasiassa mikro-organismien) eloperäiseksi tekemä sekoitus mineraalisia ja orgaanisia kemiallisia ainesosia, joista jälkimmäisiin sisältyy suuren hiili- ja typpipitoisuuden sisältäviä yhdisteitä sekä molekyylipainoltaan suuria yhdisteitä. Maaperää voidaan käsitellä kahdessa eri tilassa:

— luonnontilaisena eli siinä muodossa, johon se on ajan kuluessa kehittynyt maannostyypilleen luonteenomaisiksi kerrostumiksi;

— häiriintyneenä eli siinä muodossa, jossa se yleensä esiintyy viljellyissä peltomaissa tai tätä testimenetelmää varten kaivetuissa näytteissä (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167–1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

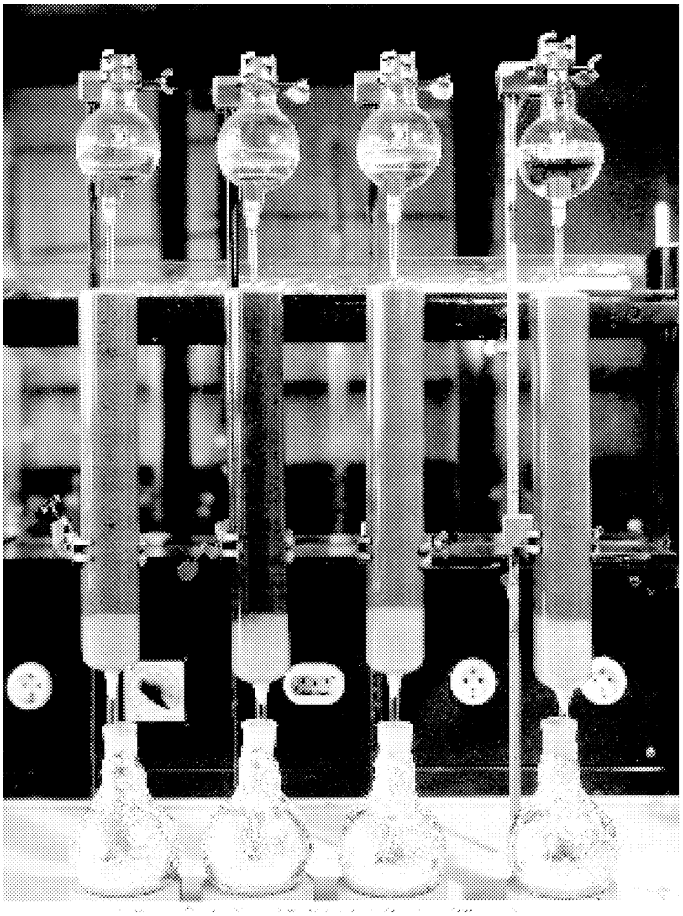
▼M6

Lisäys 2

Kuvio 1

Esimerkki lasisista uuttokolonneista, joita ei voida purkaa osiin

Pituus 35 cm ja sisähalkaisija 5 cm (1)



← Tiputussuppilot keinosateen applikoimista varten

← Lasisintterilevy, jonka avulla vältetään maa-aineksen pinnan häiriintyminen ja jaetaan keinosade tasaisesti

← Testimaa-aineksella täytetty lasikolonni (kun testataan valoherkkiä tuotteita, kolonnit on käärittävä alumiinifolioon)

← Kvartsihiekkakerros

← Lasivillatulppa, jolla varmistetaan, että maa-aines pysyy kolonnissa

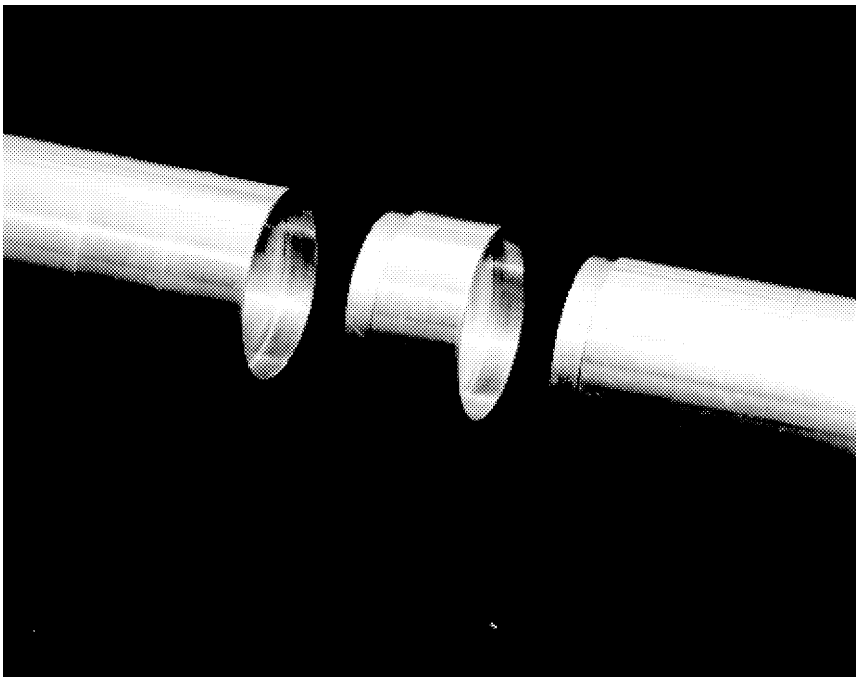
← Pyöreäpohjainen pullo suotoveden keräämistä varten; kääritty alumiinifolioon fotolyysin estämiseksi

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225–236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼**M6**

Kuvio 2

Esimerkki metallikolonnista, jonka voi purkaa osiin (sisähalkaisija 4 cm) (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203–213.

▼M6

Lisäys 3

Esimerkkejä useiden kasvinsuojelukemikaalien suhteellisen kulkeutumisen kertoimista (*) (RMF) (1)(2) ja vastaavista kulkeutumisluokista (+)

RMF-vaihteluväli	Kemikaali (RMF)	Kulkeutuvuusluokka
≤ 0,15	Parationi (< 0,15), fluorodifeeni (0,15)	I Kulkeutumaton
0,15–0,8	Profenofossi (0,18), propikonatsoli (0,23), diatsinoni (0,28), diuroni (0,38), terbutylatsiini (0,52), metidationi (0,56), prometryyni (0,59), propatsiini (0,64), alakloori (0,66), metolakloori (0,68)	II Vähän kulkeutuva
0,8–1,3	Monuroni (**) (1,00), atratsiini (1,03), simatsiini (1,04), fluometuroni (1,18)	III Jonkin verran kulkeutuva
1,3–2,5	Prometoni (1,67), syanatsiini (1,85), bromasiili (1,91), karbutilaatti (1,98)	IV Melko kulkeutuva
2,5–5,0	Karbofuraani (3,00), dioksakarbi (4,33)	V Liikkuvat lähteet
> 5,0	Monokrotofossi (> 5,0), dikrotofossi (> 5,0)	VI Erittäin kulkeutuva

(*) Suhteellisen kulkeutumisen kerroin (RMF) johdetaan seuraavasti (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{testikemikaalin uuttumisetäisyys(cm)}}{\text{vertailukemikaalin uuttumisetäisyys(cm)}}$$

(**) Vertailukemikaali

\+ Muut menetelmät, joilla luokitellaan kemikaalin kulkeutumista maaperässä, perustuvat maaperän ohutkerroskromatografiasta saatuihin R_f-arvoihin \big(4) ja K_{oc}-arvoihin (5) (6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium ”Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment”. Canterbury, UK, 1–3 July 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91–106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214–216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Soc. Am. Proc. 35, 743–748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165–174.

▼M6

C.45. PUUNSUOJA-AINEILLA KÄSITELLYSTÄ PUUSTA AIHEUTUVIEN YMPÄRISTÖPÄÄSTÖJEN ARVIOINTI: LABORATORIOMENETELMÄ PUUTUOTTEILLE, JOTKA EIVÄT OLE PEITETTYJÄ JA JOTKA OVAT KOSKETUKSISSA MAKEAN VEDEN TAI MERIVEDEN KANSSA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 313 (2007). Puunsuoja-aineilla käsitellyn puun ympäristöpäästöt on kvantifioitava, jotta käsitellyn puun ympäristöriskit voidaan arvioida. Tässä testimenetelmässä kuvataan laboratoriomenetelmä puunsuoja-aineilla käsitellyn puun päästöjen arvioimiseksi kahdessa tilanteessa, joissa päästöt voivat kulkeutua ympäristöön:

   — Päästöt makean veden kanssa kosketuksissa olevasta käsitellystä puusta: käsitellyn puun pinnalla muodostuvat päästöt voivat kulkeutua veteen.

   — Päästöt meriveden kanssa kosketuksissa olevasta käsitellystä puusta: käsitellyn puun pinnalla muodostuvat päästöt voivat kulkeutua meriveteen.

2. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu puusta ja puutuotteista, jotka eivät ole peitettyjä ja jotka ovat kosketuksissa makean veden tai meriveden kanssa, aiheutuvien päästöjen testaamiseen. Käyttöluokat ovat käytössä kansainvälisesti, ja niiden avulla luokitellaan käsitellyn tuotteen aiheuttama biologinen vaara. Käyttöluokissa määritellään myös tilanteet, joissa käsiteltyä tuotetta käytetään, sekä ympäristön osa-alueet (ilma, vesi, maaperä), joihin puunsuoja-aineilla käsitellystä puusta aiheutuva riski kohdistuu.

3. Tämä testimenetelmä on laboratoriotoimenpide, jolla otetaan näytteitä käsitellyn puun kyllästämiseen käytetystä vedestä pitenevin aikavälein altistuksen jälkeen. Päästönäytteessä olevien päästöjen määrä liittyy puun pinta-alaan ja altistumisen kestoon, ja virtausta arvioidaan yksikössä mg/m^2/päivä. Näin voidaan arvioida virtaus (uuttumisnopeus) pitenevien altistusjaksojen jälkeen.

4. Päästöjen määrää voidaan käyttää käsitellyn puun ympäristöriskien arvioinnissa.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Mekanismin, jolla makea vesi saa aikaan uuttumisen puun pinnalla, ei oleteta olevan luonteeltaan ja vakavuudeltaan samanlainen kuin meriveden aikaansaaman uuttumismekanismi. Puunsuoja-aineiden tai merivesiympäristöissä käytettävän puun käsittelyyn käytettävien seosten osalta onkin siksi tutkittava meriveden aiheuttamaa uuttumista puun pinnalta.

6. Siltä osin kuin kyseessä on puunsuoja-aineella käsitelty puu, tutkimuksessa tulisi käyttää kaupallisesti käytettävää puuta. Se on käsiteltävä puunsuoja-aineen valmistajan ohjeiden sekä asianmukaisten standardien ja määritysten mukaisesti. Parametrit, joiden mukaan puu viimeistellään varsinaisen käsittelyn jälkeen ennen testin aloittamista, on ilmoitettava.

7. Puunäytteiden tulisi edustaa käytettäviä tuotteita (esimerkiksi lajien, tiheyden ja muiden ominaisuuksien kannalta).

▼M6

8. Testiä voidaan soveltaa puuhun, jonka käsittelyssä käytetään tunkeutumisprosessia tai pinta-applikointia, tai käsiteltyyn puuhun, jossa on ylimääräinen pakollinen pintakäsittely (esimerkiksi maali, jonka käyttö on kaupallisen käytön edellytys).

9. Veden koostumus, määrä, pH ja fysikaalinen olomuoto ovat tärkeitä tietoja, kun määritetään puusta aiheutuvien päästöjen määrää, pitoisuutta ja luonnetta.

TESTIMENETELMÄN PERIAATE

10. Testissä käytettävät, puunsuoja-aineella käsitellyt puulajit upotetaan veteen. Vesi (päästönäyte) kerätään ja analysoidaan kemiallisesti tilastollisten laskelmien kannalta riittävän monta kertaa altistusjakson aikana. Päästönopeudet, jotka ilmoitetaan yksikössä mg/m^2/päivä, lasketaan analyysituloksista. Näytteenottoajankohdat on kirjattava muistiin. Testit käsittelemättömillä näytteillä voidaan lopettaa, jos kolmessa ensimmäisessä datapisteessä ei havaita lisääntymistä taustaan verrattuna.

11. Kun tutkimukseen lisätään käsittelemättömiä puunäytteitä, voidaan määrittää taustatasot muusta kuin käytetystä puunsuoja-aineesta aiheutuneille puun päästöille.

LAATUKRITEERIT

Tarkkuus

12. Testimenetelmän tarkkuus päästöjen arvioimisessa määräytyy sen mukaan, miten hyvin testissä käytetyt puulajit vastaavat kaupallisesti käsiteltyä puuta, miten hyvin testivesi edustaa todellista käsittelyvettä ja miten hyvin altistustapa vastaa luonnollisia olosuhteita.

13. Analyysimenetelmän tarkkuus, täsmällisyys ja toistettavuus tulisi määrittää ennen testin tekemistä.

Uusittavuus

14. Testissä kerätään kolme vesinäytettä, jotka analysoidaan, ja päästöarvoksi otetaan keskiarvo. Tulosten toistettavuus yhdessä laboratoriossa ja eri laboratorioiden välillä määräytyy käytetyn upotusmenetelmän ja testipuulajina käytetyn puun mukaan.

Tulosten hyväksyttävyyden vaihteluväli

15. Tässä testissä tulosten vaihteluväliksi hyväksytään se, jos ylemmät ja alemmat arvot eroavat toisistaan vähemmän kuin yhden suuruusluokan.

TESTAUSOLOSUHTEET

Vesi

16. Makean veden uuttumismallit: Kun on määrä arvioida makealle vedelle altistuvaa puuta, uuttumistestissä suositellaan käytettäväksi deionisoitua vettä (esimerkiksi ASTM D 1193, tyyppi II). Veden lämpötilan tulee olla 20 °C +/– 2 °C, ja mitattu pH ja veden lämpötila on ilmoitettava testiraportissa. Ennen käsiteltyjen puunäytteiden upottamista käytetystä vedestä otettujen näytteiden avulla on mahdollista estimoida vedessä olevat analysoitavat kemikaalit. Tämä on kontrolli, jonka avulla voidaan määrittää taustatasot kemikaaleille, jotka analysoidaan sen jälkeen kemiallisesti.

▼M6

17. Meriveden uuttumismallit: Kun on määrä arvioida merivedelle altistuvaa puuta, uuttumistestissä suositellaan käytettäväksi synteettistä merivettä (esimerkiksi ASTM D 1141, substituoitu valtamerivesi, ilman raskasmetalleja). Veden lämpötilan tulee olla 20 °C +/-2 °C, ja mitattu pH ja veden lämpötila on ilmoitettava testiraportissa. Ennen käsiteltyjen puunäytteiden upottamista käytetystä vedestä otettujen näytteiden avulla on mahdollista estimoida vedessä olevat analysoitavat kemikaalit. Tämä on kontrolli, jonka avulla voidaan analysoida tärkeiden kemikaalien taustatasot.

Testissä käytettävät puulajit

18. Puulajien tulisi olla sellaisia puulajeja, joita yleensä käytetään puunsuoja-aineiden tehokkuuden testaamisessa. Suositeltavat lajit ovat *Pinus sylvestris L.* (metsämänty), *Pinus resinosa Ait*. (amerikanpunamänty) tai *Pinus spp* (pitkäneulasmänty). Muilla lajeilla voidaan tehdä lisätestejä.

19. Testissä tulee käyttää suorasyistä puuta, jossa ei ole pahkoja. Pihkaisen materiaalin käyttöä on vältettävä. Puun tulisi olla sellaista puuta, jota yleensä on saatavana kaupallisesti. Puun lähde, tiheys ja vuosirenkaiden määrä 10:tä millimetriä kohti on kirjattava muistiin.

20. Puulajinäytteinä suositellaan käytettäväksi sarjaa, joka koostuu viidestä EN 113 -standardissa määritellyn kokoisista paloista (mitat 25 mm × 50 mm × 15 mm), joiden pitkittäispinnat ovat puun syiden suuntaisia, joskin myös muunkokoisia paloja (esimerkiksi 50 mm × 150 mm x10 mm) voidaan käyttää. Testinäytteet tulee upottaa veteen kokonaan. Testinäytteiden on oltava 100-prosenttisesti pintapuuta. Jokainen näyte on merkittävä ainutkertaisesti siten, että se voidaan tunnistaa koko testin ajan.

21. Kaikkien testinäytteiden on oltava höylättyjä tai höylättyä puutavaraa, eivätkä pinnat saa olla hiekkapaperilla hiottuja.

22. Testissä on analysoitava vähintään viisi puunäytesarjaa: kolme näytesarjaa käsitellään puunsuoja-aineella, yksi näytesarja jätetään kokonaan käsittelemättä ja yhtä sarjaa käytetään testinäytteiden absoluuttisen kosteuspitoisuuden arviointiin ennen käsittelyä. Testinäytteitä valmistellaan riittävä määrä, jotta niistä voidaan valita kolme sarjaa näytteitä, joissa puunsuoja-aineen jäämä on 5 % testinäytepoolin keskiarvosta.

23. Kaikki testinäytteet tiivistetään kemikaalilla, joka estää suoja-aineen tunkeutumisen näytteiden katkaisupintoihin tai estää aineen uuttumisen näytteestä katkaisupinnan kautta. Tiivisteen applikointia varten on erotettava näytteet, joita käytetään pinta-applikointiin, ja ne, joihin suoja-aine imeytetään. Tiivisteaine on applikoitava ennen käsittelyä ainoastaan niihin näytteisiin, joita käytetään pinta-applikoinnissa.

24. Katkaisupinnan on oltava avoin upotusprosesseihin liittyville käsittelyille. Siksi näytteet on tiivistettävä vasta viimeistelyvaiheen lopussa. Päästöt tulee arvioida vain pitkittäispinta-alalta. Tiivisteaineet on tarkistettava ja applikoitava tarvittaessa uudelleen ennen uuttumisen aloittamista. Niitä ei saa applikoida uudelleen sen jälkeen, kun uuttuminen on aloitettu.

▼M6

Upotusastia

25. Astian on oltava inerttiä materiaalia ja tarpeeksi suuri, jotta siihen voi laittaa viisi EN 113 -standardin mukaista puunäytettä ja 500 ml vettä, jolloin pinta-ala suhteessa veden tilavuuteen on 0,4 cm^2/ml.

Näytteiden testausrakennelma

26. Testinäytteitä käsitellään rakennelmassa, jossa näytteiden kaikki altistuneet pinnat voivat olla kosketuksissa veden kanssa.

SUOJA-AINEKÄSITTELY

Käsiteltyjen testinäytteiden valmistelu

27. Puunäytteet, jotka on tarkoitus käsitellä testissä suoja-aineella, käsitellään suoja-aineelle määritetyllä menetelmällä, joka voi olla joko upotuskäsittely tai kastamalla, ruiskuttamalla tai sivelemällä tehtävä pinta-applikointi.

Upotuskäsittelyssä käytettävät suoja-aineet

28. Suoja-aineesta valmistetaan liuos, jolla saavutetaan määritetty tunkeuma tai jäämä upotuskäsittelyssä. Puutestinäyte punnitaan ja mitataan. Testissä on käytettävä sellaista upotuskäsittelyä, joka on määritetty luokassa 4 tai 5 käytettävän puun suoja-aineelle. Käsittelyn jälkeen näyte punnitaan uudestaan, ja suoja-aineen jäämä (kg/m^3) lasketaan seuraavalla yhtälöllä:

$$\frac{\text{Massa käsittelyn jälkeen(kg)} - \text{massa ennen käsittelyä(kg)}}{\text{liuoksen pitoisuus}(m^3)} \times \frac{\%\ \text{massa(massa/Testinäytteen tilavuus)}}{100}$$

29. Tässä testissä voidaan käyttää teollisessa käsittelylaitoksessa käsiteltyä \big(esimerkiksi tyhjöpainekyllästys) puutavaraa. Käytetyt menettelyt on kirjattava muistiin, ja tällä tavalla käsitellyn materiaalin jäämä on analysoitava ja kirjattava muistiin.

Pinta-applikoinnissa käytettävät suoja-aineet

30. Pinta-applikointikäsittelyssä puutestinäytteet käsitellään suoja-aineella kastamalla, ruiskuttamalla tai sivelemällä. Testissä tulee noudattaa sitä menettelyä ja applikointimäärää (esimerkiksi litraa/m^2), joka kyseisen suoja-aineen pinta-applikointiin on määritetty.

31. Myös tässä tapauksessa testissä voidaan käyttää teollisessa käsittelylaitoksessa käsiteltyä puutavaraa. Käytetyt menettelyt on kirjattava muistiin, ja tällä tavalla käsitellyn materiaalin jäämä on analysoitava ja kirjattava muistiin.

Testinäytteiden viimeistely suoja-ainekäsittelyn jälkeen

32. Käsittelyn jälkeen käsitellyt testinäytteet on viimeisteltävä joko testattavan suoja-aineen valmistajan suositusten mukaan suoja-aineen etiketissä olevien ohjeiden perusteella, alalla noudatettavien käsittelykäytäntöjen mukaisesti tai EN 252 -standardin mukaisesti.

▼M6

Testinäytteiden valmistelu ja valinta

33. Käsittelyä seuraavan viimeistelyn jälkeen lasketaan testinäyteryhmän keskimääräinen jäämä, ja uuttumismittauksiin valitaan satunnaisesti kolme edustavaa näytesarjaa, joissa jäämä on viiden prosentin sisällä ryhmän keskiarvosta.

SUOJA-AINEPÄÄSTÖJEN MITTAUSMENETELMÄ

Upotusmenetelmä

34. Testinäytteet punnitaan ja upotetaan sen jälkeen kokonaan veteen. Päivämäärä ja kellonaika kirjataan muistiin. Astia peitetään haihtumisen estämiseksi.

35. Vesi vaihdetaan seuraavin väliajoin: 6 tuntia, 1 päivä, 2 päivää, 4 päivää, 8 päivää, 15 päivää, 22 päivää, 29 päivää (huomaa: nämä ovat kokonaisaikoja, eivät väliaikoja). Vedenvaihdon kellonaika ja päivämäärä sekä astiasta talteenotetun veden massa kirjataan muistiin.

36. Jokaisen vedenvaihdon jälkeen otetaan näyte siitä vedestä, johon testinäytesarja on upotettu, kemiallista analyysia varten.

37. Näytteenottomenettelyn avulla voidaan laskea päästöjen määrän profiili suhteessa aikaan. Näytteitä tulee säilyttää sellaisissa olosuhteissa, joissa analyytti säilyy, kuten jääkaapissa valolta suojattuna (pimeässä) näytteen mikrobikasvun vähentämiseksi ennen analyysia.

PÄÄSTÖMITTAUKSET

Käsitellyt näytteet

38. Kerätystä vedestä analysoidaan kemiallisesti tehoaine ja/tai oleelliset hajoamistuotteet tarvittaessa.

Käsittelemättömät näytteet

39. Keräämällä vettä (päästönäytettä) tästä järjestelmästä ja analysoimalla siitä käsittelemättömistä puunäytteistä uuttuneet kemikaalit on mahdollista arvioida suoja-aineen mahdollinen päästönopeus käsittelemättömästä puusta. Kun päästönäytteitä kerätään ja analysoidaan sitä mukaa kuin altistusaika pitenee, voidaan arvioida päästönopeuden muutosnopeus suhteessa aikaan. Tämä analyysi on kontrollitoimenpide, jolla määritetään testikemikaalin taustapitoisuudet käsittelemättömässä puussa sen vahvistamiseksi, ettei näytteiden lähteenä käytettyä puuta ollut käsitelty aikaisemmin suoja-aineella.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Kemialliset analyysit

40. Kerätty vesi analysoidaan kemiallisesti, ja vesianalyysin tulos ilmaistaan asianmukaisina yksikköinä (esimerkiksi µg/l).

Tulosten raportointi

41. Kaikki tulokset kirjataan muistiin. Lisäyksessä on esimerkki raportointilomakkeesta yhdelle käsiteltyjen puunäytteiden sarjalle ja yhteenvetotaulukko, jolla lasketaan keskimääräiset päästöarvot jokaiselta näytteenottokerralta.

42. Vuorokausipäästövirtaus (mg/m^2/päivä) lasketaan ottamalla ensin keskiarvo kolmen rinnakkaisnäytteen kolmesta mittauksesta ja jakamalla se upotuspäivien lukumäärällä.

▼**M6**

Testiraportti

43. Testiraportissa on esitettävä vähintään seuraavat tiedot:

— testattavan suoja-aineen toimittajan nimi

— testattavan suoja-aineen tarkka ja ainutkertainen nimi tai koodi

— tehoaineen (-aineiden) kauppa- tai yleisnimi sekä apuaineiden (esimerkiksi apuliuotin, hartsi) geneerinen kuvaus ja ainesosien koostumus yksikössä % m/m

— oleellinen jäämä tai määrä (yksikössä kg/m^3 tai l/m^2), joka on määritelty veden kanssa kosketuksissa olevalle puulle

— käytetty puulaji, sen tiheys ja kasvunopeus renkaina jokaista 10 mm:ä kohti

— testatun suoja-aineen määrä tai jäämä sekä jäämän laskemisessa käytetty yhtälö, ilmaistuna yksikössä l/m^2 tai kg/m^3

— suoja-aineen applikointimenetelmä, jossa kuvataan myös upotusmenettelyn käsittelyaikataulu, ja mahdollisen pintakäsittelyn applikointimenetelmä

— suoja-aineen applikoinnin päivämäärä sekä estimaatti testinäytteiden kosteuspitoisuudesta (ilmoitetaan prosenttiosuutena)

— käytetyt viimeistelymenettelyt (niiden tyyppi, olosuhteet ja kesto)

— käytetyn tiivisteaineen spesifikaatio ja applikointikertojen lukumäärä

— spesifikaatio puun mahdollisesta jälkikäsittelystä (esimerkiksi tiedot maalin valmistajasta, tyypistä, ominaisuuksista ja määrästä)

— jokaisen upotuskerran kellonaika ja päivämäärä, jokaisella kerralla testinäytteiden upottamisessa käytetty vesimäärä ja puuhun upotuksessa imeytyneen veden määrä

— kaikki poikkeukset kuvatusta menetelmästä ja kaikki tekijät, jotka ovat voineet vaikuttaa tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) European Standard, EN 84 – 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.

(2) European Standard, EN 113/A1 – 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.

(3) European Standard, EN 252 – 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.

(4) European Standard, EN 335 – Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products – Definition of use classes – Part 1: kenraali.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

Lisäys 1

Testimenetelmän raportointilomake

Puunsuoja-aineilla käsitellystä puusta aiheutuvien ympäristöpäästöjen arviointi: Laboratoriomenetelmä puutuotteille, jotka eivät ole peitettyjä ja jotka ovat kosketuksissa makean veden tai meriveden kanssa

Testauslaitos	

Puunsuoja-aine

Suoja-aineen valmistaja	
Suoja-aineen tarkka ja ainutkertainen nimi tai koodi	
Suoja-aineen kauppa- tai yleisnimi	
Apuaineet	
Veden kanssa kosketuksissa olevan puun jäämäarvo	

Hakemukset

Applikointimenetelmä	
Soveltamispäivä	
Jäämän laskemisessa käytetty yhtälö:	
Vakauttamismenettely	
Viimeistelyn kesto	
Tiivisteaine / applikointikertojen lukumäärä	
Jälkikäsittely	tarvittaessa

Testikappaleet

Puulaji	
Puun tiheys	(vähimmäisarvo … keskiarvo … enimmäisarvo)
Kasvunopeus (renkaita jokaista 10 mm:ä kohti)	(vähimmäisarvo … keskiarvo … enimmäisarvo)
Kosteuspitoisuus	

▼**M6**

Testirakennelmat (*)	**Jäämä (esimerkiksi kg/m^3)**
Käsitelty ”x”	Viiden näytteen keskiarvo, keskihajonta tai vaihteluväli
Käsitelty ”y”	Viiden näytteen keskiarvo, keskihajonta tai vaihteluväli
Käsitelty ”z”	Viiden näytteen keskiarvo, keskihajonta tai vaihteluväli
Käsittelemätön	
Testimenetelmän parametrien vaihtelu	Esimerkiksi veden laatu, testinäytteiden koko jne.

(*) x, y, z tarkoittavat kolmea rinnakkaisnäytettä.

▼M6

Aika	Veden vaihto	Näytteen massa		Veden imeytymä		Vesinäyte				
		Käsitelty (keskiarvo)	Käsittelemätön	Käsitelty (keskiarvo)	Käsittelemätön		Testivesi	x	y	z
	Pvm.	g	g	g	g	nro	pH	pH	pH	pH
alku										
6 h						1				
24 h						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

▼M6

Laadi erilliset taulukot jokaiselle tehoaineelle

Aika	Veden vaihto	Analyysitulokset															
		Käsittelemättömät näytteet			Käsitellyt näytteet												
					Tehoaineen pitoisuus vedessä				Päästömäärä				Päästönopeus				
		Tehoaineen pitoisuus vedessä mg/l	Päästömäärä mg/m^2	Päästönopeus $mg/m^2/d$	x	y	z	Keskiarvo	x	y	z	Keskiarvo	x	y	z	Keskiarvo	
	Pvm.				mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	
6 h																	
24 h																	
2 d																	
4 d																	
8 d																	
15 d																	
22 d																	
29 d																	

Huomautus: Koska käsittelemättömiä näytteitä koskevia tuloksia on mahdollisesti käytettävä käsiteltyjen näytteiden päästönopeuksien korjaamiseen, käsittelemättömien näytteiden tulokset on määritettävä ensin, ja kaikki käsiteltyjä näytteitä koskevat tulokset ovat ”korjattuja arvoja”. Korjaus voi olla tarpeen myös alkuperäisen vesianalyysin osalta.

02008R0440 — FI — 16.10.2019 — 008.001 — 2400

▼**M6**

Lisäys 2

Määritelmät

Kemikaali: aine tai seos

Testikemikaali: tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

▼M6

C.46. BIOKERTYVYYS SEDIMENTIN POHJA-AINEKSESSA ELÄVISSÄ HARVASUKASMADOISSA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 315 (2008). Sedimenttiä ravinnokseen nielevät pohjaeläimet saattavat altistua sedimenttiin sitoutuneille aineille (1). Näistä sedimenttiä nielevistä eläimistä vedessä elävillä harvasukasmadoilla on tärkeä tehtävä vesijärjestelmien pohjalla. Ne elävät sedimentissä ja ovat usein runsaslukuisimpia lajeja etenkin sellaisissa elinympäristöissä, joiden ympäristöolosuhteet ovat muille eläimille haitallisia. Koska nämä eläimet muokkaavat sedimenttiä ja koska ne ovat myös saaliseläimiä, ne voivat vaikuttaa voimakkaasti haitallisten aineiden biologiseen saatavuuteen muille organismeille, kuten pohjaeläimiä syöville kaloille. Toisin kuin pohjan päällä elävät organismit, vedenpohjassa elävät harvasukaismadot kaivautuvat sedimenttiin ja nielevät ravinnokseen sedimenttihiukkasia sedimentin pinnan alta. Tämän vuoksi nämä organismit altistuvat haitallisille aineille monia reittejä pitkin, kuten suorassa kosketuksessa niihin, kontaminoituneita sedimenttihiukkasia nielemällä sekä huokosveden ja yläpuolisen veden kautta. Joitakin vedenpohjassa elävien harvasukasmatojen lajeja, joita käytetään nykyään ekotoksikologisissa testeissä, on kuvattu liitteessä 6.

2. Aineen biokertyvyyttä kuvaavia parametreja ovat ennen kaikkea biokertyvyystekijä (BAF), sedimentin kertymävakio (k_s) ja eliminaatiovakio (k_e). Näiden määritelmien tarkat kuvaukset ovat lisäyksessä 1.

3. Jotta voidaan arvioida aineiden yleistä biokertyvyyspotentiaalia ja tutkia sellaisten aineiden biokertyvyyttä, jotka voivat jakaantua sedimenttien sisään tai niiden päälle, tarvitaan osa-aluekohtainen testimenetelmä (1) (2) (3) (4).

4. Tämä testimenetelmä on suunniteltu sedimentteihin liittyvien aineiden biokertyvyyden arvioimiseen pohjan sisällä elävissä harvasukaismadoissa. Testiaine lisätään sedimenttiin. Tällaisen sedimentin käyttämisen on määrä simuloida kontaminoitunutta sedimenttiä.

5. Tämä menetelmä perustuu nykyisin sedimentin myrkyllisyyttä ja biokertyvyyttä koskeviin testimenetelmiin (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Muita hyödyllisiä asiakirjoja ovat kansainvälisen työpajan (11) keskustelut ja tulokset sekä kansainvälisen rengastestin (12) tulokset.

6. Tämä testi soveltuu vakaille neutraaleille orgaanisille aineille, joita voi kertyä sedimentteihin. Tällä menetelmällä voidaan mitata myös sedimentteihin kertyviä vakaita metallo-orgaanisia yhdisteitä (12). Sen sijaan menetelmää ei voi soveltaa metalleihin ja muihin hivenaineisiin (11) muuttamatta testin rakennetta substraattien ja veden tilavuuksien ja mahdollisesti myös kudosnäyteotoksen koon osalta.

TESTIAINETTA KOSKEVAT VAATIMUKSET JA TIEDOT

7. Tällä hetkellä käytettävissä on vain muutamia hyvin vakiintuneita kvantitatiivisia rakenne-aktiivisuussuhde (QSAR) -malleja, jotka koskevat biokertyvyysprosesseja. Yleisimmin käytetty suhde on vakaiden orgaanisten aineiden ja niiden lipofiilisyyden välinen korrelaatio (ilmaistuna oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen logaritmina (log K_{ow}); ks. määritelmä lisäyksestä 1). Tämä malli on laadittu kuvaamaan aineen jakaantumista veden ja kalan välillä. Tätä suhdetta käyttämällä on määritetty myös sedimenttikerrosta koskevia

▼M6

korrelaatioita (15) (16) (17) (18). Korrelaatiosta ”log K_{ow}-log BCF” pääasiallisena QSAR-mallina voi olla apua tehtäessä ensimmäisiä alustavia arvioita sedimenttiin kertyvien aineiden biokertyvyyspotentiaalista. BAF-arvoon voivat kuitenkin vaikuttaa testiorganismin lipidipitoisuus ja sedimentin orgaanisen hiilen pitoisuus. Sen vuoksi myös orgaaninen hiili-vesi -jakaantumiskerrointa (K_{oc}) voi käyttää sedimenttiin kertyvien orgaanisten aineiden biokertyvyyden pääasiallisena määrittimenä.

8. Tämä testi soveltuu seuraaviin aineisiin:

— vakaat orgaaniset aineet, joiden log K_{ow} -arvot ovat 3,0–6,0 (5)(19), ja superlipofiiliset aineet, joiden log K_{ow} on suurempi kuin 6,0 (5)

— aineet, jotka kuuluvat sellaisten orgaanistenaineiden luokkaan, joiden biokertyvyyspotentiaali eläviin organismeihin on tiedossa, kuten pinta-aktiiviset aineet tai erittäin adsorptiiviset aineet (ts. joiden K_{oc}-arvo on suuri).

9. Tietoa testiaineesta (turvallisuustoimenpiteet, asianmukaiset säilytysolosuhteet ja stabiilisuus) ja analyysimenetelmistä on hankittava ennen tutkimuksen aloittamista. Lähdeviitteessä (20) ja (21) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista. Ennen biokertyvyyttä koskevan testin tekemistä vedessä elävillä harvasukasmadoilla testiaineesta on oltava saatavilla seuraavat tiedot:

— yleisnimi, kemiallinen nimi (mieluiten IUPAC-nimi), rakennekaava, CAS-numero, puhtaus

— vesiliukoisuus [testimenetelmä A.6 (22)]

— oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin, K_{ow} [testimenetelmät A.8, A.24 (22)]

— sedimentti-vesi-jakaantumiskerroin, ilmaistuna arvoina K_d tai K_{oc} [testimenetelmä C.19 (22)]

— hydrolyysi [testimenetelmä C.7 (22)]

— valokemiallinen muuntuminen vedessä (23)

— höyrynpaine [testiohje A.4 (22)]

— nopea biohajoavuus [testimenetelmät C.4 ja C.29 (22)]

— pintajännitys [testimenetelmä A.5 (22)]

— kriittinen misellipitoisuus (24).

Lisäksi seuraavat tiedot – jos saatavilla – olisivat oleellisia:

— biohajoavuus vesiympäristössä [testimenetelmät C.24 ja C.25 (22)]

— Henryn lain vakio.

10. Radioleimatut testiaineet saattavat helpottaa veden, sedimentin ja biologisten näytteiden analysointia, ja niitä voidaan käyttää sen määrittämiseen, onko hajoamistuotteiden tunnistaminen ja kvantifioiminen tarpeen. Tässä kuvattu menetelmä validoitiin kansainvälisessä rengastestissä (12), jossa tarkasteltiin ^{14}C-leimattuja aineita. Jos radioaktiiviset kokonaisjäämät mitataan, biokertyvyyskerroin (BAF) perustuu alkuperäiseen aineeseen kaikki jäljellä olevat hajoamistuotteet mukaan luettuina. Biokertyvyystutkimukseen on mahdollista yhdistää myös metaboliatutkimus, kun analysoidaan ja kvantifioidaan alkuperäisen aineen ja sen hajoamistuotteiden prosenttiosuudet näytteistä,

▼M6

jotka otetaan kertymävaiheen lopussa tai biokertyvyyden huipputasolla. Joka tapauksessa on suositeltavaa, että BAF lasketaan organismeissa olevan alkuperäisen aineen pitoisuuden eikä pelkästään radioaktiivisten kokonaisjäämien perusteella.

11. Testiaineen ominaisuuksien lisäksi tarvitaan tietoa myös aineen myrkyllisyydestä testissä käytettäville harvasukasmadoille, kuten tieto mediaanista tappavasta pitoisuudesta (LC_{50}) kertymävaiheeseen kuluvan ajan määrittämiseksi, jotta voidaan varmistaa, että valitut altistuspitoisuudet ovat paljon pienemmät kuin myrkylliset pitoisuudet. Ensisijaista olisi käytettävä subletaalien tutkittavien ominaisuuksien pitkäaikaisista tutkimuksista johdettuja myrkyllisyysarvoja (EC_{50}), jos sellaisia on saatavilla. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, hyödyllisiä tietoja voidaan saada välittömän myrkyllisyyden testistä, jotka on tehty samanlaisissa olosuhteissa kuin biokertyvyystestit, tai muita surrogaattilajeja koskevista myrkyllisyystiedoista.

12. Testiliuoksissa, sedimentissä ja biologisessa aineksessa olevan aineen kvantifioimiseksi täytyy olla käytettävissä sopiva määritysmenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan. Käytettävissä on oltava myös näytteen valmistusta ja säilyttämistä koskevat tiedot sekä materiaalin käyttöturvallisuustiedotteet. Tiedossa on oltava myös testiaineen analyyttiset havaintorajat vedessä, sedimentissä ja madon kudoksissa. Jos testissä käytetään radioleimattua testiainetta, myös ominaisradioaktiivisuus (ts. Bq mol^{-1}), radioleimatun atomin sijainti ja sen radioaktiivisuuden prosenttiosuus, johon liittyy epäpuhtauksia, on tiedettävä. Testiaineen ominaisradioaktiivisuuden tulisi olla mahdollisimman suuri, jotta testissä havaitaan mahdollisimman pieniä testipitoisuuksia (11).

13. Lisäksi saatavilla olisi oltava tiedot käytettävän sedimentin ominaisuuksista (ts. sedimentin tai sen ainesosien alkuperä, pH ja huokosveden ammoniakkipitoisuus (kenttäsedimentit), orgaanisen hiilen pitoisuus (TOC), hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet) sekä prosentuaalinen kuivapaino) (6).

TESTIN PERIAATE

14. Testi koostuu kahdesta vaiheesta: kertymävaiheesta (altistus) ja eliminaatiovaiheesta (altistuksen jälkeen). Kertymävaiheessa madot altistetaan sedimentille, johon on lisätty testiainetta ja jonka päälle on lisätty synteettistä vettä ja joka on tasapainotettu tarpeen mukaan (11). Kontrollimatoryhmiä pidetään samanlaisissa olosuhteissa ilman testiainetta.

15. Eliminaatiovaiheessa madot siirretään sedimentti-vesi-järjestelmään, jossa ei ole testiainetta. Eliminaatiovaihe tarvitaan siksi, että saataisiin tietoa nopeudesta, jolla testiaine erittyy pois testiorganismeista (19) (25). Eliminaatiovaihe vaaditaan aina, ellei testiaineen kertymä altistusvaiheen aikana ole ollut merkityksetöntä (ts. kun testiaineen pitoisuudessa testi- ja kontrollimadoilla ei ole tilastollista eroa). Jos kertymävaiheen aikana ei saavuteta vakaata tilaa, kinetiikkamääritykset – BAF_k, kertymä- ja eliminaationopeusvakio(t) – voidaan tehdä käyttämällä eliminaatiovaiheen tuloksia. Testikemikaalin pitoisuuden muutosta madoissa ja matojen pinnalla seurataan testin kummassakin vaiheessa.

16. Kertymävaiheen aikana mittauksia tehdään siihen saakka, kunnes BAF saavuttaa tasannevaiheen tai vakaan tilan. Oletusarvoisesti kertymävaiheen tulisi kestää 28 päivää. Käytännön kokemus on osoittanut, että 12–14 päivän mittainen kertymävaihe riittää monille vakaille neutraaleille orgaanisille aineille vakaan tilan saavuttamiseen (6) (8) (9).

▼M6

17. Jos vakaata tilaa ei kuitenkaan saavuteta 28 päivän kuluessa, eliminaatiovaihe aloitetaan siirtämällä altistuneet harvasukasmadot astioihin, jotka sisältävät samaa väliainetta ilman testiainetta. Eliminaatiovaihe päättyy, kun saavutetaan joko 10 prosentin pitoisuustaso madoilla kertymävaiheen päivänä 28 mitattuna, tai 10 päivän enimmäiskesto. Matojen jäämäpitoisuus eliminaatiovaiheen lopussa kirjataan ylimääräisenä tutkittavana ominaisuutena eli eliminoitumattomina jääminä (Non-Eliminated Residues, NER). Biokertyvyyskerroin (BAF_{ss}) lasketaan mielellään sekä madoissa (C_a) ja sedimentissä (C_s) olevan pitoisuuden suhteena, kun vakaa tila näyttää olevan saavutettu, että kineettisenä biokertyvyyskertoimena BAF_K, joka tarkoittaa sedimentin kertymävakion (k_s) ja eliminaatiovakion (k_e) välistä suhdetta, kun oletetaan, että reaktio noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos vakaata tilaa ei saavuteta 28 päivän kuluessa, BAF_K lasketaan kertymä- ja eliminaatiovakioiden perusteella. Lisätietoja laskemisesta on lisäyksessä 2. Jos reaktio ei noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, on käytettävä monimutkaisempia malleja (lisäys 2 ja lähdeviite (25)).

18. Jos vakaata tilaa ei saavuteta 28 päivän kuluessa, kertymävaihetta voidaan valinnaisesti pidentää, jolloin altistuneiden matojen ryhmille – mikäli saatavilla – tehdään lisää mittauksia, kunnes vakaa tila saavutetaan. Eliminaatiovaihetta ei saa kuitenkaan aloittaa kertymävaiheen päivänä 28.

19. Kertymävakio, eliminaatiovakio (tai vakiot, jos käytetään monimutkaisempia malleja), kineettinen biokertyvyystekijä (BAF_K) ja mahdollisuuksien mukaan näiden parametrien luottamusvälit lasketaan tietokonemalleilla (mallit ovat lisäyksessä 2). Mallin soveltuvuuden voi määrittää esimerkiksi korrelaatiokertoimella tai determinaatiokertoimella (soveltuvuus on hyvä, jos kerroin on lähellä yhtä).

20. Sellaisia orgaanisia aineita, joiden lipofiilisyys on suuri, koskevien testitulosten vaihtelun vähentämiseksi biokertyvyyskertoimet on ilmaistava myös suhteessa testiorganismien lipidipitoisuuteen ja sedimentin orgaanisen hiilen pitoisuuteen (TOC) (biota-sedimentti-kertyvyyskerroin tai BSAF kilossa sedimentin TOC-pitoisuutta / kilossa madon lipidipitoisuutta). Tämä lähestymistapa perustuu sellaista vesiympäristöä koskeviin kokemuksiin ja teoreettisiin korrelaatioihin, joissa – tiettyjen kemikaaliluokkien osalta – aineen biokertyvyyspotentiaalin ja sen lipofiilisyyden välillä on selvä suhde, joka on osoitettu varmasti käytettäessä kalaa malliorganismina (14) (25) (27). Myös testikalan lipidipitoisuuden ja tällaisten aineiden havaitun biokertyvyyden välillä on suhde. Samanlaisia korrelaatioita on löydetty pohjaeläinten yhteydessä (15) (16) (17) (18). Jos matojen kudosta on saatavilla riittävästi, testieläinten lipidipitoisuus voidaan määrittää käyttämällä samaa biologista ainesta, jota käytettiin testikemikaalin pitoisuuden määrittämiseen. On kuitenkin hyvä käyttää totutettuja kontrollieläimiä ainakin kertymävaiheen alussa tai – mieluiten – lopussa lipidipitoisuuden mittaamiseen, ja tätä arvoa voidaan käyttää myöhemmin BAF-arvojen normaalistamisessa.

TESTIN VALIDITEETTI

21. Testi on validi, jos seuraavat edellytykset täyttyvät:

— Matojen kumulatiivinen kuolleisuus (kontrollit ja käsitellyt eläimet) testin loppuun mennessä saisi olla enintään 20 prosenttia matojen alkuperäisestä määrästä.

— Lisäksi olisi osoitettava, että madot kaivautuvat sedimenttiin mahdollisimman suuren altistuksen varmistamiseksi. Ks. tarkemmin 28 kohta.

▼M6

MENETELMÄN KUVAUS

Testilajit

22. Testissä voidaan käyttää useita vedessä eläviä harvasukasmatolajeja. Yleisimmin käytetyt lajit on lueteltu liitteessä 6.

23. Myrkyllisyystestit (96 tuntia, vain vedessä) on tehtävä säännöllisin väliajoin (esimerkiksi joka kuukausi) myrkyllisellä vertailuaineella, kuten kaliumkloridilla (KCl) tai kuparisulfaatilla ($CuSO_4$), testieläinten terveydentilan määrittämiseksi (1) (6). Jos vertailevia myrkyllisyystestejä ei tehdä säännöllisin väliajoin, sedimentin biokertyvyystestissä käytettyjen organismien erä on tarkastettava käyttämällä myrkyllistä vertailuainetta. Myös lipidipitoisuuden mittaamisesta voidaan saada hyödyllistä tietoa eläinten voinnista.

Testiorganismien kasvattaminen

24. Jotta matoja olisi riittävästi biokertyvyystestejä varten, matoja voidaan joutua pitämään pysyvässä yhden lajin laboratorioviljelmässä. Yhteenveto valittujen testilajien kasvattamismenetelmistä laboratoriossa on lisäyksessä 6. Katso tarkempia tietoja lähdeviitteistä (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Laitteisto

25. Missään laitteiston osissa ei saa käyttää materiaaleja, jotka voivat liuottaa tai adsorboida testiainetta, joista voi liueta muita aineita ja jotka voivat vaikuttaa haitallisesti testieläimiin. Testissä voidaan käyttää normaaleja suorakulmaisia tai lieriömäisiä astioita, jotka on valmistettu kemiallisesti inertistä materiaalista ja jotka ovat riittävän tilavia testimatojen täyttöasteeseen nähden. Pehmeiden muoviputkien käyttämistä veden tai ilman annostelemiseen tulee välttää. Kaikissa laitteissa, jotka ovat kosketuksissa testiväliaineeseen, on käytettävä polytetrafluoroetyleenistä, ruostumattomasta teräksestä ja/tai lasista valmistettuja osia. Jos aineiden adsorptiokerroin on suuri, kuten synteettisillä pyretroideilla, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet on heitettävä pois käytön jälkeen (5). Radioleimattujen ja haihtuvien testiaineiden yhteydessä on vältettävä aineiden haihtumista ja haihtuneen testiaineen poistumista. Testiastioista mahdollisesti höyrystyvien jäämien keräämiseen on käytettävä loukkuja (esimerkiksi lasisia kaasunpesupulloja), jotka sisältävät sopivia absorbentteja.

Vesi

26. Yläpuolisen veden on oltava laadultaan sellaista, että koe-eläimet pysyvät siinä totuttautumisvaiheen ja testin ajan elossa ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään poikkeavaa. Testeissä ja matojen laboratorioviljelmien yläpuolisena vetenä suositellaan käytettäväksi testimenetelmän C.1 (25) mukaista synteettistä vettä. On osoitettu, että useat koe-eläimet pysyvät elossa, kasvavat ja lisääntyvät tällaisessa vedessä (8), minkä ansiosta testi- ja kasvatusolosuhteet ovat erittäin vakiot. Vedestä on luonnehdittava vähintään sen pH, johtavuus ja kovuus. Hyödyllistä tietoa saatetaan saada, jos vedestä analysoidaan mikrosaasteet ennen käyttöä (lisäys 4).

27. Veden laadun on oltava tasainen testin ajan. Yläpuolisen veden pH:n on oltava 6–9. Testin alussa veden kokonaiskovuuden tulee olla 90–400 mg $CaCO_3$:a litrassa (7). Edellä mainitun synteettisen veden pH:n ja kovuuden vaihteluväli on ilmoitettu testimenetelmässä C.1 (25). Jos on aihetta epäillä

▼M6

kovuusionien ja testiaineen välistä yhteisvaikutusta, on käytettävä pehmeämpää vettä. Lisäyksessä 4 on yhteenveto hyväksyttävän laimennusveden muista kriteereistä OECD:n testiohjeen (TG) nro 210 (34) mukaisesti.

Sedimentti

28. Testissä käytettävän sedimentin on oltava laadultaan sellaista, että testiorganismit pysyvät siinä elossa ja mielellään myös lisääntyvät totuttautumisvaiheen ja testin aikana ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään poikkeavaa. Matojen tulisi kaivautua sedimenttiin. Kaivautuminen voi vaikuttaa altistukseen ja myös BAF-kertoimeen. Jos testiorganismit välttelevät sedimenttiä tai kaivautumista, se on kirjattava muistiin, mikäli tällaisten havaintojen tekeminen on yläpuolisen veden sameuden vuoksi mahdollista. Matojen (kontrollien ja käsiteltyjen matojen) tulisi kaivautua sedimenttiin 24 tunnin kuluessa niiden laittamisesta testiastioihin. Jos havaitaan jatkuvaa kaivautumisen epäonnistumista tai sedimentin välttelyä (esimerkiksi yli 20 prosentilla yli puolet kertymävaiheen kestosta), se on merkki siitä, että joko testiolosuhteet eivät ole asianmukaiset tai että testiorganismit eivät ole terveitä tai että testiaineen pitoisuus aiheuttaa tällaista käyttäytymistä. Tässä tapauksessa testi on lopetettava ja toistettava parannetuissa olosuhteissa. Lisää tietoa sedimentin nielemisestä voidaan saada käyttämällä lähdeviitteissä (35) ja (36) kuvattuja menetelmiä, joissa selvitetään, miten testiorganismit nielevät sedimenttiä tai valitsevat hiukkasia. Jos havainnointi on mahdollista, ainakin tiedot sedimentin pinnalla olevista ulostepelleteistä, jotka ovat merkki siitä, että madot nielevät sedimenttiä, tai niiden puuttumisesta on kirjattava muistiin ja otettava huomioon testitulosten tulkinnassa altistumisreittien kannalta.

29. Sekä testeissä että matojen laboratorioviljelmissä suositellaan käytettäväksi keinomaahan perustuvaa keinosedimenttiä, jota on kuvattu testimenetelmässä C.8 (40), koska riittävän laadukasta luonnonsedimenttiä ei välttämättä ole saatavilla ympäri vuoden. Lisäksi luonnonsedimenteissä olevat paikalliset organismit ja mahdolliset mikrosaasteet saattavat vaikuttaa testiin. Useat testilajit voivat pysyä elossa, kasvaa ja lisääntyä keinosedimentissä (8).

30. Keinosedimentistä on luonnehdittava vähintään ainesosien alkuperä, raekokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet), orgaanisen hiilen pitoisuus (TOC), vesipitoisuus ja pH. Hapetus-pelkistyspotentiaalin mittaus on vapaaehtoista. Testi- ja/tai kasvatussedimenttinä voidaan kuitenkin käyttää saastumattomilta alueilta otettua luonnollista sedimenttiä. Luonnollisesta sedimentistä on luonnehdittava vähintään ainesosien alkuperä (keräyspaikka), pH ja huokosveden ammoniakkipitoisuus, orgaanisen hiilen pitoisuus (TOC), hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet) ja prosentuaalinen vesipitoisuus (6). Lisäksi on suositeltavaa, että ennen kuin luonnolliseen sedimenttiin lisätään testiainetta, sitä sopeutetaan seitsemän päivän ajan samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat, jos ammoniakin muodostumista on odotettavissa. Tämän sopeuttamisvaiheen jälkeen yläpuolinen vesi on poistettava ja hävitettävä. Hyödyllistä tietoa voidaan saada, kun sedimentistä tai sen ainesosista analysoidaan mikrosaasteet ennen sen käyttöä.

Valmisteluvaihe

31. Luonnollisten sedimenttien käsittelyä ennen niiden käyttöä laboratoriossa kuvataan lähdeviitteissä (1), (6) ja (44). Keinosedimentin valmistusta kuvataan lisäyksessä 5.

▼M6

Varastointi

32. Luonnollisia sedimenttejä tulisi säilyttää laboratoriossa mahdollisimman lyhyen aikaa. Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto suosittelee enimmäissäilytysajaksi kahdeksaa viikkoa 4 ± 2 °C:n lämpötilassa valolta suojattuna (pimeässä). Säilytysastioissa sedimentin yläpuolella ei saa olla kaasutilaa. Suosituksia keinosedimentin säilytyksestä on lisäyksessä 5.

Testiaineen annostelu

33. Sedimenttiin lisätään testiainetta. Lisäämismenettelyssä yksi tai useampi sedimentin ainesosa pinnoitetaan testiaineella. Esimerkiksi kvartsihiekkaa tai pientä määrää sitä (noin 10 g kvartsihiekkaa testiastiaa kohti) voidaan liuottaa testiaineliuokseen sopivalla liuottimella, jonka annetaan höyrystyä hitaasti kuivaksi. Sen jälkeen pinnoitettu fraktio sekoitetaan märkään sedimenttiin. Testiaineen ja hiekkaseoksen mukana tuleva hiekka on otettava huomioon sedimentin valmistuksessa (eli sedimentin valmistukseen on käytettävä pienempi määrä hiekkaa) (6).

34. Luonnollista sedimenttiä käytettäessä testiaine voidaan lisätä kuivattuun osioon sedimenttiä samalla tavoin kuin edellä kuvattiin keinosedimentin yhteydessä, tai sekoittamalla testiaine märkään sedimenttiin ja antamalla mahdollisen liuotusapuaineen höyrystyä. Sopivia liuottimia testiaineen lisäämiseen märkään sedimenttiin ovat etanoli, metanoli, etyleeniglykolimonometyylieetteri, etyleeniglykolidimetyylieetteri, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli (5) (34). Liuottimen myrkyllisyys ja haihtuvuus sekä testiaineen liukenevuus valittuun liuottimeen ovat tärkeimmät kriteerit soveltuvan liuotusapuaineen valinnassa. Lisää ohjeita testiaineen lisäämismenettelyistä on julkaisussa Environment Canada (1995) (41). Varmista huolellisesti, että sedimenttiin lisättävä testiaine sekoittuu sedimenttiin hyvin ja tasaisesti. Kun testiaine on lisätty sedimenttiin, siitä on analysoitava kaksi alanäytettä, jotta testiaineen pitoisuus sedimentissä voidaan tarkistaa ja jotta testiaineen jakaantumisen tasaisuus voidaan määrittää.

35. Kun sedimenttiin on lisätty testiaine ja sedimentin päälle on lisätty vesi, testiaineen on hyvä antaa erottua sedimentistä vesifaasiin. Tämä on suositeltavaa tehdä samassa lämpötilassa ja ilmastuksessa, joita testissä käytetään. Sopiva tasapainottumisaika määräytyy sedimentin ja aineen mukaan, ja se voi vaihdella tunneista päiviin tai harvinaisissa tapauksissa jopa useampiin viikkoihin (4–5 viikkoa) (28) (42). Tässä testissä tasapainottumista ei odoteta, vaan suositeltu tasapainottumisaika on 48 tuntia – 7 päivää. Tutkimuksen tarkoituksen mukaan (esimerkiksi jos tarkoitus on jäljitellä ympäristöolosuhteita) testiaineen sisältävää sedimenttiä voidaan tasapainottaa tai vanhentaa pidemmänkin aikaa (11).

TESTIN SUORITTAMINEN

Alustava testi

36. Voi olla hyvä tehdä esitesti lopullisen kokeen olosuhteiden optimoimiseksi (esimerkiksi testiaineen pitoisuuden (pitoisuuksien) valitseminen ja kertymä- ja eliminaatiovaiheen kesto). Esitestin aikana tulee tarkkailla matojen käyttäytymistä, esimerkiksi sedimentin välttelyä, jolloin madot poistuvat sedimentistä, mikä voi olla testiaineen ja/tai sedimentin itsensä aiheuttamaa, ja sitä koskevat havainnot on kirjattava muistiin. Sedimentin välttelyä voidaan

▼M6

käyttää myös subletaalina parametrina esitestissä, kun arvioidaan biokertyvyystestissä käytettävää testiaineen pitoisuutta (tai käytettäviä pitoisuuksia).

Altistumisolosuhteet

Kertymävaiheen kesto

37. Testiorganismit altistetaan testiaineelle kertymävaiheessa. Ensimmäinen näyte tulisi ottaa 4–24 tunnin kuluttua kertymävaiheen alkamisesta. Kertymävaiheen on kestettävä 28 vuorokautta (1) (6) (11), ellei voida osoittaa, että tasapainotila on saavutettu aikaisemmin. Vakaa tila on saavutettu, kun i) biokertyvyyskertoimien käyrä suhteessa aikaan on jokaisella näytteenottokerralla aika-akselin suuntainen; ii) kolme peräkkäistä BAF-analyysia, jotka on otettu vähintään kahden päivän välein, eroavat toisistaan enintään ± 20 prosenttia, ja iii) kolmen näytteenottokerran välillä ei ole merkitseviä eroja (tilastollisten vertailujen, kuten varianssianalyysin ja regressioanalyysin, perusteella). Jos vakaata tilaa ei ole saavutettu 28 päivän kuluessa, kertymävaihe voidaan lopettaa aloittamalla eliminaatiovaihe, ja BAF_K voidaan laskea kertymä- ja eliminaatiovakioista (ks. myös 16–18 kohta).

Eliminaatiovaiheen kesto

38. Ensimmäinen näyte tulisi ottaa 4–24 tunnin kuluttua eliminaatiovaiheen alkamisesta, koska alkuvaiheessa kudosjäämissä saattaa esiintyä nopeita muutoksia. Eliminaatiovaihe on suositeltavaa lopettaa joko silloin, kun testiaineen pitoisuus on alle 10 prosenttia vakaan tilan pitoisuudesta, tai kun se on kestänyt enintään 10 päivää. Jäämäpitoisuus madoissa eliminaatiovaiheen lopussa raportoidaan toissijaisena tutkittavana ominaisuutena. Tämä aika voidaan kuitenkin määrätä esimerkiksi sen perusteella, kuinka kauan testiaineen pitoisuus madoissa pysyy analyyttisen havaitsemisrajan yläpuolella.

Testiorganismit

Testimatojen lukumäärä

39. Näytekohtaisen matolukumäärän on muodostettava sellainen massa matokudosta, että näytekohtainen testiaineen massa kertymävaiheen alussa ja eliminaatiovaiheen lopussa on huomattavasti suurempi kuin testiaineen havaitsemisraja biologisessa materiaalissa. Mainituissa kertymä- ja eliminaatiovaiheissa pitoisuus koe-eläimissä on yleensä varsin pieni (6)(8)(18). Koska monien vedessä elävien harvasukasmatolajien yksilöllinen paino on hyvin pieni (*Lumbriculus variegatus*- ja *Tubifex tubifex* -lajien yksilökohtainen märkäpaino 5–10 g), tietyn rinnakkaisnäytteen testiastioissa olevat madot voidaan yhdistää punnitusta ja kemiallista analyysia varten. Testilajeissa, joissa yksilöllinen paino on suurempi (esimerkiksi *Branchiura sowerbyi*), voidaan käyttää vain yhdestä yksilöstä koostuvia rinnakkaisnäytteitä, mutta tällöin rinnakkaisnäytteiden määrää on lisättävä vähintään viiteen näytteenottokertaa kohti (11). Lisäksi on muistettava, ettei *B. sowerbyi* sisältynyt rengastestiin (12), joten se ei ole suositeltava laji tässä testimenetelmässä.

40. Testissä tulee käyttää samankokoisia matoja (*L. variegatus* -lajin osalta ks. lisäys 6). Niiden tulisi olla peräisin samasta lähteestä ja saman ikäluokan täysikasvuisia tai isoja eläimiä (ks. lisäys 6). Eläimen paino ja ikä saattavat vaikuttaa BAF-arvoihin huomattavasti (esimerkiksi erilaisen lipidipitoisuuden ja/tai munien kehittymisen vuoksi), joten nämä parametrit on kirjattava muistiin tarkasti. Jotta keskimääräiset märkä- ja kuivapainot voidaan mitata, madoista tulee punnita alanäyte ennen testin aloittamista.

▼M6

41. *Tubifex tubifex*- ja *Lumbriculus variegatus* -lajeilla lisääntyminen on odotettavissa testin aikana. Lisääntymisen puuttuminen biokertyvyystestissä on kirjattava muistiin ja otettava huomioon testituloksia tulkittaessa.

Täyttöaste

42. Testissä tulee käyttää suuria sedimentistä matoon- ja vedestä matoon -suhdelukuja, jotta voidaan minimoida testiaineen pitoisuuden pieneneminen sedimentissä kertymävaiheen aikana ja välttää liuenneen hapen pitoisuuden pienenemiset. Valitun täyttöasteen tulisi myös vastata valittujen lajien luonnollista populaatiotiheyttä (43). Esimerkiksi *Tubifex tubifexin* osalta suositeltu täyttöaste on 1–4 mg matokudosta (märkäpaino) yhtä grammaa märkää sedimenttiä kohti (8)(11). *L. variegatuksen* osalta lähdeviitteissä (1) ja (6) suositeltu täyttöaste on ≤1 g matokudosta (kuivapaino) 50 grammassa sedimentin orgaanista hiiltä.

43. Testissä käytettävät madot poistetaan kasvatussäiliöstä siivilöimällä säiliön sedimentti. Eläimet (täysikasvuiset tai isot madot, joissa ei ole merkkejä viimeaikaisesta jakaantumisesta) siirretään puhdasta vettä sisältäviin lasiastioihin (esimerkiksi petrimaljoihin). Jos testiolosuhteet poikkeavat kasvatusolosuhteista, 24 tunnin totutteluvaiheen pitäisi olla riittävä. Ennen punnitsemista madoista tulee poistaa liiallinen vesi. Se voidaan tehdä asettamalla madot varovasti esikostutetun paperipyyhkeen päälle. Imupaperin käyttäminen matojen kuivaamiseen ei ole suositeltavaa, koska se voi aiheuttaa stressiä madoille tai vahingoittaa niitä. Brunson ja muut (1998) suosittelevat, että testissä käytettävä matomäärä olisi noin 1,33 kertaa kohdebiomassa (kun matoja ei ole kuivattu imupaperilla). Tässä ylimääräiset 33 prosenttia vastaavat kuivattujen ja kuivaamattomien matojen välistä eroa (28).

44. Kertymävaiheen alussa (testin päivä 0) testiorganismit otetaan pois totutteluastiasta ja jaetaan satunnaisesti synteettistä vettä sisältäviin astioihin (esimerkiksi petrimaljoihin) siten, että jokaiseen astiaan laitetaan aina kaksi matoa, kunnes jokaisessa astiassa on kymmenen matoa. Sen jälkeen nämä matoryhmät siirretään satunnaisessa järjestyksessä eri testiastioihin käyttämällä esimerkiksi pehmytkärkisiä teräspinsettejä. Sen jälkeen testiastioita inkuboidaan testiolosuhteissa.

Ruokinta

45. Koska keinosedimentti sisältää vain vähän ravinteita, sedimenttiä tulee muokata lisäämällä siihen ravinnon lähteitä. Jotta testiorganismien altistumista ei aliarvioida esimerkiksi ruokkimalla niitä valikoidusti kontaminoitumattomalla ruoalla, testiorganismien lisääntymiseen ja kasvuun tarvittavaa ruokaa on lisättävä sedimenttiin kerran ennen testiaineen applikointia tai sen aikana (ks. lisäys 5).

Sedimentin ja veden suhde

46. Sedimentin ja veden suositeltu suhde on 1:4 (45). Tätä suhdetta pidetään sopivana, jotta happipitoisuus säilyy asianmukaisena ja jotta vältetään ammoniakin kertyminen yläpuoliseen veteen. Yläpuolisen veden happipitoisuus tulisi pitää sellaisena, että kyllästys olisi ≥ 40 prosenttia. Yläpuolista vettä testiastioissa on ilmastettava kevyesti (esimerkiksi 2–4 ilmakuplaa sekunnissa) Pasteur-pipetillä, joka sijaitsee noin kahden sentin päässä sedimentin pinnasta sedimentin sekoittumisen välttämiseksi.

▼M6

Valo ja lämpötila

47. Valoisa jakso kasvatuksessa ja testissä on 16 tuntia (1) (6). Testitilassa olisi oltava 500–1 000 luksin valoteho. Lämpötilan on oltava 20 ± 2 °C koko testin ajan.

Testipitoisuudet

48. Kertymiskinetiikan määrittämisessä käytetään yhtä testipitoisuutta (mahdollisimman pientä), mutta myös toista (suurempaa) pitoisuutta voidaan käyttää (ks. lähdeviite (46)). Tällöin näytteet otetaan ja analysoidaan, kun vakaa tila on saavutettu, tai 28 päivän kuluttua, jotta pienemmästä pitoisuudesta mitattu BAF voidaan vahvistaa (11). Suurempi pitoisuus tulisi valita niin, että haittavaikutukset ovat suljettavissa pois (esimerkiksi valitsemalla noin 1 prosentti pienimmästä tunnetusta pitkäaikaisen vaikutuksen pitoisuudesta EC_x, joka on johdettu asiaankuuluvista pitkäaikaisen myrkyllisyyden tutkimuksista). Pienemmän testipitoisuuden on oltava huomattavasti suurempi kuin käytettävän analyysimenetelmän havaitsemisraja sedimentissä ja biologisissa näytteissä. Jos testiaineen vaikuttava pitoisuus on lähellä analyyttista havaitsemisrajaa, on suositeltavaa käyttää radioleimattua testiainetta, jonka ominaisradioaktiivisuus on suuri.

Rinnakkaisnäytteet (käsitellyt ja kontrollit)

49. Kinetiikkamittauksissa käsiteltyjen rinnakkaisnäytteiden vähimmäismäärä on kolme näytteenottokertaa (11) kohti kertymä- ja eliminaatiovaiheissa. Enemmän rinnakkaisnäytteitä voidaan käyttää esimerkiksi valinnaisten ylimääräisten näytteenottoajankohtien yhteydessä. Eliminaatiovaiheessa valmistellaan sopiva määrä rinnakkaisnäytteitä, jotka sisältävät testiaineetonta sedimenttiä ja yläpuolista vettä, jotta käsitellyt madot voidaan siirtää kertymävaiheen lopussa käsittelyastioista niihin astioihin, jotka eivät sisällä testiainetta. Käsiteltyjen rinnakkaisnäytteiden yhteismäärän tulisi olla riittävä sekä kertymäettä eliminaatiovaiheeseen.

50. Vaihtoehtoisesti madot, joista otetaan näytteitä eliminaatiovaiheessa, voidaan altistaa yhdessä isossa astiassa; siinä on oltava testiaineella käsiteltyä sedimenttiä, joka on peräisin samasta erästä kuin kertymäkinetiikkaa varten tarkoitettu sedimentti. On myös osoitettava, että testiolosuhteet (kuten sedimentin syvyys, sedimentin ja veden suhde, täyttöaste, lämpötila, veden laatu) ovat verrattavissa kertymävaiheeseen tarkoitettuihin rinnakkaisnäytteisiin. Kertymävaiheen lopussa tästä astiasta on otettava vesi-, sedimentti- ja matonäytteet analysoitavaksi, ja riittävän monta isoa matoa, joissa ei ole merkkejä viimeaikaisesta jakaantumisesta, on otettava varovasti pois astiasta ja siirrettävä eliminaatiovaiheeseen tarkoitettuihin rinnakkaisnäyteastioihin (esimerkiksi 10 organismia rinnakkaisnäyteastiaa kohti).

51. Jos testissä ei käytetä muuta liuotinta kuin vettä, biologiseen ja tausta-analyysiin on valmistettava vähintään yhdeksän rinnakkaisnäytettä negatiivista kontrollia varten (vähintään kolme näytettä otetaan testin alussa, kolme kertymävaiheen lopussa ja kolme eliminaatiovaiheen lopussa). Jos testiaineen applikoinnissa käytetään jotakin liuotusapuainetta, on tehtävä liuotinkontrolli (vähintään kolmesta rinnakkaisnäytteestä on otettava näyte testin alussa, kolmesta kertymävaiheen lopussa ja kolmesta eliminaatiovaiheen lopussa). Tässä tapauksessa on valmistettava vähintään neljä rinnakkaisnäytettä negatiivista kontrollia (ei liuotinta) varten, ja näytteet otetaan kertymävaiheen lopussa. Rinnakkaisnäytteitä verrataan biologisesti liuotinkontrolliin, jotta saadaan tietoa liuottimen mahdollisesta vaikutuksesta testiorganismeihin. Yksityiskohtaiset tiedot annetaan lisäyksessä 3.

▼M6

Veden laatua koskevien mittausten taajuus

52. Yläpuolisesta vedestä on mitattava vähintään seuraavat veden laatua koskevat parametrit kertymä- ja eliminaatiovaiheen aikana:

Lämpötila	Yhdestä astiasta jokaisella käsittelytasolla näytteenottokertaa kohti ja yhdestä kontrolliastiasta kerran viikossa sekä kertymä- ja eliminaatiovaiheiden alussa ja lopussa; ympäristön lämpötila (huoneilma tai vesihaude), tai tiedot yhdestä edustavasta testiastiasta voidaan kirjata joko jatkuvasti tai tunnin välein.
Liuenneen hapen pitoisuus	Yhdestä astiasta jokaisella käsittelytasolla ja yhdestä kontrolliastiasta näytteenottokertaa kohti; arvot ilmoitetaan yksiköissä mg/l ja % ASV (ilman kyllästysarvo).
Tuloilma	Tarkistetaan vähintään kerran päivässä (arkipäivisin) ja säädetään tarvittaessa.
pH	Yhdestä käsitellystä astiasta jokaisella käsittelytasolla näytteenottokertaa kohti ja yhdestä kontrolliastiasta kerran viikossa sekä kertymä- ja eliminaatiovaiheiden alussa ja lopussa.
Veden kokonaiskovuus	Vähintään yhdestä käsitellystä astiasta ja yhdestä kontrolliastiasta kertymä- ja eliminaatiovaiheiden alussa ja lopussa, ilmaistaan yksikössä mg/l $CaCO_3$.
Ammoniakin kokonaispitoisuus	Vähintään yhdestä käsitellystä astiasta ja yhdestä testiastiasta kertymä- ja eliminaatiovaiheiden alussa ja lopussa, ilmaistaan yksikössä mg/l NH_4^+ tai NH_3 tai kokonais-ammoniakki-N.

Näytteenotto madoista, sedimentistä ja vedestä sekä näytteiden analysointi

Näytteenottoaikataulu

53. Esimerkkejä 28-päiväisen kertymävaiheen ja 10-päiväisen eliminaatiovaiheen näytteenottoaikatauluista on lisäyksessä 3.

54. Testiastioista otetaan vesi- ja sedimenttinäytteet, joista määritetään testiaineen pitoisuus ennen matojen lisäämistä sekä kertymä- ja eliminaatiovaiheen aikana. Testin aikana testiaineen pitoisuudet määritetään madoista, sedimentistä ja vedestä, jotta voidaan seurata testiaineen jakaantumista testijärjestelmän eri osa-alueisiin.

55. Ota madoista, sedimentistä ja vedestä näytteet vähintään kuusi kertaa sekä kertymä- että eliminaatiovaiheen aikana.

56. Jatka näytteenottoa, kunnes tasannevaihe (vakaa tila) on saavutettu (ks. lisäys 1) tai 28 päivän ajan. Jos tasannevaihetta ei ole saavutettu 28 päivän kuluessa, aloita eliminaatiovaihe. Kun eliminaatiovaihe alkaa, siirrä madot rinnakkaisnäyteastioihin, jotka sisältävät käsittelemätöntä sedimenttiä ja vettä (ks. myös 17 ja 18 kohta).

Näytteenotto ja näytteiden valmistus

57. Ota vesinäytteitä varten dekantoimalla, lapolla tai pipetillä sellainen määrä vettä, joka riittää testiaineen määrän mittaamiseen näytteestä.

58. Ota loput yläpuolisesta vedestä pois testiastioista dekantoimalla tai lapolla. Sedimenttinäytteet on otettava varovasti siten, että madoille aiheutuu siitä mahdollisimman vähän häiriötä.

▼M6

59. Ota kaikki madot pois rinnakkaisnäytteestä näytteenottohetkellä esimerkiksi suspendoimalla sedimentti yläpuolisen veden kanssa ja levittämällä kunkin rinnakkaisnäytteen sisältö matalalle tarjottimelle ja poimimalla madot pehmeäkärkisillä teräspinseteillä. Huuhtele ne nopeasti vedellä matalassa lasi- tai terästarjottimessa. Poista liiallinen vesi. Siirrä madot varovasti esipunnittuun astiaan ja punnitse ne. Lopeta madot jäädyttämällä ne (esimerkiksi ≤ – 18 °C:ssa). Munakoteloiden ja/tai nuorten matojen esiintyminen ja lukumäärä on kirjattava muistiin.

60. Yleensä madot tulee punnita ja lopettaa heti näytteenoton jälkeen ilman suolen tyhjentämistä, jotta saadaan varovainen BAF-arvo, joka sisältää kontaminoituneen suolensisällön, ja jotta vältetään se, ettei ruumiin jäämiä häviä, kun suoli tyhjennetään vain veteen (8). Aineiden, joiden log K_{ow} on yli 5, ei odoteta eliminoituvan suuremmin, kun suoli tyhjennetään vain veteen, kun taas aineet, joiden log K_{ow} on alle 4, voivat eliminoitua huomattavina määrinä (47).

61. Eliminaatiovaiheen aikana madot tyhjentävät suolensa puhtaaseen sedimenttiin. Tämä tarkoittaa sitä, että suolensisällöllä kontaminoituneesta sedimentistä tehdään mittaukset välittömästi ennen eliminaatiovaihetta, koska eliminaatiovaiheen ensimmäisten 4–24 tunnin jälkeen suurimman osan suolensisältöä oletetaan korvautuvan puhtaalla sedimentillä (11) (47). Testiaineen pitoisuutta madoissa tässä näytteessä voidaan siis pitää kudospitoisuutena suolen tyhjentämisen jälkeen. Jotta kontaminoitumattoman sedimentin laimentava vaikutus testiaineen pitoisuuteen eliminaatiovaiheessa voidaan huomioida, suolen sisällön paino voidaan arvioida madon märkäpainon ja tuhkapainon tai madon kuivapainon ja tuhkapainon suhteesta.

62. Jos tietyn tutkimuksen tarkoituksena on mitata biologista saatavuutta ja todellisia kudosjäämiä testiorganismeissa, vähintään yksi alanäyte käsitellyistä eläimistä (esimerkiksi kolmesta ylimääräisestä rinnakkaisnäyteastiasta), joka otetaan mieluiten vakaan tilan aikana, tulee punnita, puhdistaa puhtaassa vedessä kuuden tunnin ajan (47) ja punnita sen jälkeen uudelleen ennen analyysia. Tästä alanäytteestä saatuja tietoja matojen painosta ja ruumiin pitoisuudesta voidaan verrata niistä madoista saatuihin arvoihin, joiden suoli ei ole tyhjentynyt. Eliminaation mittaamiseen matojen suolta ei tule tyhjentää ennen siirtoa puhtaaseen sedimenttiin, jotta eläimille aiheutetaan mahdollisimman vähän ylimääräistä stressiä.

63. Vesi-, sedimentti- ja matonäytteet on analysoitava mieluiten välittömästi (ts. 1–2 tunnin kuluessa) siirtämisen jälkeen hajoamisen tai muiden häviöiden estämiseksi ja arvioitujen kertymä- ja eliminaatioarvojen laskemiseksi testin edetessä. Kun näytteet määritetään heti, voidaan myös nähdä nopeasti, milloin tasapainotila on saavutettu.

64. Jos välitön analyysi ei ole mahdollinen, näytteitä on säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa. Ota selvää tietyn testiaineen stabiiliudesta ja asianmukaisista säilytysolosuhteista ennen tutkimuksen aloittamista (esimerkiksi säilytyksen kesto ja lämpötila, uuttomenettelyt jne.). Jos näitä tietoja ei ole saatavilla ja jos sitä pidetään tarpeellisena, säilytyksen stabiiliutta voidaan seurata käyttämällä myös testiaineella käsiteltyjä kontrollikudoksia.

Määritysmenetelmän laatu

65. Koska koko menetelmään vaikuttaa olennaisesti testiaineen määritykseen käytettävän menetelmän tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys, on todettava kokeellisesti, että kyseisessä menetelmässä kemiallisen määrityksen täsmällisyys ja toistettavuus samoin kuin testiaineen saanto vesi-, sedimentti- ja matonäytteistä ovat hyväksyttäviä. Lisäksi on tarkistettava, ettei testiainetta

▼M6

havaita kontrolliastioissa taustapitoisuuksia suurempia pitoisuuksia. Jos tarpeen, korjaa saantojen C_w-, C_s- ja C_a-arvot sekä kontrollien tausta-arvot. Käsittele kaikkia näytteitä testin aikana siten, että kontaminaatio ja häviö ovat mahdollisimman pieniä (niitä voi aiheuttaa esimerkiksi testiaineen adsorptoituminen näytteenottovälineisiin).

66. Kokonaissaanto ja testiaineen saanto madoista, sedimentistä, vedestä ja tarvittaessa loukuista, jotka sisältävät adsorbentteja höyrystyneen testiaineen taltioimiseksi, on kirjattava muistiin ja raportoitava.

67. Koska radioleimattujen aineiden käyttö on suositeltavaa, myös kokonaisradioaktiivisuus on mahdollista analysoida (ts. alkuperäisestä aineesta ja hajoamistuotteista). Alkuperäisen aineen ja hajoamistuotteiden kvantifioinnista vakaassa tilassa tai kertymävaiheen lopussa voidaan saada tärkeää tietoa, jos kvantifiointi on analyyttisesti toteutettavissa. Jos tällaisia mittauksia on määrä tehdä, näytteille on tehtävä asianmukaiset uuttotoimenpiteet, jotta alkuperäinen aine on mahdollista kvantifioida erikseen. Jos havaitun hajoamistuotteen prosentuaalinen osuus testiorganismeissa vakaassa tilassa tai kertymävaiheen lopussa mitatusta radioaktiivisuudesta on huomattava (esimerkiksi > 10 prosenttia), tällaiset hajoamistuotteet on suositeltavaa määrittää (5).

68. Pienen yksilöllisen biomassan vuoksi testiaineen pitoisuutta jokaisessa yksittäisessä madossa ei usein ole mahdollista määrittää, ellei käytettävä testilaji ole Branchiura sowerbyi (madon yksilöllinen märkäpaino 40–50 mg) (11). Siksi tietystä testiastiasta näytteeksi otettujen yksilöiden yhdistäminen on hyväksyttävää, mutta se rajoittaa kuitenkin niitä tilastomenettelyjä, joita tietoihin voidaan soveltaa. Jos tietty tilastollinen menettely ja testin voima ovat tärkeitä, testissä on oltava riittävä määrä koe-eläimiä ja/tai rinnakkaisnäytetestiastioita, jotta haluttu yhdistäminen, menettely ja voima voidaan mukauttaa.

69. On suositeltavaa, että BAF ilmoitetaan sekä kokonaismärkäpainon ja kokonaiskuivapainon funktiona ja tarvittaessa (esimerkiksi erittäin lipofiilisten aineiden yhteydessä) lipidipitoisuuden ja sedimentin TOC-arvon funktiona. Lipidipitoisuuden määrittämiseen tulee käyttää sopivia menetelmiä (48) (49). Kloroformi-metanoliuuttoa (50) voi suositella standardimenetelmänä (48). Klooripitoisten liuottimien käytön välttämiseksi voidaan kuitenkin käyttää kohdassa (51) kuvattua Blighin ja Dyerin menetelmän rengastestissä sovellettua muunnosta (50). Koska eri menetelmillä ei välttämättä saada samoja arvoja (48), on tärkeää kuvata käytetty menetelmä. Jos mahdollista (jos esimerkiksi matokudosta on riittävästi), lipidipitoisuus mitataan samasta näytteestä tai uutteesta, josta testiaine määritetään, koska rasvat täytyy usein poistaa uutteesta ennen kuin sitä voi käyttää kromatografisessa analyysissa (5). Lipidipitoisuuden mittaamiseen on kuitenkin hyvä käyttää totutettuja kontrollieläimiä ainakin kertymävaiheen alussa tai – mieluiten – lopussa esimerkiksi kolmessa näytteessä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

70. Testiaineen kertymäkäyrä saadaan tekemällä aritmeettinen asteikko testiaineen pitoisuudesta madoissa tai niiden pinnalla kertymävaiheessa suhteessa

▼M6

aikaan. Jos käyrä on saavuttanut tasannevaiheen, laske vakaan tilan BAF_{ss}:

$$\frac{C_a \text{vakaassa tilassa tai päivänä 28 (keskiarvo)}}{C_s \text{vakaassa tilassa tai päivänä 28 28 (keskiarvo)}}$$

71. Määritä kineettinen biokertyvyyskerroin (BAFK) kertymävakion (ks) ja eliminaatiovakion (ke) suhteena. Eliminaatiovakio (ke) määritetään yleensä eliminaatiokäyrästä (joka toisin sanoen kuvaa testiaineen pitoisuutta madoissa eliminaatiovaiheessa). Kertymävakio (ks) lasketaan kertymäkäyrän kinetiikasta. Paras menetelmä BAFK:n ja nopeusvakioiden ks ja ke laskemiseksi on estimoida epälineaariset parametrit tietokoneella (ks. lisäys 2). Jos on ilmeistä, ettei eliminaatio noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, on käytettävä monimutkaisempia malleja (25) (27) (52).

72. Biota-sedimentti-kertyvyyskertoin (BSAF) määritetään normalisoimalla BAFK matojen lipidipitoisuuden ja sedimentin orgaanisen hiilen kokonaispitoisuuden osalta.

Tulosten tulkinta

73. Tulosten tulkinnassa on oltava varovainen, jos testipitoisuuksista mitatut pitoisuudet ovat lähellä käytetyn analyysimenetelmän havaitsemisrajaa.

74. Selvät kertymä- ja eliminaatiokäyrät ovat merkki laadukkaista biokertyvyystiedoista. Yleensä hyvin suunnitelluista tutkimuksista saatujen BAF-arvojen luottamusvälit eivät saisi ylittää 25:tä prosenttia (5).

Testiraportti

75. Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Testiaine

— puhtaus, fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, esim. log K_{ow}, vesiliukoisuus

— kemialliset tunnistetiedot, testiaineen lähde, mahdollisesti käytetyn liuottimen tunnistetiedot ja pitoisuus

— jos testiaine on radioleimattu, leimattujen atomien tarkka sijainti, ominaisradioaktiivisuus ja epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden prosenttiosuus.

Testilajit

— tieteellinen nimi, kanta, lähde, mahdollinen esikäsittely, totuttamistiedot, ikä, koko jne.

Testiolosuhteet

— testauksessa käytetty menetelmä (staattinen, semistaattinen tai läpivirtausmenetelmä)

— käytetty valaistustyyppi ja valon ominaisuudet sekä valojakso(t)

— testisuunnitelma (testiastioiden lukumäärä, materiaali ja koko, veden tilavuus, sedimentin massa ja tilavuus, veden vaihtumisonopeus (läpivirtaus- tai semistaattisissa menetelmissä), ennen testiä ja sen aikana käytetty ilmastus, rinnakkaisnäytteiden määrä, matojen lukumäärä rinnakkaisnäytettä kohti, testipitoisuuksien lukumäärä, kertymä- ja eliminaatiovaiheiden pituus, näytteenottotiheys)

▼**M6**

— testiaineen valmistelu ja lisäys sekä tietyn menetelmän valintaperusteet

— nimellistestipitoisuudet

— keinotekoisen veden ja sedimentin ainesosien lähde tai – luonnollisia väliaineita käytettäessä – veden ja sedimentin alkuperä; kuvaus mahdollisista esikäsittelyistä; todisteet siitä, että koe-eläimet voivat elää ja/tai lisääntyä käytetyssä väliaineessa; sedimentin ominaisuudet (pH ja huokosveden ammoniakkipitoisuus (luonnolliset sedimentit), orgaanisen hiilen pitoisuus (TOC), hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet), vesipitoisuus prosentteina ja kaikki muut mittaukset)) sekä veden ominaisuudet (pH, kovuus, johtavuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos mitattu) ja kaikki muut tehdyt mittaukset))

— keinosedimentin nimellinen ja mitattu kuivapaino prosenttiosuutena märkäpainosta (tai kuivapainon ja märkäpainon suhde); mitattu kuivapaino prosenttiosuutena märkäpainosta (tai kuivapainon ja märkäpainon suhde) kenttäsedimenttien osalta

— veden laatu testiastioissa luonnehdittuna seuraavilla tekijöillä: lämpötila, pH, ammonium, kokonaiskovuus ja liuennen hapen pitoisuus

— yksityiskohtaiset tiedot vesi-, sedimentti- ja matonäytteiden käsittelystä, mukaan luettuina tiedot testiaineen säilytyksestä, lisäämistavasta, uutosta ja analyysimenetelmistä (ja tarkkuudesta) sekä lipidipitoisuudesta (jos mitattu) ja testiaineen saannista.

Tulokset

— kontrollimatojen ja jokaisessa testiastiassa olevien matojen kuolleisuus sekä mahdollisesti havaitut subletaalit vaikutukset, mukaan luettuna epänormaali käyttäytyminen (kuten sedimentin välttely, ulostepellettien esiintyminen tai niiden puute, lisääntymättömyys)

— sedimentin ja testiorganismien mitattu kuivapaino prosenttiosuutena märkäpainosta (tai kuivapainon ja märkäpainon suhde) (hyödyllinen normalisoinnissa)

— matojen lipidipitoisuus

— käyrät, jotka osoittavat testiaineen kertymä- ja eliminaatiokinetiikan madoissa, ja vakaan tilan saavuttamiseen kuluneen ajan

— C_a, C_s ja C_w (sekä keskihajonta ja vaihteluväli tarvittaessa) kaikilta näytteenottokerroilta (C_a ilmaistuna muodossa grammaa kilossa koko ruumiin märkä- ja kuivapainoa, C_s ilmaistuna muodossa grammaa kilossa sedimentin märkä- ja kuivapainoa ja C_w muodossa milligrammaa litrassa). Jos biota-sedimentti-kertyvyyskerroin (BSAF, ks. määritelmä lisäyksestä 1) tarvitaan (esimerkiksi jotta voidaan verrata tuloksia kahdesta tai useammasta testistä, jotka on tehty eläimillä, joiden lipidipitoisuus on eri), C_a tulisi ilmaista lisäksi muodossa grammaa kilossa organismin lipidipitoisuutta, ja C_s tulisi ilmaista muodossa grammaa kilossa sedimentin orgaanista hiiltä

— BAF (ilmaistuna muodossa kiloa märkää sedimenttiä kilossa märkää matoa), sedimentin kertymävakio k_s (ilmaistuna muodossa grammaa märkää sedimenttiä kilossa märkää matoa, d^{-1}), ja eliminaatiovakio k_e (ilmaistuna muodossa d^{-1}); lisäksi voidaan raportoida BSAF (ilmaistuna muodossa kiloa sedimentin liuennutta happea kilossa matojen lipidipitoisuutta)

▼**M6**

— eliminoitumattomat jäämät (NER) eliminaatiovaiheen lopussa

— jos mitattu: koe-eläimissä havaitut prosenttiosuudet alkuperäisestä aineesta, hajoamistuotteista ja sitoutuneista jäämistä (ts. se osuus testiainetta, jota ei voida uuttaa tavallisilla uuttomenetelmillä)

— tietojen tilastollisissa analyyseissa käytetyt menetelmät.

Tulosten arviointi

— kohdassa 21 annettujen luotettavuusehtojen täyttyminen

— odottamattomat tai epätavalliset tulokset, esimerkiksi testiaineen täydellinen eliminoituminen koe-eläimistä; tällöin mahdollisen esitutkimuksen tuloksista voidaan saada hyödyllistä tietoa.

▼M6

Lisäys 1

Määritelmät ja yksiköt

Keinotekoinen sedimentti (tai synteettinen sedimentti) on luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

Biokertyvyys on organismissa tai sen pinnalla olevan testiaineen pitoisuuden lisääntyminen verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen väliaineessa. Biokertymistä aiheuttaa biokonsentraatio ja biomagnifikaatio (katso seuraavat kohdat).

Biokertyvyyskerroin (BAF) minä tahansa aikana tämän biokertyvyystestin kertymävaihetta on testiaineen pitoisuus organismissa tai sen pinnalla (C_a = grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa) jaettuna aineen pitoisuudella ympäröivässä väliaineessa (C_s = grammaa kilossa sedimentin märkä- tai kuivapainoa). C_a- ja C_s-yksiköihin viittaamiseksi BAF: yksikkö on muotoa ”kg sedimenttiä kilossa matoa” (15).

Biokertyvyyskertoimia, jotka on laskettu suoraan sedimentin kertymävakion ja eliminaatiovakion suhteesta jaettuna nopeusvakioilla (k_s ja k_e, ks. jäljempää), kutsutaan kineettisiksi biokertyvyyskertoimiksi (BAF_K).

Biokonsentroituminen on organismissa tai sen pinnalla olevan testiaineen pitoisuuden lisääntyminen, jossa kertyminen tapahtuu pelkästään aineen saannista ruumiin pinnan kautta, verrattuna testiaineen pitoisuuteen väliaineessa.

Biomagnifikaatio on organismissa tai sen pinnalla olevan testiaineen pitoisuuden lisääntyminen, joka johtuu pääasiassa kontaminoituneen ravinnon tai saaliin nauttimisesta, verrattuna testiaineen pitoisuuteen ravinnossa tai saaliissa. Biomagnifikaatio voi aiheuttaa testiaineen siirtymistä tai kertymistä ravintoverkoissa.

Biota-sedimentti-kertyvyyskerroin (BSAF) on testiaineen lipidien suhteen normalisoitu vakaan tilan pitoisuus testiorganismissa tai sen pinnalla jaettuna orgaanisen hiilen suhteen normalisoidulla aineen pitoisuudella sedimentissä vakaassa tilassa. C_a ilmoitetaan muodossa ”grammaa kilossa organismin lipidipitoisuutta” ja C_s muodossa ”grammaa kilossa sedimentin orgaanisen aineen pitoisuutta”.

Sopeuttamisvaihetta käytetään sedimentin mikrobien vakauttamiseen ja esimerkiksi sedimentin ainesosissa olevan ammoniakin poistamiseen; sopeuttaminen tehdään ennen testiaineen lisäämistä sedimenttiin. Tavallisesti yläpuolinen vesi hävitetään sopeuttamisen jälkeen.

Eliminaatio on testiaineen poistumista testiorganismikudoksesta aktiivisilla tai passiivisilla prosesseilla riippumatta siitä, onko ympäröivässä väliaineessa testiainetta vai ei.

Eliminaatiovaihe alkaa, kun testiorganismit on siirretty kontaminoituneesta väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole testiainetta. Eliminaatiovaiheen aikana tutkitaan kyseisen testiaineen (netto)poistumaa testiorganismeista.

Eliminaatiovakio (k_e) on numeerinen arvo, joka kuvaa testiaineen pitoisuuden alenemisen nopeutta testiorganismissa tai sen pinnalla, kun testiorganismit on siirretty testiainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta; k_e ilmoitetaan muodossa d^{-1}.

▼M6

Tasapainottumisaikaa käytetään testiaineen jakaantumiseen kiinteään faasiin, huokosveteen ja yläpuoliseen veteen. Sitä sovelletaan ennen testiaineen lisäämistä sedimenttiin ja ennen testiorganismien lisäämistä.

Oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin (K_{ow}) on aineen n-oktanoliliukoisuuden ja vesiliukoisuuden suhde tasapainotilassa, josta käytetään myös merkintää P_{ow}. Logaritmia K_{ow} (log K_{ow}) käytetään ilmaisemaan kemikaalin biokertyvyyspotentiaalia vesieliöissä.

Orgaaninen hiili-vesi-jakaantumiskerroin (K_{oc}) on aineen sedimentin orgaanisen hiilen fraktiossa tai sen pinnalla olevan pitoisuuden ja vedessä tasapainotilassa olevan pitoisuuden välinen suhde.

Yläpuolinen vesi on testiastiassa sedimentin päällä oleva vesi.

Tasannevaihe tai **vakaa tila** on altistusvaiheessa samanaikaisesti tapahtuvien kertymä- ja eliminaatioprosessien välinen tasapainotila. Vakaa tila saavutetaan BAF:ää jokaisen näytteenottokerran ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä BAF-määritystä poikkeavat enintään ± 20 prosenttia ja kun näiden kolmen näytteenottoajanjakson välillä ei ole tilastollisesti merkitseviä eroja. Kun testataan aineita, jotka kertyvät hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta (5).

Huokosvesi on sedimentin tai maa-aineksen hiukkasten välissä olevaa vettä.

Sedimentin kertymävakio (k_s) on numeerinen arvo, joka määrittää, kuinka nopeasti testiaineen pitoisuus lisääntyy testiorganismissa tai sen pinnalla, koska testiainetta kertyy sedimenttifaasista. k_s ilmaistaan muodossa grammaa sedimenttiä kilossa matoa, d^{-1}.

Käsitelty sedimentti on sedimenttiä, johon on lisätty testiaine.

Vakaan tilan biokertyvyyskerroin (BAF_{ss}) on biokertyvyyskerroin vakaassa tilassa, eikä se muutu merkittävästi pitkän ajanjakson aikana, kun testiaineen pitoisuus väliaineessa on vakio tänä aikana (C_s = grammaa kilossa sedimentin kuivapainoa).

Kertymä- eli altistumisvaihe on aika, jona testiorganismit altistetaan testiaineelle.

▼M6

Lisäys 2

Kertymä- ja poistumaparametrien laskeminen

Biokertymistestin tärkein tutkittava ominaisuus on biokertyvyystekijä BAF. Mitattu BAF voidaan laskea jakamalla testiaineen pitoisuus testiorganismissa, C_a, testiaineen pitoisuudella sedimentissä, C_s, vakaassa tilassa. Jos vakaata tilaa ei saavuteta 28 päivän aikana, BAF lasketaan samalla tavalla päivän 28 osalta. On kuitenkin ilmoitettava, perustuuko BAF vakaan tilan pitoisuuksiin vai ei.

Ensisijainen keino määrittää kineettinen biokertyvyyskerroin (BAF_K), sedimentin kertymävakio (k_s) ja eliminaatiovakio (k_e) on käyttää epälineaarisen mallin parametrien estimointiin tarkoitettuja tietokoneohjelmia. Kun ohjelmaan syötetään kertymävaiheen keskimääräisten kertymäkerrointen aikasarjat (C_a, keskiarvot jokaiselta näytteenottokerralta / C_s, keskiarvot jokaiselta näytteenottokerralta = AF) matojen ja sedimentin märkäpainon perusteella sekä malliyhtälö

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[yhtälö 1]}$$

jossa AF(t) on matojen ja sedimentin testiainepitoisuuden suhde minä tahansa kertymävaiheen ajankohtana (t), nämä tietokoneohjelmat laskevat $BAF_{K:n}$, k_s:n ja k_e:n arvot.

Kun vakaa tila saavutetaan kertymävaiheen aikana (i.e. $t = \infty$), yhtälö 1 voidaan yksinkertaistaa seuraavasti:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[yhtälö 2]}$$

jossa

k_s = kertymävakio kudoksessa [grammaa sedimenttiä kilossa matoa, d^{-1}]

k_e = eliminaatiovakio [d^{-1}]

Sen jälkeen kaavalla $k_s/k_e \times C_s$ voidaan laskea testiaineen pitoisuus matokudoksessa vakaassa tilassa ($C_{a,ss}$).

Biota-sedimentti-kertyvyyskerroin (BSAF) tulee laskea seuraavasti:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

jossa foc on sedimentin orgaanisen hiilen fraktio ja flip on matojen lipidipitoisuuden fraktio joko kuivapainon tai märkäpainon perusteella.

Kun pitoisuusarvojen aikasarjat on annettu, eliminaatiokinetiikka voidaan mallintaa käyttämällä seuraavia malliyhtälöitä ja tietokonelaskentaa, joka perustuu epälineaarisen mallin parametrien estimointimenetelmään.

Oletusaloituspisteenä suositellaan käytettäväksi kertymävaiheen lopussa mitattua keskimääräistä ruumiin jäämäarvoa, Kertymävaiheen perusteella mallinnettua/estimoitua arvoa tulisi käyttää vain, jos esimerkiksi mitattu arvo poikkeaa merkittävästi mallinnetusta ruumiin jäämäarvosta. Katso myös 50 kohta, jossa käsitellään eliminaatiovaiheeseen otettavien matojen esialtistusta; tässä lähestymistavassa näistä esialtistetuista madoista, joista otetaan näytteet eliminaatiovaiheen päivänä 0, oletetaan saatavan realistiset ruumiin jäämäarvot, joista eliminaatiokinetiikan selvittäminen voi alkaa.

▼M6

Jos ajan suhteen esitetyt datapisteet viittaavat testiaineen pitoisuuden jatkuvaan eksponentiaaliseen pienenemiseen eläimissä, eliminaation ajallista esiintymistä voidaan kuvata yhden lohkon mallilla (yhtälö 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[yhtälö 3]}$$

Toisinaan eliminaatioprosessit vaikuttavat kaksivaiheisilta: C_a pienenee nopeasti alkuvaiheissa, mutta eliminaation myöhemmissä vaiheissa testiaineet häviävät hitaammin (8) (19) (25). Nämä kaksi vaihetta voidaan tulkita olettamalla, että organismissa on kaksi eri lohkoa, joista testiaine poistuu eri nopeuksilla. Tällöin on tutustuttava asiaa käsittelevään kirjallisuuteen (15) (16) (17) (25).

Kahden lohkon eliminaatiota kuvataan esimerkiksi seuraavalla yhtälöllä (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[yhtälö 4]}$$

A ja B edustavat lohkojen kokoa (prosenttiosuutena kokonaiskudosjäämästä), ja A on se lohko, joista aine poistuu nopeasti ja B se lohko, joista aine poistuu hitaasti. A:n ja B:n summa on yhtä kuin 100 prosenttia eläimen koko lohkotilavuudesta vakaassa tilassa. k_a ja k_b edustavat vastaavia eliminaatiovakioita [d^{-1}]. Jos kahden lohkon malli sovitetaan eliminaatiotietoihin, kertymävakio k_s voidaan määrittää seuraavasti (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[yhtälö 5]}$$

Näitä malliyhtälöitä on kuitenkin syytä käyttää varoen etenkin jos testiaineen biosaatavuudessa tapahtuu muutoksia testin aikana (42).

Vaihtoehtona edellä kuvatuille malliyhtälöille kinetiikka (k_s ja k_e) voidaan laskea myös yhdellä kertaa soveltamalla ensimmäisen asteen kineettistä mallia samanaikaisesti kaikkiin kertymä- ja eliminaatiovaiheen tietoihin. Tällaisen kertymä- ja eliminaatiovakioiden yhdistetyn laskentamenetelmän kuvaus on lähdeviitteissä (55), (56) ja (57).

Eliminoitumattomat jäämät (NER) tulee laskea toissijaisena tutkittavana ominaisuutena kertomalla matojen keskimääräisen pitoisuuden (C_a) eliminaatiovaiheen päivänä 10 ja matojen keskimääräisen pitoisuuden (C_a) vakaassa tilassa (kertymävaiheen päivä 28) välinen suhde sadalla:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \textit{at the end of elimination}(\textit{average}) \times 100}{C_a \textit{at steady state}(\textit{average})}}$$

▼M6

Lisäys 3

Esimerkki 28 päivän mittaisen biokertyvyystestin näytteenottoaikataulusta

a) **Kertymävaihe (sisältään neljän päivän tasapainottumisvaiheen)**

Päivä	Toiminnot
– 6	Turvesuspension valmistaminen sedimenttiä varten; suspension sopeuttamisvaihe 48 tuntia
– 4	Testiaineen lisääminen sedimenttiin tai sedimenttifraktioon; kaikkien sedimentin ainesosien sekoittaminen; näytteiden ottaminen käsitellystä ja liuotinkontrollisedimentistä testiaineen pitoisuuden määritystä varten; yläpuolisen veden lisääminen; inkubointi testiolosuhteissa (tasapainottumisvaihe)
– 3/– 2	Testiorganismien valitseminen kasvatusalustalta totutteluvaihetta varten
0	Veden laadun mittaus (ks. 52 kohta); rinnakkaisnäytteiden ottaminen esille vesi- ja sedimenttinäytteiden ottamista varten testiainepitoisuuden määrittämiseksi; matojen jakaminen satunnaistetusti testiastioihin; riittävien alanäytteiden säilyttäminen madoista analyyttisten tausta-arvojen määrittämistä varten; tuloilman kontrollointi, jos käytetään suljettua testijärjestelmää
1	Ota rinnakkaisnäytteet esille näytteenottoa varten; kontrolloi tuloilma, matojen käyttäytyminen, veden laatu (ks. 56 kohta); ota vesi-, sedimentti- ja matonäytteet testiaineen pitoisuuden määrittämiseksi
2	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
3	Sama kuin päivänä 1
4–6	Sama kuin päivänä 2
7	Sama kuin päivänä 1; kompensoi haihtunut vesi tarvittaessa
8–13	Sama kuin päivänä 2
14	Sama kuin päivänä 1; kompensoi haihtunut vesi tarvittaessa
15–20	Sama kuin päivänä 2
21	Sama kuin päivänä 1; kompensoi haihtunut vesi tarvittaessa
22–27	Sama kuin päivänä 2
28	Sama kuin päivänä 1; veden laadun mittaus (ks. 52 kohta); kertymävaiheen päättäminen; riittävien alanäytteiden säilyttäminen madoista analyyttisten tausta-arvojen, märkä- ja kuivapainon sekä lipidipitoisuuden määrittämistä varten; matojen siirtäminen lopuista altistetuista rinnakkaisnäyteastioista puhdasta sedimenttiä sisältäviin astioihin eliminaatiovaihetta varten (ei suolen tyhjennystä); vesi-, sedimentti- ja matonäytteiden ottaminen liuotinkontrolleista; näytteenotto imeytysliuoksista, jos käytössä.
	Esialtistustoimet (tasapainottumisvaihe) on ajoitettava testiaineen ominaisuuksien mukaan. Tarvittaessa valmistetun sedimentin on annettava sopeutua yläpuolisen veden alla 20 ± 2 °C:n lämpötilassa seitsemän päivän ajan; tässä tapauksessa sedimentti on valmistettava aikaisemmin!
	Päivänä 2 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

▼**M6**

b) **Eliminaatiovaihe**

Päivä	Toiminnot
– 6	Turvesuspension valmistaminen sedimenttiä varten; suspension sopeuttamisvaihe 48 h
– 4	Kaikkien sedimentin ainesosien sekoittaminen; näytteiden ottaminen käsitellystä ja liuotinkontrollisedimentistä testiaineen pitoisuuden määritystä varten; yläpuolisen veden lisääminen; inkubointi testiolosuhteissa
0 (kertymävaiheen päivä 28)	Veden laadun mittaus (ks. 52 kohta); siirrä madot lopuista altistetuista rinnakkaisnäytteistä puhdasta sedimenttiä sisältäviin astioihin; ota rinnakkaisnäytteistä **4–6** tunnin kuluttua vesi-, sedimentti- ja matonäytteet testiaineen pitoisuuden määrittämiseksi; jaa madot satunnaistetusti testiastioihin
1	Ota rinnakkaisnäytteet esille näytteenottoa varten; kontrolloi tuloilma, matojen käyttäytyminen, veden laatu (ks. 52 kohta); ota vesi-, sedimentti- ja matonäytteet testiaineen pitoisuuden määrittämiseksi
2	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
3	Sama kuin päivänä 1
4	Sama kuin päivänä 2
5	Sama kuin päivänä 1
6	Sama kuin päivänä 2
7	Sama kuin päivänä 1; kompensoi haihtunut vesi tarvittaessa
8–9	Sama kuin päivänä 2
10	Sama kuin päivänä 1; eliminaatiovaiheen päättäminen; veden laadun mittaus (ks. 52 kohta); vesi-, sedimentti- ja matonäytteiden ottaminen liuotinkontrolleista; näytteenotto imeytysliuoksista, jos käytössä.
	Sedimentti valmistellaan ennen eliminaatiovaiheen alkamista samoin kuin ennen kertymävaihetta.
	Päivänä 2 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

▼**M6**

Lisäys 4

Joitakin hyväksyttävän laimennusveden fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia

AINESOSA	PITOISUUDET
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 µg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 ug/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

SUOSITELLUN SYNTEETTISEN VEDEN KOOSTUMUS

a) Kalsiumkloridiliuos

Liuota 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$:ta deionisoituun veteen ja lisää deionisoitua vettä yhteen litraan saakka.

b) Magnesiumsulfaattiliuos

Liuota 4,93 g $MgSO_4 . 7\ H_2O$:ta deionisoituun veteen ja lisää deionisoitua vettä yhteen litraan saakka.

c) Natriumbikarbonaattiliuos

Liuota 2,59 g $NaHCO_3$:a deionisoituun veteen ja lisää deionisoitua vettä yhteen litraan saakka.

d) Kaliumkloridiliuos

Liuota 0,23 g KCl:a deionisoituun veteen ja lisää deionisoitua vettä yhteen litraan saakka.

Kaikkien kemikaalien on oltava analyyttistä laatua.

Tislatun tai deionisoidun veden johtavuus saa olla enintään 10 μScm^{-1}.

25 ml jokaisesta liuoksesta (a–d) sekoitetaan ja kokonaistilavuudeksi valmistetaan yksi litra deionisoidulla vedellä. Tämän liuoksen kalsium- ja magnesiumionien summa on 2,5 mmol/l.

Ca:Mg-ionien suhde on 4:1 ja Na:K-ionien suhde on 10:1. Tämän liuoksen happokapasiteetti $K_{S4.3}$ on 0,8 mmol/l.

Ilmasta laimennusvettä, kunnes happikyllästys saavutetaan, ja säilytä sitä sen jälkeen noin kaksi päivää ilmastamatta ennen käyttöä.

Hyväksyttävän laimennusveden pH:n tulisi olla 6–9.

▼M6

Lisäys 5

Keinosedimentti – valmistus- ja säilytyssuosituksia

Toisin kuin testimenetelmän C.8 (40) vaatimuksissa, keinosedimentin turvepitoisuudeksi suositellaan 10 prosentin sijasta kahta prosenttia kuivapainosta, jotta se vastaisi luonnollisten sedimenttien orgaanisen aineksen pitoisuutta, joka on pieni tai kohtalainen (58).

Keinosedimentin kuivien ainesosien prosenttiosuudet:

Ainesosa	Ominaisuudet	Prosenttia kuivasta sedimentistä
Turve	Rahkasammalturve, hajoamisaste: ”medium”, ilmakuivattu, ei näkyviä kasvinjäänteitä, hienojakoinen (hiukkaskoko ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Kvartsi-hiekka	Raekoko: ≤ 2 mm, mutta > 50 prosentin hiukkasista on oltava kokoa 50–200 μm	76
Kaoliniitti-savi	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %	22 ± 1
Ravinto	*Folia urticae*, *Urtica sp.*:n (nokkosen) hienoksi jauhetut lehdet (hiukkaskoko ≤ 0,5 mm) tai seos, joka koostuu *Urtica sp.:n* jauhetuista lehdistä ja alfaselluloosasta (1: 1); lääkestandardien ja elintarvikkeita koskevien vaatimusten mukaisesti; kuivan sedimentin lisäksi	0,4–0,5 %
Kalsium-karbonaatti	$CaCO_3$, jauhemainen, kemiallisesti puhdas, kuivan sedimentin lisäksi	0,05–1
Deionisoitu vesi	Johtavuus ≤ 10 μS/cm, kuivan sedimentin lisäksi	30–50

Jos ammoniakkipitoisuuden suurentuminen on odotettavissa (esimerkiksi jos testiaineen tiedetään estävän nitrifikaatiota), voi olla hyödyllistä korvata puolet typpipitoisesta nokkosjauheesta selluloosalla (ts. α-selluloosajauhe, hiukkaskoko ≤ 0,5 mm).

Valmisteluvaihe

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi jauheeksi (raekoko ≤ 0,5 mm, ei näkyviä kasvijäämiä). Tarvittavasta määrästä turvejauhetta valmistetaan suspensio käyttämällä sitä määrää deionisoitua vettä, joka on lisättävä kuivaan sedimenttiin (on havaittu, että kun veden tilavuus on 11,5 kertaa turpeen kuivapaino, muodostuu sekoitettava turveliete (8)) tehokasta homogenisointilaitetta käyttäen.

Tämän suspension pH säädetään $CaCO_3$:lla välille 5,5 ± 0,5. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen ja säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla välille 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen suspensioon sekoitetaan kaikki muut kuivat ainesosat; tässä on otettava huomioon testiaineen lisäämiseen käytetty osuus. Seokseen lisätään loput deionisoidusta vedestä, jotta saadaan aikaan homogeeninen sedimentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen ja säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla välille 6,5 ± 7,5. Jos ammoniakin muodostumista on odotettavissa, sedimentin pH-arvo kannattaa pitää pienempänä kuin 7,0 (6,0–6,5). Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. Jos ammoniakin muodostuminen on odotettavissa, keinosedimenttiä voidaan sopeuttaa seitsemän päivän ajan samoissa olosuhteissa, jotka vallitsevat varsinaisessa testissä (ts. sedimentin ja veden suhde 1:4, sedimenttikerroksen korkeus sama kuin testiastioissa), ennen kuin siihen lisätään testiainetta. Siihen on siis lisättävä ilmastettua vettä. Tämän sopeuttamisvaiheen jälkeen yläpuolinen vesi on poistettava ja hävitettävä. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (ts. kolme näytettä).

▼M6

Sen jälkeen sedimenttiin sekoitetaan kvartsihiekkaa, johon on lisätty testiainetta jokaisen käsittelytason mukaisesti. Sedimentti jaetaan rinnakkaisnäytetestiastioihin, joihin lisätään testivesi (ts. sedimentin ja veden suhde 1:4, sedimenttikerroksen korkeus sama kuin testiastioissa). Tämän jälkeen astioita inkuboidaan samoissa olosuhteissa, jotka vallitsevat varsinaisessa testissä. Tästä alkaa tasapainotusvaihe. Yläpuolinen vesi tulee ilmastaa.

Valittu ravinnonlähde on lisättävä astioihin ennen kuin sedimenttiin lisätään testiaine tai sen aikana. Se voidaan sekoittaa myös turvesuspensioon (ks. edellä). Ravinnon liiallinen hajoaminen ennen testiorganismien lisäämistä – esimerkiksi kun tasapainottumisaika on pitkä – voidaan välttää pitämällä ravinnon lisäämisen ja altistumisen aloittamisen välinen aika mahdollisimman lyhyenä. Sen varmistamiseksi, että ravinto on riittävästi kosketuksissa testiaineeseen, ravinto tulisi sekoittaa sedimenttiin viimeistään sinä päivänä, kun testiaine lisätään sedimenttiin. Poikkeuksia voidaan tehdä, jos tasapainottumisajan pituus johtaa ravinnon liialliseen mikrobiaaliseen hajoamiseen ennen testiorganismien lisäämistä. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (ts. kolme näytettä testiainetta sisältävästä sedimentistä tai kontrollisedimentistä).

Ainesosien (turve, hiekka, kaoliini) kuivapaino on ilmoitettava grammoina ja prosentteina kokonaiskuivapainosta.

Sedimentin valmistamisen aikana kuiviin ainesosiin lisättävän veden tilavuus on myös ilmoitettava prosentteina kokonaiskuivapainosta (esimerkiksi kun kuivapaino on 100 prosenttia ja veden tilavuus 46 prosenttia, 1 000 gramman kuivapainosta yhteensä 460 ml vettä, mistä tulokseksi saadaan 1 460 grammaa märkää sedimenttiä).

Varastointi

Keinosedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa huoneenlämmössä. Valmistettu märkä sedimentti voidaan säilyttää (käytettäväksi myöhemmin vain laboratorioviljelyssä) 4 ± 2 °C:n lämpötilassa pimeässä 2–4 viikon ajan valmistuspäivästä alkaen (8).

Sedimentti, johon on lisätty testiaine, on käytettävä heti, ellei ole tiedossa, että tiettyä sedimenttiä voidaan säilyttää ilman, että se vaikuttaa testiaineen myrkyllisyyteen ja biologiseen saatavuuteen. Näytteitä sedimentistä, johon testiainetta on lisätty, voidaan säilyttää kyseisen testiaineen suositelluissa säilytysolosuhteissa analyysiin saakka.

▼M6

Lisäys 6

Biokertyvyystestaukseen suositeltavat harvasukasmatolajit

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Harvasukasmatoihin kuuluva torvimato (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) elää makean veden sedimenteissä rakentamissaan putkissa, jotka on pinnoitettu limalla. Madot elävät näissä putkissa pää alaspäin ja nielevät sedimenttihiukkasia hyödyntäen niissä olevia mikro-organismeja ja orgaanista jätettä. Madon takapää heilahtelee yleensä yläpuolisessa vedessä hengittämistä varten. Vaikka tämä laji elää monenlaisissa sedimenttityypeissä kaikkialla pohjoisella pallonpuoliskolla, *Tubifex tubifex* suosii melko hienojakoista ravintoa (59). Tämän lajin soveltuvuutta ympäristömyrkyllisyyden testaukseen kuvataan esimerkiksi lähdeviitteissä (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Viljelymenetelmät

Jotta *Tubifex tubifex* -yksilöitä olisi riittävästi biokertyvyystestien tekemistä varten, matoja on kasvatettava laboratoriossa jatkuvasti. Testimenetelmässä C.1 *T. tubifexin* kasvattamiseen suositellaan järjestelmää, joka koostuu keinomaahan perustuvasta keinosedimentistä ja synteettisestä vedestä (8).

Kasvatusastioina voidaan käyttää lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja säiliöitä, joiden korkeus on 12–20 cm. Jokaiseen kasvatussäiliöön laitetaan kerros lisäyksessä 5 kuvatun mukaisesti valmistettua märkää keinosedimenttiä. Sedimenttikerroksen pitäisi olla niin syvä, että matojen luonnollinen kaivautumiskäyttäytyminen on mahdollista (vähimmäissyvyys *T. tubifexille* 2 cm). Järjestelmään lisätään synteettistä vettä varovasti, jotta sedimentti ei häiriinny. Vesikerrosta ilmastetaan kevyesti (noin kaksi kuplaa sekunnissa 0,45 μm:n suodattimella suodatetulla ilmalla) Pasteur-pipetillä, joka sijaitsee noin kahden senttimetrin päässä sedimentin pinnasta. Suositeltu kasvatuslämpötila on 20 ± 2 °C.

Kasvatusjärjestelmään lisätään matoja siten, että enimmäistäyttöaste on 20 000 yksilöä neliömetrillä sedimentin pintaa. Suurempi täyttöaste saattaa hidastaa kasvua ja lisääntymistä (43).

Keinosedimenttiin perustuvissa kasvatusjärjestelmissä matoja on ruokittava. Ravintona voidaan käyttää hienojakoista kalanruokaa, esimerkiksi TetraMin®-valmistetta voidaan käyttää lisäravinteena (8); Klerks 1994, henkilökohtainen tiedonanto. Ruokintatiheyden tulee olla sellainen, että madot kasvavat ja lisääntyvät riittävästi ja että ammoniakin muodostuminen ja sienten kasvaminen kasvatusjärjestelmässä pysyy mahdollisimman pienenä. Ruokaa voidaan annostella kahdesti viikossa (esimerkiksi 0,6–0,8 mg sedimentin pinnan neliösenttimetriä kohti). Käytännön kokemus on osoittanut, että deionisoituun veteen suspendoidun ja homogenisoidun ruoan antaminen saattaa edistää ruoan jakautumista tasaisesti sedimentin pinnalle kasvatussäiliöissä.

Ammoniakin kertymisen välttämiseksi yläpuolinen vesi on vaihdettava läpivirtausjärjestelmää käyttäen tai manuaalisesti vähintään kerran viikossa. Varastokasvatusjärjestelmissä sedimentti on vaihdettava kolmen kuukauden välein.

Kasvatusjärjestelmästä voidaan ottaa näytteitä madoista siivilöimällä kasvatussedimentti 1 mm:n siivilällä, jos vain täysikasvuisia matoja tarvitaan. Munakoteloiden säilyttämiseksi 0,5 mm:n siivilä on sopiva ja nuorten matojen säilyttämiseksi 0,25 mm:n siivilä. Siivilät voidaan laittaa synteettiseen veteen, kun sedimentti on valunut siivilän läpi. Madot lähtevät siivilästä, ja ne voidaan poimia vedestä käyttämällä pehmeäkärkisiä pinsettejä tai pipettiä, jonka reunat on liekkikiillotettu.

▼M6

Testin aloittamisessa tai uusien matojen kasvattamisessa käytetään vain vahingoittumattomia ja selvästi tunnistettuja *Tubifex tubifex* -yksilöitä (esimerkiksi lähdeviite (64)). Sairaat tai vaurioituneet madot sekä munakotelot, joissa kasvaa sienirihmastoja, on hävitettävä.

Synkronisoidusta kasvatusjärjestelmästä voidaan saada tietyn ikäisiä matoja sopivin väliajoin tarvittaessa. Uusia kasvatusastioita perustetaan tietyin väliajoin (esimerkiksi kahden viikon välein), ja niissä käytetään tietyn ikäisiä eläimiä (kuten kotelovaiheessa olevia matoja). Edellä kuvatuissa kasvatusolosuhteissa madot ovat täysikasvuisia 8–10 viikon kuluttua. Kasvatussäiliöistä voidaan kerätä matoja, kun ne ovat muodostaneet uusia munakoteloita, eli 10 viikon kuluttua. Kerättyjä täysikasvuisia matoja voidaan käyttää testeihin ja munakoteloita voidaan käyttää uusien matojen kasvattamiseen.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) elää myös makean veden sedimenteissä kaikkialla maailmassa, ja sitä käytetään laajalti ympäristömyrkyllisyyden testauksessa. Tietoa tämän lajin biologiasta, kasvatusolosuhteista ja herkkyydestä on lähdeviitteissä (1) (6) (9) (36). *Lumbriculus variegatus* -matoja voidaan kasvattaa myös *T. tubifex* -madoille suositellussa keinosedimentissä lähdeviitteen (8) mukaisesti tietyin rajoituksin. Koska *L. variegatus* suosii luonnossa karkeampia sedimenttejä kuin *T. tubifex (59)*, *T. tubifexin* kasvattamisessa käytetyt laboratorioviljelmät, joissa on käytetty keinosedimenttiä, voidaan lakkauttaa 4–6 kuukauden kuluttua. Käytännön kokemus on osoittanut, että *L. variegatusta* voidaan pitää hiekkaisella alustalla (esimerkiksi kvartsihiekassa tai hienossa sorassa) läpivirtausjärjestelmässä, jossa käytetään kalanruokaa ravinnonlähteenä, useita vuosia alustaa uudistamatta. Muihin vedessä eläviin harvasukasmatolajeihin verrattuna *L. variegatuksella* on se etu, että se lisääntyy nopeasti, jolloin laboratoriossa kasvatettujen populaatioiden biomassa kasvaa nopeasti (1) (6) (9) (10).

Viljelymenetelmät

Lumbriculus variegatuksen kasvatusolosuhteet on kuvattu yksityiskohtaisesti julkaisussa Phipps ym. (1993) (10), Brunson ym. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Jäljempänä on lyhyt yhteenveto näistä olosuhteista.

Matoja voidaan kasvattaa suurissa akvaarioissa (57–80 l) 23 °C:ssa. Valojakson tulisi olla 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää (100–1 000 luksia), ja akvaarioissa tulisi käyttää päivittäin vaihtuvaa luonnollista vettä (45–50 l akvaariota kohti). Substraatti valmistetaan leikkaamalla valkaisemattomia ruskeita paperipyyhkeitä suikaleiksi, jotka laitetaan kasvatusveteen muutamaksi sekunniksi, jolloin muodostuu pieniä paloja paperisubstraattia. Sen jälkeen substraattia voi käyttää suoraan *Lumbriculus*-matojen kasvatusakvaariossa peittämällä niillä akvaarion pohja, tai niitä voidaan säilyttää jäädytettynä deionisoidussa vedessä myöhempää käyttöä varten. Uusi substraatti kestää säiliössä yleensä noin kaksi kuukautta.

Jokainen matoviljelmä aloitetaan 500–1 000 madolla, ja niitä ruokitaan kolmesti viikossa10 ml:n suspensiolla, joka sisältää 6 g lohien kasvatusravintoa, ajoittaisvaihtoisissa tai läpivirtausolosuhteissa. Staattisissa tai semistaattisissa viljelmissä eläimiä on ruokittava vähemmän bakteeri- ja sienikasvun estämiseksi. Ruoka ja paperisubstraatti on analysoitava biokertyvyystesteissä käytettävien aineiden suhteen.

Näissä olosuhteissa viljelmässä olevien yksilöiden määrä yleensä kaksinkertaistuu 10–14 päivässä.

Lumbriculus variegatus voidaan ottaa pois viljelmistä esimerkiksi siirtämällä substraatti tiheäsilmäisellä haavilla tai poimimalla yksilöt liekkikiillotetulla leveäsuisella (halkaisija noin 5 mm) lasipipetillä erilliseen laboratoriolasiin. Jos laboratoriolasiin siirretään myös substraattia, matoja ja substraattia sisältävää lasia pidetään yön yli läpivirtausolosuhteissa, jolloin substraatti poistuu lasista ja madot jäävät astian pohjalle. Ne voidaan siirtää sen jälkeen uusiin valmisteltuihin

▼M6

kasvatussäiliöihin tai käsitellä käytettäväksi testissä lähdeviitteissä (1) ja (6) esitetyn mukaisesti. Matojen vaurioituminen tai autotomia on estettävä esimerkiksi käyttämällä niiden käsittelyssä pipettejä, joiden reunat on liekkikiillotettu, tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja puikkoja.

Seikka, johon on syytä suhtautua kriittisesti käytettäessä *L. variegatusta* sedimentin biokertyvyystesteissä, on sen lisääntymistapa (jakaantuminen, jota seuraa regeneraatio). Tässä suvuttomassa lisääntymistavassa mato jakaantuu kahteen osaan, jotka eivät tarvitse ravintoa, ennen kuin pää- tai häntäosa on regeneroitunut (ks. (36) (37)). Näin ollen nielemisen kautta tapahtuvaa sedimentti- ja kontaminanttikertymistä ei tapahdu *L. variegatuksella* välttämättä jatkuvasti, kuten torvimadoilla, jotka eivät lisäänny jakaantumalla.

Sen vuoksi on huolehdittava synkronoinnista, jotta kontrolloimaton lisääntyminen ja regeneroituminen sekä testitulosten suuri vaihtelu voidaan minimoida. Vaihtelua voi nimittäin esiintyä, kun jotkin yksilöt, jotka ovat jakaantuneet eivätkä siksi tarvitse ravintoa tiettynä ajanjaksona, altistuvat testiaineelle vähemmän kuin muut yksilöt, jotka eivät jakaannu testin aikana (ks. (38)). Madot tulisi jakaa keinotekoisesti (synkronisointi) 10–14 päivää ennen altistumisen aloittamista (65). Tässä on käytettävä isoja matoja, joissa mieluiten ei ole merkkejä viimeaikaisesta jakaantumisesta. Nämä madot asetetaan lasilevylle pisaraan kasvatusvettä ja leikataan skalpellilla kahtia ruumiin keskiosasta. Huomiota on kiinnitettävä siihen, että takapäät ovat samankokoisia. Sen jälkeen takaosat jätetään regeneroitumaan (jolloin niihin kehittyy uudet päät) kasvatusastiaan, joka sisältää samaa substraattia kuin alkuperäisessä kasvatusastiassa ja synteettistä vettä, altistuksen aloittamiseen saakka. Merkki siitä, että uudet päät ovat kehittyneet, on se, kun synkronisoidut madot alkavat kaivautua substraattiin (regeneroitujen päiden muodostuminen voidaan vahvistaa tutkimalla edustava alanäyte binokulaarimikroskoopilla). Tämän jälkeen testiorganismien oletetaan olevan samanlaisessa fysiologisessa tilassa. Kun synkronisoiduissa madoissa esiintyy morfallaksin aiheuttamaa regeneraatiota testin aikana, käytännössä kaikkien eläinten odotetaan altistuvan yhtä paljon sedimentille, johon on lisätty testiainetta. Synkronisoitujen matojen ruokkiminen tulee aloittaa heti, kun madot alkavat kaivautua substraattiin tai seitsemän päivän kuluttua leikkauksesta. Ruokintaohjelma tulisi olla samankaltainen kuin tavallisissa viljelmissä, mutta synkronisoituja matoja voi olla hyvä ruokkia samalla ravinnolla, jota käytetään myös testissä. Madot tulisi pitää testilämpötilassa (20 ± 2 °C). Regeneroitumisen jälkeen testissä tulee käyttää vahingoittumattomia kokonaisia matoja, jotka ovat samankokoisia ja jotka uivat tai matelevat aktiivisesti kevyen mekaanisen ärsytyksen seurauksena. Matojen vaurioituminen tai autotomia on estettävä esimerkiksi käyttämällä niiden käsittelyssä pipettejä, joiden reunat on liekkikiillotettu, tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja puikkoja.

Kun testissä käytetään *Lumbriculus variegatusta*, matojen määrän tulisi lisääntyä testissä, jos olosuhteet ovat asianmukaiset, tämän lajin erityisen lisääntymistavan takia (6). Lisääntymisen puuttuminen *L. variegatuksella* tehtävässä biokertyvyystestissä on kirjattava muistiin ja otettava huomioon testituloksia tulkittaessa.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (ei validoitu rengastestissä)**

Branchiura sowerbyi elää monenlaisissa patoaltaiden, järvien, lampien ja jokien sedimenttityypeissä, ja se on peräisin trooppisilta alueilta. Tämän lajin matoja tavataan myös pohjoisen pallonpuoliskon lämpimissä vesistöissä. Niitä

▼M6

esiintyy kuitenkin enemmän mutaisissa ja savisissa sedimenteissä, joiden orgaanisen aineksen pitoisuus on suuri. Madot elävät myös sedimenttikerroksessa. Myös matojen takapäät yleensä kaivautuvat sedimenttiin. Tämä laji on helposti tunnistettavissa niiden takaosassa olevista helttamaisista filamenteista. Täysikasvuisten matojen pituus saattaa olla 9–11 cm ja märkäpaino 40–50 mg. Madot lisääntyvät vilkkaasti; niiden populaatio kaksinkertaistuu alle kahdessa viikossa, kun olosuhteet ovat jäljempänä kuvatun mukaiset (Aston ym., 1982 (65)). *B. sowerbyitä* on käytetty sekä myrkyllisyys- että biokertyvyystutkimuksissa (Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair ym. 1996 (67)).

Viljelymenetelmät

Yhteenveto *Branchiura sowerbyin* kasvatusmenetelmistä on esitetty jäljempänä (laatineet Mercedes R. Marchese, INALI, Argentiina, ja Carla J. Roghair, RIVM, Alankomaat).

Testiorganismien kasvattamisessa ei edellytetä mitään tiettyä kasvatustekniikkaa. Ne voidaan kasvattaa käyttämällä kontaminoitumatonta luonnollista sedimenttiä (31). Käytännön kokemus on osoittanut, että väliaine, joka sisältää luonnollista sedimenttiä ja hiekkaa, parantaa matojen terveyttä verrattuna puhtaaseen luonnolliseen sedimenttiin (32) (67). Kasvattamiseen voidaan käyttää kolmen litran laboratoriolaseja, jotka sisältävät 1 500 ml sedimentti-vesiväliainetta, joka puolestaan koostuu 375 ml:sta luonnollista kontaminoitumatonta sedimenttiä (orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus noin 10 prosenttia; noin 17 prosenttia hiukkasista kokoa $\leq$ 63 μm), 375 ml:sta puhdasta hiekkaa (M32) ja 750 ml:sta synteettistä tai dekloorattua vesijohtovettä (31) (32) (67). Myös paperipyyhkeitä voidaan käyttää kasvatuksessa substraattina, mutta silloin populaatio kasvaa vähemmän kuin luonnollisessa sedimentissä. Semistaattisissa järjestelmissä laboratoriolasin vesikerrosta ilmastetaan hitaasti, ja yläpuolinen vesi tulee vaihtaa viikoittain.

Jokainen lasi sisältää aluksi 25 nuorta matoa. Kahden kuukauden kuluttua isot madot poimitaan sedimentistä pinseteillä ja laitetaan uuteen lasiin, joka sisältää tuoretta sedimentti-vesiväliainetta. Vanhassa lasissa on myös munakoteloita ja nuoria matoja. Tällä tavalla on mahdollista kerätä jopa 400 nuorta matoa yhdestä lasista. Täysikasvuisia matoja käytetään lisääntymiseen vähintään kerran vuodessa.

Viljelmät on pidettävä 21–25 °C:n lämpötilassa, ja lämpötilan vaihtelu saa olla enintään ± 2 °C. Alkion kehittymiseen kuluva aika (munimisesta siihen saakka, kunnes nuori mato kuoriutuu munakotelosta) on noin kolme viikkoa, kun lämpötila on 25 °C. *B. sowerbyin* osalta on havaittu, että elossa pysyvän madon munantuotanto mudassa 25 °C:n lämpötilassa vaihtelee välillä 6,36 (31) – 11,2 (30). Munien määrä munakotelokohtaisesti vaihtelee välillä 1,8–2,8 (66) (69) tai enintään 8 (68).

Liuenneen hapen pitoisuus, veden kovuus, lämpötila ja pH on mitattava viikoittain. Kalanruokaa (esimerkiksiTetraMin®-valmistetta) voidaan lisätä suspensiona kaksi tai kolme kertaa viikossa ad libitum. Lisäksi matoja voidaan ruokkia sulatetulla lehtisalaatilla *ad libitum*.

Suurin etu tämän lajin käyttämisestä on suuri yksilöllinen biomassa (yksilön märkäpaino jopa 40–50 mg). Sen vuoksi tätä lajia voi käyttää radioleimaamattomien testiaineiden biokertyvyystesteissä. Se voidaan altistaa *T. tubifexille* tai *L. variegatukselle* käytetyissä järjestelmissä siten, että yhdessä näytteessä on yksi yksilö (11). Rinnakkaisnäytteiden määrää on kuitenkin lisättävä, ellei käytetä isompia testiastioita (11). Myös kaivautumiskäyttäytymiseen liittyvää validiteettikriteeriä on mukautettava tätä lajia varten.

▼**M6**

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Euroopan komissio (2003). Riskinarviointia koskeva tekninen ohjeasiakirja, jolla tuetaan uusien ilmoitettujen aineiden vaarojen arviointiperiaatteiden vahvistamisesta annettua komission direktiiviä 93/67/ETY, olemassa olevien aineiden vaarojen arviointiperiaatteiden vahvistamisesta annettua komission asetusta (EY) N:o 1488/94 sekä biosidituotteiden markkinoille saattamisesta annettua Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiiviä 98/8/EY, osa 1–IV. Euroopan unionin julkaisutoimisto, Luxemburg.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885–1894.

(5) Tämän liitteen luku C.13. Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(7) Tämän liitteen luku C.27 – Surviaissääskillä tehtävä myrkyllisyystesti, käyttäen vettä tai sedimenttiä, joihin on lisätty tutkittavaa ainetta.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835–852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872–885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269–279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on ”Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301–310.

▼M6

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim.

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709–1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443–1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Wat. Res. 24, 1225–1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501–514.

(20) OECD (2000). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.

(22) Tämän liitteen seuraavat luvut:

Luku A.4 Höyrynpaine

Luku A.5 Pintajännitys

Luku A.6 Vesiliukoisuus

Luku A.8 Jakaantumiskerroin (ravistuspullomenetelmä)

Luku A.25 Jakaantumiskerroin (HPLC-menetelmä)

Luku C.7 Hajoaminen – abioottinen hajoaminen: hydrolyysi pH:n funktiona

Luku C.4 A–F Biohajoavuuden määritys

Luku C.19 Maa-aineksiin ja viemärilietteeseen sovellettavan adsorptiokertoimen (K_{OC}) määritys korkean suorituskyvyn nestekromatografialla

Luku C.29 Biohajoavuus – CO_2 suljetuissa astioissa.

(23) OECD (1996). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No. 3. OECD, Paris.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165–172.

▼**M6**

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

(27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Wat. Res. 22, 701–707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191–201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061–1072.

(30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155–160.

(31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163–168.

(32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Tämän liitteen luku C.1 Akuutti myrkyllisyys kalalle.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181–184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183–194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196–2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503–1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111–124.

▼**M6**

(40) Tämän liitteen luku C.8 Myrkyllisyystutkimus madoilla.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588–595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175–184. Plenum Press, New York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391–94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32: 1897–1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244–1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431–1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099–1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911–917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, 411–421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

(56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163–1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310–386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785–790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47–67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69–78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137–145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, pp. 89–94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267–274.

▼M7

C.47. TOKSISUUSTESTI KALOILLA NIIDEN VARHAISKEHITYSVAIHEISSA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 210 (2013). Kalojen varhaiskehitysvaiheissa tehtävien testien avulla on tarkoitus määrittää kemikaalien letaalit ja subletaalit vaikutukset tietyn lajin tietyissä kehitysvaiheissa. Niistä saadaan arvokasta tietoa kemikaalista muille kalalajeille aiheutuvien kroonisten letaalien ja subletaalien vaikutusten estimointia varten.

2. Testiohje nro 210 perustuu Yhdistyneen kuningaskunnan ehdotukseen, josta keskusteltiin Medmenhamissa (Yhdistyneessä kuningaskunnassa) marraskuussa 1988 kokoontuneessa OECD:n asiantuntijakokouksessa. Testiohje on saatettu ajan tasalle vuonna 2013 testin käytöstä saadun kokemuksen ja syyskuussa 2010 järjestetyssä toksisuustestausta kaloilla käsittelevässä OECD:n seminaarissa annettujen suositusten (1) perusteella.

TESTIN PERIAATE

3. Varhaiskehitysvaiheissa olevia kaloja altistetaan veteen liuotetun testikemikaalin eri pitoisuuksille. Läpivirtausolosuhteita pidetään parhaimpina, mutta jos niiden järjestäminen ei ole mahdollista, semistaattiset olosuhteet voidaan hyväksyä. Tarkat ohjeet on syytä katsoa vaikeasti testattavien aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevasta ohjeasiakirjasta (2). Testi aloitetaan asettamalla hedelmöityneet mätimunat testiastioihin, ja sitä jatketaan lajikohtaisesti tarvittavan ajan, kunnes kontrollikalat saavuttavat nuoren kalan eli juveniilin elinvaiheen. Letaalit ja subletaalit vaikutukset arvioidaan ja niitä verrataan kontrolliarvioihin, jotta voidaan määrittää pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) ja sen avulla edelleen i) pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) ja/tai ii) EC_x (esimerkiksi EC_{10} ja EC_{20}) käyttämällä regressiomallia, jonka avulla estimoidaan x prosentin muutoksen mitattavassa vaikutuksessa aiheuttava pitoisuus. Vaikuttavien pitoisuuksien ja parametrien ilmoittaminen saattaa vaihdella sovellettavan lainsäädännön mukaan. Testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta EC_x saadaan interpoloimalla eikä ekstrapoloimalla (määritelmistä ks. lisäys 1).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

4. Testikemikaalilla tarkoitetaan testattavaa ainetta tai seosta. Testikemikaalin vesiliukoisuus (ks. tämän liitteen A.6 luku) ja höyrynpaine (ks. tämän liitteen A.4 luku) on oltava tiedossa, ja kemikaalin kvantifioimiseksi testiliuoksissa on oltava käytettävissä luotettava analyysimenetelmä, jonka oikeellisuus on tiedossa ja raportoitu, ja määritysrajan oltava saatavissa. Vaikka akuuttia toksisuutta koskevan testin (ks. tämän liitteen C.1 tai C.49 luku) tekeminen ei ole välttämätöntä, testin tekeminen mieluiten tähän testiin valitulla lajilla saattaa antaa hyödyllistä tietoa.

5. Jos testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen, seoksen koostumus on luonnehdittava mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallinen koostumuksen, esiintymistiheyden ja (muun muassa edellä mainittujen) ainekohtaisten erityisominaisuuksien avulla. Ennen kuin testimenetelmää käytetään lainsäädännössä edellytettyyn seosten testaukseen, on harkittava, antaako se hyväksyttävät tulokset lainsäädännön tavoitteen kannalta.

6. Hyödyllisiä tietoja ovat muun muassa rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilius vedessä ja valossa, pK_a, P_{OW} ja nopean biohajoavuuden testin tulokset (ks. tämän liitteen C.4 tai C.29 luku).

▼M7

TESTIN VALIDITEETTI

7. Testi on luotettava (validi), jos seuraavat edellytykset täyttyvät:

— Liuenneen hapen pitoisuus on > 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko altistusjakson ajan.

— Veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,5 °C testiastioiden välillä tai peräkkäisinä päivinä milloin tahansa testin aikana ja on niissä rajoissa, jotka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäys 2).

— Testattavien pitoisuuksien mittaaminen on pakollista.

— Hedelmöityneiden mätimunien ja kuoriutuneiden poikasten eloonjäämisaste kontrolleissa ja tapauksen mukaan liuotinkontrolleissa on vähintään yhtä suuri kuin lisäyksessä 2 on määritelty.

8. Jos validiteettikriteereistä havaitaan vähäinen poikkeama, sen vaikutuksia testitietojen luotettavuuteen on harkittava ja harkinnan tulokset sisällytettävä raporttiin. Vaikutukset eloonjäämiseen, kuoriutumiseen tai kasvuun liuotinkontrollissa verrattuna negatiiviseen kontrolliin on ilmoitettava ja niistä on keskusteltava testitietojen luotettavuuden kannalta.

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

9. Mitä tahansa lasista, ruostumattomasta teräksestä tai muusta kemiallisesti inertistä materiaalista valmistettua astiaa voi käyttää. Koska silikonin tiedetään pystyvän voimakkaasti absorboimaan lipofiilisiä aineita, silikoniputkia on käytettävä läpivirtaustutkimuksissa mahdollisimman vähän, samoin kuin silikonitiivisteitä kosketuksissa veden kanssa, käyttämällä esimerkiksi yhtenäisrakenteista lasiakvaariota. Astioiden on oltava riittävän suuria, jotta kunnon kasvu kontrollissa on mahdollinen, liuenneen hapen riittävä pitoisuus voidaan pitää yllä (esim. pienillä kalalajeilla tämä saavutetaan käyttämällä 7 litran tankkia) ja 19 kohdassa annettuja mätimäärää koskevia kriteerejä voidaan noudattaa. Suositellaan, että testiastiat sijoitetaan testialueelle satunnaistetusti. Satunnaistettu lohkoasetelma siten, että kussakin käsittelyssä olevia testiastioita on kussakin lohkossa, on parempi kuin täysin satunnaistettu järjestely. Testiastiat on suojattava ei-toivotuilta häiriöiltä. Testijärjestelmää on suotavaa sopeuttaa testikemikaalin pitoisuuksilla riittävän kauan, jotta voidaan osoittaa vakaat altistuspitoisuudet ennen testieliöiden lisäämistä.

Lajin valinta

10. Suositeltavat kalalajit luetellaan taulukossa 1. Muitakin lajeja saa käyttää, mutta testimenetelmää on mahdollisesti mukautettava, jotta testiolosuhteet ovat sopivat. Tällaisessa tapauksessa on selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen.

Siitoskalojen kasvatus

11. Siitoskannan kasvatuksesta tyydyttävissä oloissa annetaan yksityiskohtaiset ohjeet lisäyksessä 3 ja mainituissa viitteissä (3) (4) ja (5).

Hedelmöityneiden mätimunien, alkioiden ja toukkien käsittely

12. Aluksi hedelmöityneiden mätimunien, alkioiden ja toukkien altistus voidaan tehdä ison astian sisällä olevissa pienemmissä lasista tai ruostumattomasta

▼M7

teräksestä valmistetuissa astioissa, joiden laidoissa tai päädyissä on verkot, jolloin testiliuos pääsee virtaamaan astian läpi. Pienten astioiden läpi voidaan johtaa pyörteetön virtaus ripustamalla astiat varteen, jota voidaan nostaa ja laskea astiassa siten, että eliöt ovat nestepinnan alla koko ajan. Hedelmöityneitä lohensukuisten kalojen mätimunia voidaan pitää telineissä tai verkoissa, joiden reiät ovat niin suuret, että toukat putoavat niistä läpi kuoriuduttuaan.

13. Jos mätimunien pitämiseksi isossa testiastiassa käytetään telineitä, ritilöitä tai verkkoja, ne on poistettava toukkien kuoriutumisen jälkeen lisäyksessä 3 annettujen ohjeiden mukaisesti. Verkot pitää kuitenkin säilyttää toukkien karkaamisen estämiseksi. Jos toukkia on siirrettävä, niitä ei saa ottaa vedestä ilmaan eikä verkkoja saa käyttää toukkien irrottamiseksi mätimunatelineistä. Siirtoajankohta vaihtelee lajeittain, ja se on kirjattava raporttiin. Siirto ei kuitenkaan ehkä ole aina tarpeen.

Vesi

14. Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji selviytyy ja kasvaa riittävän pitkän ajan (ks. lisäys 4). Veden laadun on oltava vakio koko testin ajan. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa kemikaalia) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, näytteitä on otettava säännöllisin väliajoin määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), ammoniakki, jäännösklooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava esimerkiksi puolivuosittain, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun tiedetään vaihtelevan, mittaukset on tehtävä useammin; mittaustiheys riippuu vaihtelun määrästä. Lisäyksessä 4 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden ominaisuuksia.

Testiliuokset

15. Läpivirtaustesteissä on käytettävä testikemikaalin varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, ja virtausnopeus saa vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Virtausnopeus, joka on vähintään viisi kertaa testiastian tilavuus 24 tunnissa, on havaittu sopivaksi (3). Jos 19 kohdassa määritettyä mätimäärää noudatetaan, on mahdollista käyttää alhaisempaa virtausnopeutta, esim. kaksi tai kolme kertaa testiastian tilavuus, jotta ravinnon nopea poistuminen voidaan estää.

16. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuos valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittamista ja/tai ultraääntä). Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) tai passiivisia annostelumenetelmiä (6) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimen käyttöä kantoaineena ei suositella. Jos liuotin on kuitenkin tarpeen, rinnalla on käytettävä liuotinkontrollia, ja liuotinpitoisuuden on oltava sama kuin kemikaalilla käsittelyissä. Toisin sanoen liuotintason on mielellään oltava sama kaikilla pitoisuuksilla ja liuotinkontrollissa. Joissakin laimenninjärjestelmissä tämä saattaa olla teknisesti vaikeaa; tällöin liuotinkontrollin liuotinpitoisuuden on vastattava käsittelyryhmän korkeinta liuotinpitoisuutta. Vaikeasti testattavia aineita koskevat ohjeet on syytä katsoa vaikeasti testattavien aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevasta OECD:n ohjeasiakirjasta nro 23 (2). Jos liuotinta käytetään, liuotin

▼M7

valitaan aineen kemiallisten ominaisuuksien perusteella. OECD:n ohjeasiakirjassa nro 23 enimmäispitoisuudeksi suositellaan 100 µl/l. Liuotinpitoisuus on suositeltavaa pitää mahdollisimman alhaisena, jotta vältetään liuottimen mahdollinen vaikutus mitattuihin ominaisuuksiin (7).

17. Semistaattisessa testissä voidaan käyttää kahta eri liuoksenvaihtomenetelmää: joko uudet testiliuokset valmistellaan puhtaisiin astioihin ja eloonjääneet mätimunat ja toukat siirretään varovasti uusiin astioihin tai testieliöt pidetään testiastioissa samalla, kun osa (vähintään kaksi kolmasosaa) testiliuoksesta/kontrollimäärästä vaihdetaan.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Kesto

18. Testi on aloitettava mahdollisimman pian sen jälkeen, kun mätimunat ovat hedelmöityneet, ja ne on mielellään upotettava testiliuokseen, ennen kuin sukusolujen jakautuminen alkaa, tai mahdollisimman lähellä tätä vaihetta. Testin kesto riippuu käytettävästä lajista. Lisäyksessä 2 annetaan joitakin suosituksia testin kestosta.

Täyttö

19. Testin alussa hedelmöityneiden mätimunien määrän on oltava riittävä tilastollista käsittelyä varten. Ne on jaettava satunnaisesti käsittelyryhmiin, ja kutakin pitoisuutta kohden on käytettävä vähintään 80 mätimunaa, jotka on jaettava tasan vähintään neljään rinnakkaiseen testiastiaan. Mätimäärän (biomassa testiliuoksen tilavuusyksikköä kohti) on oltava niin pieni, että liuenneen hapen pitoisuus voidaan muna- ja toukkavaiheen ajan pitää vähintään 60 prosentissa ilman kyllästysarvosta ilman ilmastusta. Suositusten mukaan mätimäärän tuorepaino saa läpivirtaustesteissä olla enintään 0,5 g/l per 24 tuntia ja enintään 5 g/l liuosta minä tahansa ajankohtana (3).

Valo ja lämpötila

20. Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan on oltava sopivia käytetylle testilajille (ks. lisäys 2).

Ruokinta

21. Ravinto ja ruokinta ovat kriittisiä, ja on olennaisen tärkeää, että kussakin elinvaiheessa annetaan oikeaa ravintoa oikeaan aikaan ja riittävästi normaalin kasvun turvaamiseen. Ruokinnan on oltava suunnilleen sama rinnakkaisissa astioissa, ellei sitä mukauteta kuolleisuuden huomioon ottamiseksi. Jätteen kertymisen välttämiseksi ylimääräinen rehu ja ulosteet on tarvittaessa poistettava. Yksityiskohtaiset ruokintajärjestelmät on esitetty lisäyksessä 3, mutta ravinto- ja ruokintajärjestelmiä kehitetään jatkuvasti kokemuksen karttuessa, jotta eloonjääminen ja kasvu voidaan optimoida. Elävä ravinto lisää ympäristön virikkeellisyyttä, joten sitä on käytettävä kuiva- tai pakasteravinnon sijasta tai lisäksi aina, kun se on lajin ja elinvaiheen kannalta asianmukaista.

Testipitoisuudet

22. Tavallisesti tarvitaan viisi testikemikaalin pitoisuutta, joiden välinen ero on vakio ja enintään 3,2-kertainen, ja vähintään neljä rinnakkaisastiaa pitoisuutta kohden. Kun valitaan testipitoisuuksien vaihteluvälit, on otettava huomioon akuuteista testeistä mielellään samoilla lajeilla ja/tai pitoisuusalueen määritystestistä mahdollisesti saadut tiedot (1). Testipitoisuuksien vaihteluvälin valinnassa on kuitenkin otettava huomioon kaikki mahdolliset tietolähteet, kuten päättelyarviot kalojen alkioilla tehdyistä akuuttia toksisuutta koskevista testeistä. Raja-annostesti tai jatkettu raja-annostesti, jossa on lopullisessa testissä

▼M7

alle viisi pitoisuutta, voidaan hyväksyä, jos on vahvistettava vain empiirinen NOEC-arvo. Vähemmän kuin viiden pitoisuuden käyttö on perusteltava. Testikemikaalin pitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 96 tunnin LC_{50}, tai 10 mg/l (näistä alhaisempi arvo), ei tarvitse testata.

Kontrollit

23. Testikemikaalin pitoisuussarjan lisäksi on määritettävä laimennusvesikontrolli ja tarvittaessa pelkkää kantoaineena käytettävää liuotinta sisältävä liuotinkontrolli (ks. 16 kohta).

Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus

24. Ennen altistusjakson aloittamista on varmistettava, että kemikaalin annostelujärjestelmä toimii asianmukaisesti kaikissa rinnakkaisastioissa (esimerkiksi mittaamalla testipitoisuudet). Tarvittavat analyysimenetelmät on määritettävä, myös asianmukainen kvantifiointiraja (LOQ), ja aineen stabiiliudesta testijärjestelmässä on oltava riittävästi tietoa. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin altistumisen luonnehtimiseksi. Vähintään viisi määritystä tarvitaan. Läpivirtausjärjestelmissä testikemikaali on vähintään kerran viikossa mitattava yhdessä rinnakkaisnäytteessä pitoisuutta kohti, siten että mitattavaa rinnakkaisnäytettä vaihdetaan järjestelmällisesti. Analyyttiset lisämääritykset parantavat usein testituloksen laatua. Näytteet on ehkä suodatettava hiukkasten poistamiseksi (käyttämällä esim. 0,45 μm:n huokoskokoa) tai sentrifugoitava sen varmistamiseksi, että kemikaalin määritys tehdään aidosta liuoksesta. Suodattimet on kyllästettävä ennen käyttöä testikemikaalin adsorption vähentämiseksi. Jos mitatut pitoisuudet eivät pysy 80–120 prosentissa nimellispitoisuudesta, vaikuttavat pitoisuudet on määritettävä ja ilmaistava suhteessa läpivirtaustestien aritmeettiseen keskipitoisuuteen (ks. aritmeettisen keskiarvon laskenta, testimenetelmän C.20 lisäyksessä 6 (8)) ja suhteessa semistaattisten testien mitattujen pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon (ks. vaikeasti testattavien aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevan OECD:n ohjeasiakirjan luku 5 (2)).

25. Testin aikana liuennut happi, pH ja lämpötila on mitattava kaikissa testiasioissa vähintään viikoittain ja suolapitoisuus ja kovuus tarvittaessa testin alussa ja lopussa. Lämpötilaa on mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

Havainnot

26. **Alkiokehitysvaihe**: Testikemikaalille altistuksen alussa alkiokehitysvaihe on varmistettava mahdollisimman tarkasti. Siinä voidaan käyttää sopivasti säilytettyä ja puhdistettua edustavaa näytettä mätimunista.

27. **Kuoriutuminen ja eloonjääminen**: Kuoriutumisesta ja eloonjäämisestä on tehtävä havaintoja vähintään kerran päivässä, ja yksilöiden lukumäärät on kirjattava. Jos mätimunissa havaitaan sieniä alkiokehityksen varhaisvaiheessa (eli testin ensimmäisenä tai toisena päivänä), sellaiset mätimunat on laskettava ja poistettava. Kuolleet alkiot, toukat ja juveniilit on poistettava heti, kun ne havaitaan, koska ne voivat hajota nopeasti ja muut kalat saattavat rikkoa ne. Kuolleita yksilöitä poistettaessa on oltava erittäin varovainen, ettei vieressä olevia mätimunia tai toukkia vahingoiteta fyysisesti. Kuolemantapaukset todetaan eri kehitysvaiheissa ja eri lajeilla eri tavoin. Esimerkiksi

▼M7

— hedelmöityneet mätimunat: erityisesti varhaisvaiheissa läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkymättömyys

— alkiot, toukat ja juveniilit: koe-eläimet eivät liiku ja/tai niiden hengitysliikkeet puuttuvat ja/tai sydän ei lyö ja/tai ne eivät reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin.

28. **Epänormaali ulkonäkö**: Sellaisten toukkien tai juveniilien lukumäärä, joiden ruumiinmuodossa havaitaan epänormaaliutta, on kirjattava määräajoin testin kestosta ja kuvatun epänormaaliuden laadun mukaan. On huomattava, että epänormaaleja toukkia ja juveniileja esiintyy luonnollisesti, ja niiden määrä voi joillakin lajeilla olla useita prosentteja kontroll(e)issa. Jos epämuodostumia ja niihin liittyvää epänormaalia käytöstä pidetään niin vakavana, että eliö kärsii huomattavasti ja se on saavuttanut pisteen, jossa toipuminen ei ole mahdollista, eliö voidaan poistaa testistä. Tällaiset eläimet on lopetettava ja lisättävä kuolleisuuslukuihin myöhemmin tehtävässä analyysissa. Useimmilla lajeilla, joita on suositeltu käytettäväksi tässä testimenetelmässä, on rekisteröity normaalia alkiokehitystä (9) (10) (11) (12).

29. **Epänormaali käyttäytyminen**: Epänormaali käyttäytyminen, esimerkiksi hyperventilaatio, koordinoimaton uinti, epätyypillinen liikkumattomuus ja epätyypillinen syömiskäyttäytyminen, on kirjattava sopivin väliajoin testin aikana (esim. kerran päivässä lämpimän veden lajeilla). Vaikka tällaisia vaikutuksia on vaikea kvantifioida, niiden havainnoiminen voi auttaa kuolleisuusdatan tulkinnassa.

30. **Paino**: Kaikki eloonjääneet kalat punnitaan testin lopuksi vähintään rinnakkaisastiakohtaisesti (ilmoitetaan astiassa olevien eläinten lukumäärä ja keskipaino eläintä kohden). Tuorepainoa (eläimet kuivataan pinnalta) pidetään parempana, mutta myös kuivapainotiedot saa ilmoittaa (13).

31. **Pituus**: Testin lopussa mitataan yksilöiden pituus. Kokonaispituus on suositeltava, mutta jos pyrstöevä tai muut evät ovat syöpyneet, voidaan käyttää vakiopituutta. Kussakin testissä on käytettävä samaa menetelmää kaikkiin kaloihin. Yksilön pituus voidaan mitata käyttämällä esimerkiksi työntömittaa, digitaalista kameraa tai kalibroitua okulaarimikrometriä. Tyypilliset vähimmäispituudet on määritelty lisäyksessä 2.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

32. On suositeltavaa, että kokeen suunnittelu ja tilastollisen testin valinta mahdollistavat riittävän voiman (vähintään 80 prosenttia) havaita biologisesti merkittävät muutokset tutkittavissa ominaisuuksissa, jos on ilmoitettava NOEC. Vaikuttavien pitoisuuksien ja parametrien ilmoittaminen saattaa vaihdella sovellettavan lainsäädännön mukaan. Jos on ilmoitettava EC_x, koe on suunniteltava ja regressiomenetelmä valittava siten, että EC_x:n estimoinnissa i) EC_x:lle ilmoitettu 95 prosentin luottamusväli ei sisällä nollaa eikä ole liian suuri, ii) ennakoidulle keski-EC_x:lle ilmoitettu 95 prosentin luottamusväli ei sisällä kontrollikeskiarvoa ja iii) regresssiomalli ei ole merkitsevästi yhteensopimaton tietojen kanssa. Kumpikin menetelmä edellyttää, että jokaisessa tutkittavassa ominaisuudessa, joka on tärkeä havaita tai estimoida, todetaan prosentuaalinen muutos. Koesuunnitelma on mukautettava siten, että se on mahdollista. Jos edellä mainitut EC_x:n määrittämistä koskevat edellytykset eivät täyty, on käytettävä NOEC-menetelmää. Ei ole todennäköistä, että sama

▼M7

prosentuaalinen muutos koskisi kaikkia tutkittavia ominaisuuksia. Ei ole myöskään todennäköistä, että voitaisiin suunnitella toteutuskelpoinen testi, joka täyttäisi nämä kriteerit kaikkien tutkittavien ominaisuuksien osalta, joten on tärkeää keskittyä niihin ominaisuuksiin, jotka ovat kussakin testissä tärkeitä, jotta se voidaan suunnitella asianmukaisesti. Lisäyksissä 5 ja 6 on annettu tilastollisia vuokaavioita ja ohjeita kutakin menetelmää varten. Niissä annetaan ohjeita tietojen käsittelyyn ja asianmukaisimman tilastollisen testin tai mallin käytön valintaan. Muitakin tilastomenetelmiä saa käyttää, jos ne ovat tieteellisesti perusteltavissa.

33. Variaatiot on analysoitava kussakin rinnakkaisnäytesarjassa varianssianalyysillä tai kontingenssitaulukkomenetelmillä, ja analyysiin perustuvia asianmukaisia tilastollisia analyysimenetelmiä on käytettävä. Jos halutaan tehdä yhteisvertailu yksittäisten pitoisuuksien ja kontrollien välillä, jatkuvaa vastetta varten suositellaan Jonckheere-Terpstran tai Williamsin vertailutestiä ja sellaisia dikotomisia vasteita varten Cochran-Armitagen vertailutestiä, jotka ovat yhdenmukaisia monotonisen pitoisuus-vastesuhteen kanssa eikä ole näyttöä ylihajonnasta (14). Jos ylihajonnasta on näyttöä, suositellaan käytettäväksi Cochran-Armitagen testin Rao-Scott-muunnosta (15) (16) tai Williamsin tai Dunnettin testiä (arcussinimuunnoksen jälkeen) tai Jonckheere-Terpstran testiä rinnakkaisosuuksiin. Jos tiedot eivät ole yhdenmukaisia monotonisen pitoisuus-vastesuhteen kanssa, Dunnettin tai Dunnin tai Mann-Whitneyn menetelmät saattavat olla hyödyllisiä jatkuvissa vasteissa ja Fisherin tarkka testi dikotomisissa vasteissa (14) (17) (18). Kaikkien tilastomenetelmien tai -mallien käytössä on huolellisesti varmistettava, että kyseisen menetelmän tai mallin edellytykset täyttyvät (esim. astiakohtainen vaihtelu estimoidaan ja otetaan huomioon kokeen suunnittelussa ja testin tai mallin käytössä). Tietojen normaalius on arvioitava, ja lisäyksessä 5 ilmoitetaan, mitä ANOVAn jäännöksille on tehtävä. Lisäyksessä 6 käsitellään tarkemmin regressiomenetelmään liittyviä näkökohtia. Tilastollisen testin edellytysten täyttämiseksi on harkittava muunnoksia. Regressiomallin sovittamisen edellyttämät muunnokset vaativat kuitenkin suurta huolellisuutta, sillä esimerkiksi 25 prosentin muutos muuntelemattomassa vasteessa ei vastaa 25 prosentin muutosta muunnetussa vasteessa. Kaikissa analyyseissa analysoitava yksikkö ja koeyksikkö on testiastia, ei yksittäinen kala, joten sekä hypoteesitestien että regression on vastattava sitä (3) (14) (19) (20).

Testiraportti

34. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

Yhdestä ainesosasta koostuvat aineet:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS nimi, CAS numero, SMILES tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot siltä osin, kuin se on tarpeen ja käytännössä mahdollista, jne. (tarvittaessa myös orgaanisen hiilen pitoisuus)

Useista aineosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esim. kemialliset tunnistetiedot (kuten edellä), määrällinen esiintyminen ja ainesosien fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta, lähde ja hedelmöityneiden mätimunien keruumenetelmä ja jatkokäsittely

▼**M7**

Testiolosuhteet:

— testauksessa käytetty menetelmä (esim. semistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, täyttötapa)

— valoisa aika (valoisat aikajaksot)

— testisuunnitelman kuvaus (esim. testiastioiden määrä, rinnakkaisnäytteiden määrä, mätimunien määrä rinnakkaisnäytettä kohden, testiastioiden materiaali ja koko (korkeus, leveys, tilavuus), vesimäärä testiastiaa kohden)

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtojen väli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)

— testikemikaalin annostelumenetelmä (esim. pumput, laimennusjärjestelmät)

— menetelmän saantoteho ja nimelliset testipitoisuudet, kvantifiointiraja, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuutta aidossa liuoksessa

— laimennusveden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä (jos se on mitattu), suspensiossa olevat kiinteät aineet (jos ne on mitattu), testiväliaineen suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja mahdolliset muut mittaukset

— testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. rehu(je)n tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotaajuus)

Yksittäin (tai rinnakkaisnäyteperusteella) ja tarvittaessa keskiarvoina ja variaatiokertoimina ilmoitetut seuraavia tutkittavia ominaisuuksia koskevat tulokset:

— näyttö siitä, että kontrollit täyttävät yleiset testilajin elinkyvyn hyväksyttävyyttä koskevat vaatimukset (lisäys 2)

— kuolleisuustiedot kussakin vaiheessa (alkio, toukka ja juveniili) ja kertyvä kuolleisuus

— päivää kuoriutumiseen, kuoriutuneiden toukkien lukumäärä kunakin päivänä ja kuoriutumisen päättyminen

— terveiden kalojen lukumäärä testin lopussa

— eloonjääneiden eläinten pituus (on ilmoitettava, onko kyseessä vakio- vai kokonaispituus) ja paino

— mahdollisten epämuodostumien ilmaantuvuus, kuvaus ja lukumäärä

— mahdollisten käyttäytymismuutosten ilmaantuvuus, kuvaus ja lukumäärä

— tilastollinen analyysimenetelmä (regressio- tai varianssianalyysi) ja tietojenkäsittelymenetelmä (käytetty tilastollinen testi tai malli)

— pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia kullekin arvioidulle vasteelle (NOEC)

▼M7

— pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (p = 0,05) kullekin arvioidulle vasteelle (LOEC)

— tarvittaessa EC_x kullekin arvioidulle vasteelle ja luottamusvälit (esim. 90 tai 95 prosenttia) sekä kaavio sen laskentaan käytetystä sovitetusta mallista, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuus, regressiomallin kaava, estimoidut mallimuuttujat ja niiden vakiovirheet.

Kaikki poikkeamat testimenetelmästä

Tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin

Taulukko 1

Kalalajit, joita suositellaan käytettäväksi testissä

MAKEAN VEDEN KALAT	SUISTO- JA MERIKALAT
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	*Cyprinodon variegatus* Loistohammaskarppi
Pimephales promelas Rasvapäämutu	*Menidia* sp. Hopeakylki
Danio rerio Seeprakala	
Oryzias latipes Medaka	

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Pariisi.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD, Pariisi.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88, 26 s.

(4) Brauhn, J. L. ja Schoettger, R. A. (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W. A. ja Jones, B. R. (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici ja muut (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593–599.

(7) Hutchinson, T. H. ja muut (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69–92.

(8) Tässä liitteessä oleva C.20 luku. Lisääntymistesti vesikirpulla (*Daphnia magna*).

(9) Hansen, D. J. ja Parrish, P. R. (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (toim. Mayer, F. L. ja Hamelink, J. L.), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B. ja muut (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. ja muut (2005), A quick reference guide to the normal development of Oryzias latipes (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E. W. ja muut (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.

(13) Oris, J. T, Belanger, S. C. ja Bailer, A. J. (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370–376.

(14) OECD (2006), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariisi.

(15) Rao, J. N. K. ja Scott, A. J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577–585.

(16) Rao, J. N. K. ja Scott, A. J. (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373–1385.

(17) Dunnett, C. W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096–1121.

(18) Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

(19) Rand, G. M. ja Petrocelli, S. R. (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J. T., Sullivan, J. H. ja Pearson, J. G. (1980), Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

EC_x (*Effect concentration for x % effect*): Pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC_{50} on pitoisuus, jolla estimoidaan olevan 50 prosentin vaikutus testissä tutkittavaan ominaisuuteen altistuksen kohteeksi joutuneessa populaatiossa määritellyn altistusajan kuluessa.

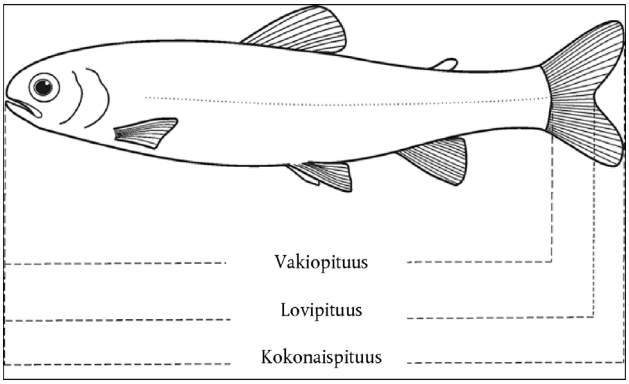
IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*): Kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto.

Kemikaali: Aine tai seos.

Kokonaispituus: Pituus kuonon kärjestä pyrstöevän pitemmän lohkon kärkeen; mitataan yleensä siten, että lohkot on puristettu keskilinjaa vasten. Kyseessä on suoran viivan mittaus, ruumiin kaarevuutta ei oteta mukaan. (www.fishbase.org)

Kuva 1

Kuvaus käytetyistä pituuksista.



LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalin havaitaan aiheuttavan tilastollisesti merkitsevän vaikutuksen ($p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu. Lisäyksissä 5 ja 6 annetaan ohjeita.

Lovipituus: Pituus kuonon kärjestä pyrstöevän keskimmäisten ruotojen päähän. Sitä käytetään kaloilla, joilla on vaikea määrittää selkärangan päättymiskohtaa. (www.fishbase.org)

NOEC (*No Observed Effect Concentration*): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$).

SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*): SMILES-järjestelmä. Yksinkertaistettu kemikaalien esitysmuoto.

Testikemikaali tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

UVCB (*Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials*): Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Vakiopituus: Kalan pituus mitattuna kuonon kärjestä viimeisen nikaman takareunaan tai pyrstönikamien keskiosan takareunaan. Yksinkertaistettuna tässä mittauksessa pyrstöevän pituus jää pois. (www.fishbase.org)

▼M7

Lisäys 2

TESTIOLOSUHTEET, TESTIN KESTO JA ELOONJÄÄMISKRITEERIT SUOSITELLUILLE LAJEILLE

LAJI	TESTAUSOLOSUHTEET			TESTIN SUOSITELTAVA KESTO	Kontrollikalojen kokonaispituuden tyypillinen vähimmäiskeskiarvo tutkimuksen lopussa (mm) ([1])	KONTROLLIEN ELOONJÄÄNEISYYS (vähintään)	
	Lämpötila (°C)	Suolapitoisuus ($^0/_{00}$)	Valoisa aika (t)			Kuoriutuneisuus	Kuoriutumisen jälkeinen eloonjääneisyys
Makea vesi:							
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	10 ± 1,5 ([2])		12–16 ([3])	kahden viikon kuluttua siitä, kun kontrollit hakevat itse ruokansa (tai 60 vrk kuoriutumisen jälkeen)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Rasvapäämutu	25 ±1,5		16	32 vrk testin alusta (tai 28 vrk kuoriutumisesta)	18	70 %	75 %
Danio rerio Seeprakala	26 ±1,5		12–16 ([4])	30 vrk kuoriutumisesta	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Medaka	25 ±2		12–16 ([5])	30 vrk kuoriutumisesta	17	80 %	80 %
Suisto- ja merikalalajit:							
Cyprinodon variegatus Loistohammaskarppi	25 ± 1,5	15–35 ([5])	12–16 ([4])	32 vrk testin alusta (tai 28 vrk kuoriutumisesta)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Hopeakylki	22–25	15–35 ([5])	13	28 vrk	20	80 %	60 %

Selitykset:

([1]) Tyypillinen kokonaispituuden vähimmäiskeskiarvo ei ole validiteettikriteeri, mutta ilmoitetun arvon alapuolella olevat poikkeamat on huolellisesti tutkittava testin herkkyyden kannalta. Kokonaispituuden vähimmäiskeskiarvo on johdettu nykyhetkellä käytettävissä olevien tietojen valikoimasta.

([2]) Testattava kirjolohikanta saattaa edellyttää muiden lämpötilojen käyttöä. Siitoskanta on pidettävä samassa lämpötilassa kuin mätimunat. Lyhyt totutus testilämpötilaan on välttämätön sen jälkeen, kun mätimunat on saatu kaupalliselta kasvattajalta (esim. 1–2 t).

([3]) Toukat on pidettävä pimeässä yhden viikon ajan kuoriutumisen jälkeen lukuun ottamatta aikoja, jolloin niitä tarkastellaan. Sen jälkeen käytetään koko testin ajan heikkoa valaistusta (valoisa aika 12–16 tuntia) ([4]).

([4]) Valaistusolojen on oltava kaikissa testausolosuhteissa vakaita.

([5]) Kaikissa testeissä ± 2 $^0/_{00}$.

▼M7

Lisäys 3

SUOSITUSLAJIEN SIITOS- JA TESTIELÄINTEN RUOKINTA- JA KÄSITTELYOHJEET

LAJIT	RAVINTO (*)				KUORIUTUMISEN JÄLKEINEN SIIRTOAIKA	AIKA ENSIMMÄISEEN RUOKINTAAN
	Siitoskalat	Vastakuoriutuneet toukat	Juveniilit			
			Tyyppi	Tiheys		
Makea vesi:						
Oncorhynchus mykiss Kirjolohi	Kirjolohen rehu	Ei mitään (α)	Kirjolohen aloitusrehu BSN	2–4 ruokintaa päivässä	14–16 päivää kuoriutumisen jälkeen tai kun ne alkavat uida (ei olennaista)	19 päivää kuoriutumisen jälkeen tai kun ne alkavat uida
Pimephales promelas Rasvapäämutu	BSN, hiutalerehu, FBS	BSN	BSN48, hiutalerehu	2–3 kertaa päivässä	Sen jälkeen, kun kuoriutuneisuus on 90 %	2 vrk kuoriutumisesta
Danio rerio Seeprakala	BSN, hiutalerehu	Kaupallinen toukkarehu, alkueläimiä (β), proteiinia (γ)	BSN48, hiutalerehu	BSN kerran päivässä: hiutalerehu kahdesti päivässä	Sen jälkeen, kun kuoriutuneisuus on 90 %	2 vrk kuoriutumisesta
Oryzias latipes Medaka	hiutalerehu	BSN, hiutalerehu (tai alkueläimiä tai rataseläimiä)	BSN48, hiutalerehu (tai rataseläimiä)	BSN kerran päivässä, hiutalerehu kahdesti päivässä tai hiutalerehu ja rataseläimiä kerran päivässä	ei sovelleta	6–7 vrk kudusta
Suisto- ja merikalalajit:						
Cyprinodon variegatus Loistohammaskarppi	BSN, hiutalerehu FBS	BSN	BSN48	2-3 ruokintaa päivässä	ei sovelleta	1 päivää kuoriutumisen jälkeen tai kun ne alkavat uida
Menidia sp. Hopeakylki	BSN48, hiutalerehu	BSN	BSN48	2-3 ruokintaa päivässä	ei sovelleta	1 päivää kuoriutumisen jälkeen tai kun ne alkavat uida

Selitykset:

(*) Ravintoa on annettava niin paljon, että eläimet ovat kylläisiä. Jätteen kertymisen välttämiseksi ylimääräinen rehu ja ulosteet on tarvittaessa poistettava.

FBS pakastetut suolalehtijalkaiset; aikuiset Artemia sp

BSN suolalehtijalkaisten naplius-toukat; vasta kuoriutuneet

BSN48 suolalehtijalkaisten nauplius-toukat; 48 tunnin ikäiset

(α) Ruskuaispussivaiheen toukat eivät tarvitse ravintoa.

(β) Suodatettu sekaviljelmästä.

(γ) Rakeita käymisprosessista.

02008R0440 — FI — 16.10.2019 — 008.001 — 2448

▼M7

Lisäys 4

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Ainesosa	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	1 µg/10
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
Alumiini	1 µg/1
Arseeni	1 µg/1
Kromi	1 µg/1
Koboltti	1 µg/1
Kupari	1 µg/1
Rauta	1 µg/1
Lyijy	1 µg/1
Nikkeli	1 µg/1
Sinkki	1 µg/1
Kadmium	100 ng/l
Elohopea	100 ng/l
Hopea	100 ng/l

▼M7

Lisäys 5

TILASTOLLISIA OHJEITA NOEC-MÄÄRITYKSEEN

Yleistä

Analyysiyksikkö on rinnakkaistankki. Siten jatkuvissa mittauksissa, kuten koon mittauksessa, on laskettava rinnakkaisnäytteen keskiarvo tai mediaani, ja analyysissa käytetään näitä rinnakkaisarvoja. Testien voima on osoitettava mielellään jokaisen laboratorion aiempia riittäviä tuloksia koskevan tietokannan avulla. Käytettävässä tilastollisessa testissä on jokaista tutkittavaa ominaisuutta varten annettava vaikutuksen suuruus, joka voidaan havaita 75–80 prosentin voimalla.

Tämän testausmenetelmän kehittämisajankohtana käytettävissä olevissa tietokannoissa ilmoitetaan mahdollinen voima suositeltavissa tilastomenetelmissä. Yksittäisen laboratorion on osoitettava kykynsä täyttää voimaa koskeva vaatimus joko tekemällä oma voima-analyysi tai osoittamalla, että kunkin vasteen variaatiokerroin ei ylitä testiohjeen laadinnassa käytettyjen variaatiokertoimien 90. prosenttipistettä. Kyseiset variaatiokertoimet esitetään taulukossa 1. Jos käytettävissä ovat ainoastaan rinnakkaisnäytteiden keskiarvot tai mediaanit, rinnakkaisnäytteiden sisäiset variaatiokertoimet voidaan jättää huomiotta.

Taulukko 1

Valikoitujen makean veden lajien 90. prosenttipisteen variaatiokertoimet

Laji	Vaste	Rinnakkaisnäytteiden välinen variaatiokerroin	Rinnakkaisnäytteiden sisäinen variaatiokerroin
Kirjolohi	Pituus	17,4	9,8
	Paino	10,1	28
Rasvapäämutu	Pituus	16,9	13,5
	Paino	11,7	38,7
Seeprakala	Pituus	43,7	11,7
	Paino	11,9	32,8

Lähes kaikissa laboratorioiden toksisuustutkimusten arvioinnissa käytettävissä tilastollisissa testeissä kiinnostuksen kohteena on vertailla käsittelyryhmiä kontrolleihin. Tästä syystä ei ole asianmukaista vaatia merkitsevää ANOVA-F-testiä, ennen kuin käytetään Dunnettin tai Williamsin testiä, taikka merkitsevää Kruskal-Wallisin testiä, ennen kuin käytetään Jonckheere-Terpstran, Mann-Whitneyn tai Dunnin testiä (Hochberg ja Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson ja muut 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnettin testiin on etukäteen määritetty kerrannaisuuskorjaus, jolloin sen väärien positiivisten ja väärien negatiivisten tulosten osuuksiin vaikuttaa haitallisesti F-testin käyttäminen portinvartijana. Vastaavasti Williamsin ja Jonckheere-Terpstran vertailutesteissä, joissa käytetään 0,05:n merkitsevyystasoa jokaisessa vaiheessa, väärien positiivisten tulosten kokonaisosuus pysyy 5 prosentissa, mihin, samoin kuin testien voimaan, vaikuttaa haitallisesti F-testin tai Kruskal-Wallisin testin käyttäminen portinvartijana. Mann-Whitneyn ja Dunnin testejä on korjattava kerrannaisuuden osalta, ja siihen suositellaan Bonferroni-Holmin korjausta.

OECD:n julkaisussa (2006) käsitellään hypoteesitestausta ja testien perustana olevien olettamusten todentamista koskevia suosituksia yksityiskohtaisesti, ja siinä on myös laaja kirjallisuusluettelo.

▼M7

Kontrollien käsittely liuottimen yhteydessä

Jos käytetään liuotinta, testiin on otettava sekä laimennusvesikontrolli että liuotinkontrolli. Näitä kahta kontrollia on verrattava jokaisen vasteen osalta, ja tulokset on yhdistettävä tilastollista analyysia varten, ellei kontrollien välillä ole merkitsevää eroa. Muutoin NOEC:n määritykseen tai EC_x:n estimointiin on käytettävä liuotinkontrollia, eikä vesikontrollia käytetä. Ks. rajoitus validiteettikriteereissä (7 kohta).

T-testiä tai Mann-Whitneyn testiä on käytettävä vertaamaan laimennusvesikontrollia ja liuotinkontrollia pituuden, painon, kuoriutuneisuuden, toukkakuolleisuuden tai epänormaalien toukkien osuuden sekä kuoriutumisen ensimmäisen ja viimeisen päivän tai uimaan lähdön osalta 0,05:n merkitsevyystasolla ottamatta käsittelyryhmiä huomioon. Näiden testien tulokset on raportoitava.

Kokomittaukset (pituus ja paino)

Yksittäisten kalojen pituus- ja painoarvot voivat olla normaali- tai log-normaalijakaumalla. Kummassakin tapauksessa rinnakkaisnäytteiden keskiarvot ovat yleensä normaalijakaumalla keskeisen raja-arvolauseen nojalla, mikä on vahvistettu runsaasti yli 100 ELS-tutkimuksessa kolmella makean veden lajilla. Vaihtoehtoisesti, jos tiedot tai aiemmat tietokannat viittaavat yksittäisten kalojen kokoarvojen log-normaalijakaumaan, voidaan laskea yksittäisten kalojen arvojen rinnakkaisnäytteiden logaritminen keskiarvo, minkä jälkeen analyysitietoja voidaan käyttää rinnakkaisnäytteiden logaritmisen keskiarvon anti-logina.

Tietojen yhdenmukaisuus normaalijakauman ja varianssien homogeenisuuden kanssa on arvioitava. Tätä varten on käytettävä ANOVA-mallin jäännöksiä siten, että pitoisuudet ovat ainoa selittävä luokkamuuttuja. Visuaalista määritystä hajontakaavioiden ja pylväsdiagrammien tai lehti-ruoti-kuvioiden avulla voidaan käyttää. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää virallista testiä, kuten Shapiro-Wilkin tai Anderson-Darlingin testiä. Yhdenmukaisuus varianssien homogeenisuuden kanssa voidaan arvioida samasta hajontakaaviosta visuaalisesti tai virallisesti Levenen testillä. Vain parametritesteissä (kuten Williams, Dunnett) on arvioitava normaalius tai varianssien homogeenisuus.

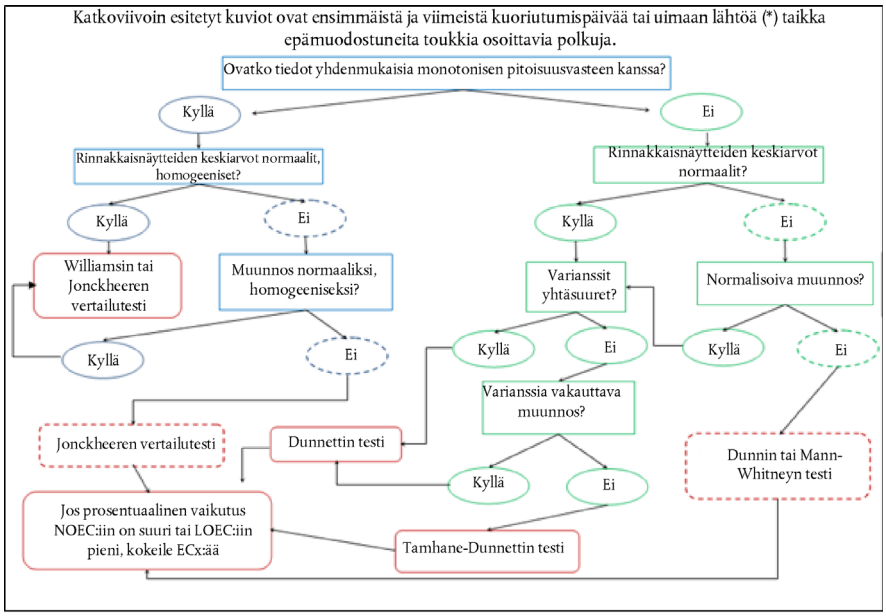
Mahdollisiin poikkeaviin havaintoarvoihin ja niiden vaikutukseen analyysissa on kiinnitettävä huomiota. Tukeyn poikkeavien havaintoarvojen testiä ja samojen edellä kuvattujen jäännöskaavioiden visuaalista tarkastelua voidaan käyttää. On muistettava, että havainnot koskevat kokonaisia rinnakkaisnäytteitä, joten poikkeavan havaintoarvon pois jättäminen analyysistä on tehtävä vasta huolellisen harkinnan jälkeen.

Tilastolliset testit, joissa hyödynnetään testijärjestelyn ominaispiirteitä ja biologisia odotuksia, ovat alaspäin askeltavia trenditestejä, kuten Williams ja Jonckheere-Terpstra. Testeissä on oletuksena monotoninen pitoisuus-vaste, ja on arvioitava, ovatko tiedot yhdenmukaisia tämän olettaman kanssa. Se voidaan tehdä visuaalisesti rinnakkaisnäytteiden keskiarvojen hajontakaaviosta verrattuna testipitoisuuteen. On avuksi asettaa hajontakaavion päälle paloittain lineaarinen kaavio, jossa yhdistetään rinnakkaisnäytteen näytekoolla painotetut pitoisuuden keskiarvot. Jos paloittainen lineaarinen kaavio poikkeaa suuresti monotonisuudesta, on ehkä tarpeen käyttää muita kuin trenditestejä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää virallisia testejä. Yksinkertainen virallinen testi on laskea pitoisuuskeskiarvojen lineaariset ja kvadraattiset kontrastit. Jos kvadraattinen kontrasti on merkitsevä ja lineaarinen kontrasti ei, se on merkki mahdollisesta monotonisuusongelmasta, jota on arvioitava kaavioista tarkemmin. Jos normaalius tai varianssien homogeenisuus voi olla ongelma, kontrastit voidaan konstruoida sijatunnusmuunnetuista tiedoista. Vaihtoehtoisia menettelyjä, kuten Bartholomewin monotonisuustestiä, voidaan käyttää, mutta ne lisäävät kompleksisuutta.

▼M7

Kuva 2

NOEC-vuokaavio koon mittauksista (pituus ja paino).



(*) Nämä vasteet eivät koskaan vastaa parametrianalyysin tai -mallin oletuksia.

Paitsi jos tiedot eivät ole yhdenmukaisia näitä testejä koskevien vaatimusten kanssa, NOEC määritetään soveltamalla alaspäin askeltavia Williamsin tai Jonckheere-Terpstran testejä. OECD:n julkaisussa (2006) annetaan näistä menettelyistä yksityiskohtaiset tiedot. Jos tiedot eivät ole yhdenmukaisia alaspäin askeltavien testien vaatimusten kanssa, voidaan käyttää Dunnettin testiä tai Tamhane-Dunnettin testiä (T3), joissa kummassakin on etukäteen määritetyt kerrannaisuuskorjaukset. Näissä testeissä oletuksena on normaalius ja Dunnettin tapauksessa varianssien homogeenisuus. Jos kyseiset edellytykset eivät täyty, voidaan käyttää Dunnin parametritonta testiä. OECD:n julkaisussa (2006) on yksityiskohtaiset tiedot kaikista näistä testeistä. Kuvassa 2 on yleiskatsaus testin valintaan.

Mätimunien kuoriutuminen ja toukkien eloonjääminen

Tiedot koskevat kuoriutuvien mätimunien tai eloonjäävien toukkien osuuksia yksittäisissä rinnakkaisnäytteissä. Osuuksista on arvioitava ylihajonta, joka on tavallista muttei vallitsevaa tällaisissa mittauksissa. Kuvan 3 vuokaaviossa on ohjeita testin valintaan; yksityiskohtaiset kuvaukset on annettu tekstissä.

Kahta testiä käytetään yleisesti. Ne ovat Taronen C(α)-testi (Tarone 1979) ja Khin neliö -testi, joita kumpaakin sovelletaan erikseen jokaiseen testipitoisuuteen. Jos ylihajontaa löydetään yhdessäkin testipitoisuudessa, on käytettävä menetelmiä, joissa se voidaan ottaa huomioon.

Kaava 1

Taronen C(α)-testi (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

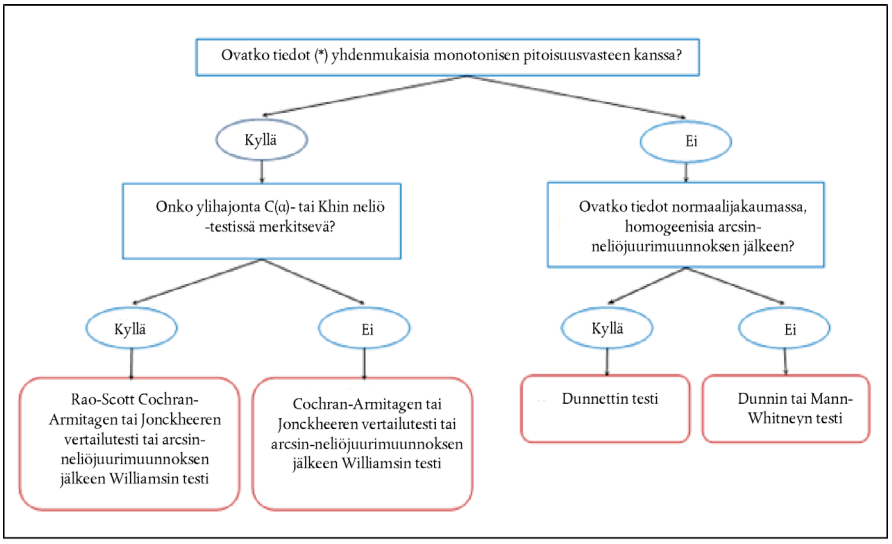
jossa $\hat{p}$ on tietyn pitoisuuden keskimääräinen osuus, **m** on rinnakkaistankkien lukumäärä, $\mathbf{n_j}$ on kohteiden lukumäärä rinnakkaisnäytteessä **j**, ja $\mathbf{x_j}$ on kyseisessä

▼M7

rinnakkaisnäytteessä vasteen antavien eli esim. kuoriutumattomien tai kuolleiden kohteiden lukumäärä. Testiä sovelletaan kuhunkin pitoisuuteen erikseen. Testiä voidaan pitää Khin neliö -testin sovelluksena, mutta rajoitetulla voimalla Taronella tehdyt simulaatiot ovat osoittaneet, että se on tehokkaampi kuin Khin neliö -testi.

Kuva 3

NOEC-vuokaavio. Mätimunien kuoriutuminen ja toukkakuolleisuus.



(*) Tiedot koskevat rinnakkaisnäytteiden osuuksia.

Jos ylihajonnasta ei ole merkitsevää näyttöä, voidaan käyttää Cochran-Armitagen vertailutestiä. Tässä testissä rinnakkaisnäytteitä ei oteta huomioon, joten jos ylihajonnasta on näyttöä, suositellaan Cochran-Armitagen testin Rao-Scott-korjausta (RSCA), jossa rinnakkaisnäytteet, rinnakkaisnäytekoot ja ylihajonta otetaan huomioon. Vaihtoehtoisia testejä ovat muun muassa Williamsin ja Jonckheere-Terpstran vertailutestit ja Dunnettin testi, kuten edellä on kuvattu koon mittauksissa. Näitä testejä sovelletaan ylihajonnasta riippumatta, mutta niiden voima on hieman alhaisempi (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao ja Scott 1992, 1999, Fung ja muut 1994, 1996).

Ensimmäinen tai viimeinen kuoriutumispäivä tai uimaan lähtö

Vaste on kokonaisluku, joka ilmoittaa testipäivän, jona mainitut havainnot on tehty tietyssä rinnakkaistankissa. Arvojen vaihteluväli on yleensä hyvin rajoitettu, ja toisiinsa sidottujen arvojen osuus on usein hyvin suuri. Esimerkiksi sama ensimmäinen kuoriutumispäivä havaitaan kaikissa rinnakkaiskontrolleissa ja ehkä yhdessä tai kahdessa alhaisen testipitoisuuden näytteessä. Parametritestitestit, kuten Williams ja Dunnett, eivät sovellu tällaisten tietojen käsittelyyn. Jonckheere-Terpstran vertailutestillä havaitaan erittäin tehokkaasti testikemikaalin vaikutukset, ellei ole näyttöä vakavasta monotonisuuden puutteesta. Muussa tapauksessa voidaan käyttää Dunnin testiä.

Toukkien epämuodostumat

Vaste on jollain lailla epänormaaleiksi todettujen toukkien lukumäärä. Vaste on usein hyvin alhainen, ja siihen liittyy joitakin samoja ongelmia kuin ensimmäiseen kuoriutumispäivään, ja toisinaan pitoisuusvaste on epäsäännöllinen. Jos tiedot ainakin pääpiirteittäin noudattavat monotonista pitoisuusmuotoa, testikemikaalin vaikutukset havaitaan erittäin tehokkaasti Jonckheere-Terpstran vertailutestillä. Muussa tapauksessa voidaan käyttää Dunnin testiä.

▼**M7**

VIITTEET

Agresti, A. (2002), Categorical Data Analysis, 2. laitos, Wiley, Hoboken.

Dunnett, C. W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of American Statistical Association, 50, 1096–1121.

Dunn, O. J. (1964), Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241–252.

Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482–491.

Fung, K. Y., Krewski, D., Rao, J. N. K., Scott, A. J. (1994), Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639–648.

Fung, K. Y, Krewski, D., Smythe, R. T. (1996), A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431–454.

Hochberg, Y. ja Tamhane, A. C. (1987), Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J. C. (1996), Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere, A. R. (1954), A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B. J. T. (1992), Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, Lontoo.

OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Pariisi.

Rao, J. N. K. ja Scott, A. J. (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577–585.

Rao, J. N. K. ja Scott, A. J. (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373–1385.

Robertson, T., Wright, F. T. ja Dykstra, R. L. (1988), Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R. E. (1979), Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585–590.

Williams, D. A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103–117.

Williams, D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519–531.

Williams, D. A. (1975), The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949–952.

Williams, D. A. (1977), Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9–14.

▼M7

Lisäys 6

REGRESSIOESTIMAATTEJA KOSKEVIA TILASTOLLISIA OHJEITA

Yleistä

Mallin sovittamiseen käytettäviä havaintoja ovat rinnakkaisnäytteiden keskiarvot (pituus ja paino) tai rinnakkaisnäytteiden suhteelliset osuudet (mätimunien kuoriutuminen ja toukkakuolleisuus) (OECD 2006).

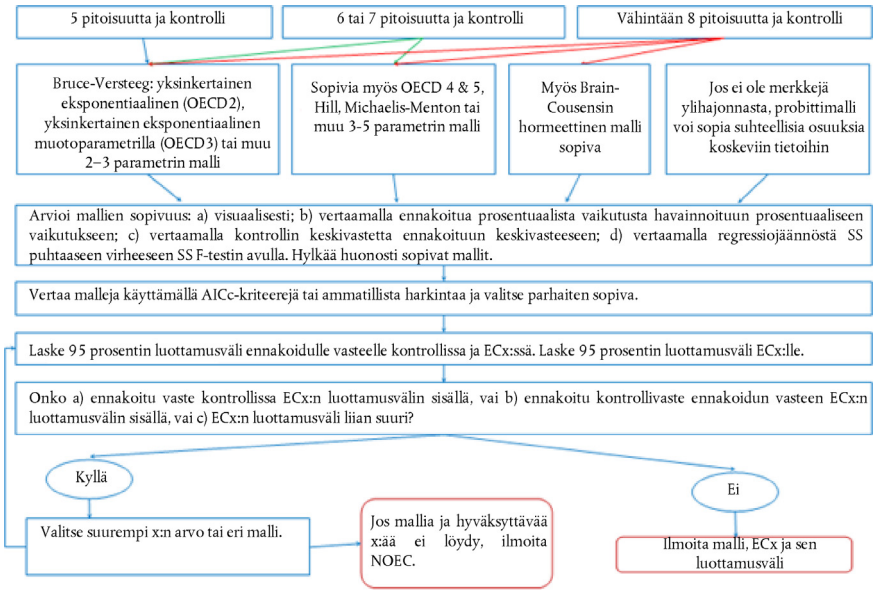
Yleisesti suositellaan painotettua regressiota, jossa painona käytetään rinnakkaisnäytteen näytekokoa. Muut painotusjärjestelmät ovat mahdollisia, kuten painotus ennakoidulla keskivasteella tai sen ja rinnakkaisnäytteen näytekoon yhdistelmällä. Painotusta saman pitoisuuden sisäisen näytteen varianssin käänteisluvulla ei suositella (Bunke ja muut 1999, Seber ja Wild 2003, Motulsky ja Christopoulos 2004, Huet ja muut 2003).

Jos vasteita muunnetaan ennen analyysia, on säilytettävä havaintojen riippumattomuus, ja ECx ja sen luottamusrajat on ilmaistava alkuperäisinä mittayksiköinä eikä muunnettuina yksiköinä. Esimerkiksi 20 prosentin muutos pituuden logaritmissa ei vastaa 20 prosentin muutosta pituudessa (Lyles ja muut 2008, Draper ja Smith 1999).

Kuvan 4 kaaviossa esitetään yleiskatsaus ECx-estimaatteihin. Yksityiskohdat esitetään jäljempänä.

Kuva 4

Vuokaavio – rinnakkaisnäytteiden keskipituuden tai -painon taikka mätimunien kuoriutumisosuuden tai toukkakuolleisuuden EC_x-estimointi, ks. tarkemmin jäljempänä.



Mätimunien kuoriutumista ja toukkakuolleisuutta koskevia näkökohtia

Mätimunien kuoriutumiseen ja toukkakuolleisuuteen on yleensä paras sovittaa alenevaa mallia, ellei soviteta jäljempänä kuvattua probittimallia. On toisin sanoen mallinnettava kuoriutumatta jääneiden mätimunien tai kuolevien toukkien osuutta. Tämä johtuu siitä, että EC_x viittaa pitoisuuteen, jossa muutos on x prosenttia kontrollin keskivasteesta. Jos kontrollimunista 5 prosenttia jää kuoriutumatta ja mallinnetaan kuoriutumatta jäämistä, EC_{20} viittaa pitoisuuteen, jossa muutos on 20 prosenttia kontrollien 5 prosentin kuoriutumatta jäämisestä, jolloin muutos on 0,2 × 0,05 = 0,01. Toisin sanoen kuoriutumatta jääneitä on 1 prosenttiyksikköä eli 6 prosenttia. Näin pientä muutosta ei voida mielekkäästi estimoida käytettävissä olevista tiedoista eikä se ole biologisesti merkitsevä. Jos sen

▼M7

sijaan mallinnetaan niiden mätimunien osuutta, jotka kuoriutuvat, kontrolliosuus on tässä esimerkissä 95 prosenttia, ja 20 prosentin vähennys kontrollin keskiarvosta vastaa muutosta 0,95 × 0,2 = 0,18, joten 95 prosentin kuoriutumismenestys muuttuu 77 prosentiksi (= 95 – 18). Tällöin pitoisuuden vaikutus voidaan estimoida, joten menetelmällä on oletettavasti enemmän arvoa. Kokomittauksissa tämä ei ole ongelma, vaikka haitalliset vaikutukset kokoon tarkoittavat yleensä koon pienenemistä.

Kokoa (pituutta tai painoa) ja mätimunien kuoriutumismenestystä tai toukkien eloonjääntiä koskevat mallit

Kaikki mallit on kuvattu ja niitä suositellaan OECD:n julkaisussa (2006), Brain-Cousensin hormeettista mallia lukuun ottamatta. Niin sanottuja OECD 2–5 -malleja käsitellään ekotoksisuustestien yhteydessä myös Slobin teoksessa (2002). Mahdollisesti hyödyllisiä malleja on luonnollisesti muitakin. Teoksessa Bunke ja muut (1999) luetellaan useita malleja, joita ei käsitellä tässä, ja muita malleja koskevia viitteitä on runsaasti. Jäljempänä ehdotettuja malleja pidetään erityisen hyvin sopivina ekotoksisuustesteihin, ja niitä käytetään laajalti.

5 testipitoisuutta ja kontrolli

— Bruce-Versteeg

— Yksinkertainen eksponentiaalinen (OECD 2)

— Eksponentiaalinen muotoparametrilla (OECD 3)

— Yksinkertainen eksponentiaalinen alarajalla (OECD 4)

Vähintään 6 testipitoisuutta ja kontrolli

— Eksponentiaalinen muotoparametrilla ja alarajalla (OECD 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Jos hormeesista on visuaalista näyttöä (epätodennäköistä mätimunien onnistuneen kuoriutumisen tai toukkien eloonjäännin yhteydessä, mutta kokohavainnoissa sitä havaitaan toisinaan)

— Brain-Cousens hormeettinen; (Brain ja Cousens 1989)

Mätimunien kuoriutumisen epäonnistumista ja toukkakuolleisuutta koskevia vaihtoehtoisia malleja

— Näitä vasteita koskevat ylenevät mallit voidaan sovittaa probitti- (tai logistisilla) malleilla, ellei ylihajonnasta ole näyttöä ja kontrolli-ilmaantuvuus estimoidaan sovitetussa mallissa. Tämä ei ole parhaana pidetty menetelmä, koska siinä analyysiyksikkönä pidetään yksilöä, ei rinnakkaisnäytettä (Morgan 1992, O'Hara Hines ja Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Yhden ainoan mallin sopivuus

— Verrataan havaittua ja ennakoitua prosentuaalista pienenemistä visuaalisesti kussakin testipitoisuudessa (Motulsky ja Christopoulos 2004, Draper ja Smith 1999).

— Verrataan regressiokeskineliövirhettä puhtaaseen keskineliövirheeseen käyttämällä F-testiä (Draper ja Smith 1999).

— Tarkistetaan, että mallin jokainen tekijä poikkeaa merkitsevästi nollasta (ts. on määritettävä, ovatko mallin kaikki tekijät merkittäviä) (Motulsky ja Christopoulos 2004).

▼M7

— Regressiojäännöskaaviot v. testipitoisuus, mahdollisesti log(pitoisuus)-asteikolla. Kaaviolla ei pitäisi olla kaavaa; pisteiden on oltava satunnaisesti siroteltuna vaakasuoran viivan ympärille nollan korkeudella.

— Tietojen normaalius ja varianssien homogeenisuus on arvioitava lisäyksessä 5 esitetyllä tavalla.

— Arvioidaan lisäksi regressiomallin jäännösten normaalius käyttämällä samoja menetelmiä kuin lisäyksessä 5 esitetään ANOVA-jäännöksille.

Mallien vertailu

— Käytetään Akiaken korjattua informaatiokriteeriä (AICc). Pienet AICc-arvot ovat merkki hyvästä sopivuudesta, ja jos AICc(B) – AICc(A) ≥ 10, malli A on lähes varmasti parempi kuin malli B (Motulsky ja Christopoulos (2004).

— Verrataan kahta mallia visuaalisesti, jotta nähdään, kuinka hyvin ne täyttävät edellä annetut yhtä ainoaa mallia koskevat kriteerit.

— Parsimoniaperiaate on suositeltava; sen mukaan käytetään yksinkertaisinta mallia, joka soveltuu tietoihin kohtuullisen hyvin (Ratkowsky 1993, Lyles ja muut 2008).

EC_x-estimaatin laatu

EC_x:n luottamusväli ei saa olla liian suuri. Tilastollista harkintaa tarvitaan sen ratkaisemiseen, kuinka suuri luottamusväli voi olla, jotta EC_x on edelleen hyödyllinen. Mätimunien kuoriutumis- ja kokotietoihin sovitetuilla regressiomalleilla tehdyt simulaatiot osoittavat, että EC_x:n (x = 10, 20 tai 30) 75 prosentin luottamusväli ulottuu enintään kahteen testipitoisuuteen. Näin saadaan yleisohje siitä, mikä on hyväksyttävää, ja käytännön ohje siitä, mikä on saavutettavissa. Lukuisat kirjoittajat vahvistavat tarpeen ilmoittaa kaikkien parametrien luottamusvälit ja sen, että malliparametrien suuret luottamusvälit ovat merkki malleista, joita ei voida hyväksyä (Ott ja Longnecker 2008, Alvord ja Rossio 1993, Motulsky ja Christopoulos 2004, Lyles ja muut 2008, Seber ja Wild 2003, Bunke ja muut 1999, Environment Canada 2005).

EC_x:n (tai minkään muun malliparametrin) luottamusväli ei saa sisältää nollaa (Motulsky ja Christopoulos (2004). Tämä on pienintä merkitsevää eroa vastaava regressio, joka mainitaan usein hypoteesitestausmenetelmissä (esim. Wang ja muut 2000). Se vastaa myös keskiarvovasteita LOEC-arvossa, joka ei sisällä kontrollikeskiarvoa. Parametriestimaattien tieteellistä uskottavuutta on pohdittava. Jos esim. y0:n luottamusväli on ± 20 prosenttia, mikään EC_{10}-estimaatti ei ole uskottava. Jos mallissa ennakoidaan 20 prosentin vaikutus pitoisuudella C ja C:n ja sitä pienemmillä pitoisuuksilla havaittu maksimivaikutus on 10 prosenttia, EC_{20} ei ole uskottava (Motulsky ja Christopoulos 2004, Wang ja muut 2000, Environment Canada 2005).

EC_x:n määrittäminen ei saa edellyttää ekstrapolointia positiivisten pitoisuuksien vaihteluvälin ulkopuolella (Draper ja Smith 1999, OECD 2006). Yleisohjeena voidaan esimerkiksi pitää, että EC_x on enintään 25 prosenttia pienimmän testatun pitoisuuden alapuolella tai suurimman testatun pitoisuuden yläpuolella.

VIITTEET

Alvord, W. G., Rossio, J. L. (1993), Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155–163.

Brain, P. ja Cousens, R. (1989), An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93–96.

▼**M7**

Bunke, O., Droge, B. ja Polzehl, J. (1999), Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197–240.

Collett, D. (2002), Modelling Binary Data, 2. laitos, Chapman and Hall, Lontoo.

Collett, D. (2003), Modelling Survival Data in Medical Research, 2. laitos, Chapman and Hall, Lontoo.

Draper, N. R. ja Smith, H. (1999), Applied Regression Analysis, 3. laitos. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005), Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46.

Huet, S., Bouvier, A., Poursat, M.-A., Jolivet, E. (2003), Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M. ja Cooper, C. R. (2008), Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*, marraskuu 2008, 29(6): 878–886.

Morgan, B. J. T. (1992), Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, Lontoo.

Motulsky, H., Christopoulos, A. (2004), Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. ja Lawless, J. F. (1993), Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* nide 49, s. 107–121.

OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Pariisi.

Ott, R. L., Longnecker, M. T. (2008), An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, 6. laitos, Brooks-Cole, Belmont, CA.

Ratkowsky, D. A. (1993), Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195–199.

Seber, G. A. F., Wild, C. J. (2003), Nonlinear Regression, Wiley.

Slob W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298–312.

Wang, Q., Denton, D. L. ja Shukla, R. (2000), Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, nide 19, s. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. KALOJEN LYHYTAIKAINEN LISÄÄNTYMISTUTKIMUS

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 229 (2012). Oli tarpeen kehittää ja validoida kalatutkimus, jolla pystytään havaitsemaan hormonitoimintaan vaikuttavia kemikaaleja, koska kemikaalien ympäristöpitoisuuksista saattaa aiheutua haittavaikutuksia sekä ihmisille että eläimille kemikaalien ja hormonijärjestelmän välisen vuorovaikutuksen vuoksi. Vuonna 1998 OECD aloitti ensisijaisena toimenpiteenä olemassa olevien ohjeiden uudistamisen ja uusien ohjeiden laatimisen mahdollisten hormonitoimintaa häiritsevien aineiden seulontaa ja testausta varten. Yksi toimenpiteen osa oli laatia testiohjeet kalojen hormonijärjestelmään vaikuttavien kemikaalien seulontaan. Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus on hyväksytty laaja-alaisessa validointiohjelmassa. Siihen sisältyi laboratorioiden välisiä tutkimuksia tietyillä kemikaaleilla, ja tutkimusten tavoitteena oli osoittaa määritysmenetelmän tarkkuus ja luotettavuus sellaisten kemikaalien havaitsemisessa, jotka vaikuttavat kalojen lisääntymiseen eri mekanismeilla, mukaan luettuina hormonijärjestelmään kohdistuvat vaikutustavat (1, 2, 3, 4, 5). Kaikki OECD:n testiohjeessa mainitut tutkittavat ominaisuudet on validoitu rasvapäämudulla, ja osa ominaisuuksista on validoitu medakalla (ts. vitellogeniini ja sekundaariset sukupuoliominaisuudet) ja seeprakalalla (vitellogeniini). Validoinnin vertaisarvioi osittain asiantuntijaryhmä, jonka nimittivät testiohjeohjelman kansalliset koordinaattorit (6), ja riippumaton asiantuntijaryhmä Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston toimeksiannosta (29). Määritysmenetelmää ei ole tarkoitettu erityisesti hormonitoimintaa häiritsevien mekanismien tunnistamiseen, sillä koe-eläimillä on ehjä hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli (HPG-akseli). Se saattaa reagoida kemikaaleihin, jotka vaikuttavat HPG-akseliin eri pitoisuuksilla.

2. Tässä testimenetelmässä kuvataan *in vivo* -seulontamenetelmä, jossa sukukypsiä koiraskaloja ja kutevia naaraskaloja pidetään yhdessä ja altistetaan kemikaalille tietyn ajan niiden elinkaaresta (21 päivää). Kahdenkymmenenyhden päivän pituisen altistusjakson lopussa koirailta ja naarailta mitataan kaksi biomarkkeriominaisuutta, joita pidetään indikaattoreina testikemikaalin hormonijärjestelmään kohdistuvasta vaikutuksesta; mitattavat ominaisuudet ovat vitellogeniini ja sekundaariset sukupuoliominaisuudet. Vitellogeniini mitataan rasvapäämudulta, medakalta ja seeprakalalta, kun taas sekundaariset sukupuoliominaisuudet mitataan rasvapäämudulta ja medakalta. Lisäksi määrällistä hedelmällisyyttä seurataan päivittäin koko testin ajan. Myös sukurauhaset säilytetään, ja histopatologia voidaan arvioida testieläinten lisääntymiskunnon arvioimiseksi ja muiden tutkittavien ominaisuuksien todistusarvon lisäämiseksi.

3. Tämä biotesti on lisääntymiskyvyn *in vivo* -seulontatesti ja sen soveltamista on tarkasteltava osana hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevaa OECD:n käsitekehystä (*OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) (30). Tässä käsitekehyksessä kalojen lyhytaikaista lisääntymistutkimusta ehdotetaan tasolla 3 in vivo -tutkimuksena, joka antaa tietoa valikoiduista hormonijärjestelmän mekanismeista/reiteistä.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

4. Munimalla lisääntyvien selkärankaisten naaraiden maksa tuottaa yleensä vitellogeniinia (VTG) verenkierrossa olevan endogeenisen estrogeenin avulla. Se on munankeltuaisen proteiinien esiaste, ja kun maksa on tuottanut sitä, se kulkeutuu verenkierrossa munasarjoihin, joissa kehittyvät munasolut ottavat sen sisäänsä ja muokkaavat sitä. Epäkypsien naaras- ja koiraskalojen plasmassa vitellogeniinia on lähes mahdoton havaita, koska niillä ei ole riittävästi estrogeenia verenkierrossaan. Maksa voi kuitenkin syntetisoida ja erittää vitellogeniinia eksogeenisen estrogeenistimulaation avulla.

▼M7

5. Vitellogeniinin mittauksella voidaan havaita kemikaaleja, joilla on erilaisia estrogeeniin liittyviä vaikutustapoja. Estrogeeniin vaikuttavien kemikaalien havaitseminen on mahdollista mittaamalla vitellogeniinin kehittymistä koiraskaloissa, ja sitä on dokumentoitu runsaasti tieteellisessä vertaisarvioidussa kirjallisuudessa (esimerkiksi (7)). Vitellogeniinin kehittymistä on osoitettu myös aromatisoituville androgeeneille altistumisen jälkeen (8, 9). Naaraskalojen verenkierron estrogeenipitoisuus pienentyy esimerkiksi, kun aromataasia estetään muuntamasta endogeenista androgeenia luonnolliseksi estrogeeniksi, 17β-estradioliksi. Tällöin myös vitellogeniinitaso laskee, ja tätä käytetään aromataasia estäviä ominaisuuksia sisältävien kemikaalien havaitsemiseen (10, 11). Estrogeenin/aromataasin estämisen aiheuttaman vitellogeniinivasteen biologinen merkityksellisyys on osoitettu, ja se on dokumentoitu laajalti. On kuitenkin mahdollista, että vitellogeniinin tuotantoon naarailla voivat vaikuttaa myös yleinen toksisuus ja muuhun kuin hormonijärjestelmään kohdistuvat myrkylliset vaikutustavat (esimerkiksi hepatotoksisuus).

6. Useita mittausmenetelmiä on kehitetty onnistuneesti, ja ne on myös vakioitu rutiinikäyttöön. Esimerkkinä tästä ovat lajikohtaiset entsyymivälitteiset immunosorbenttimääritysmenetelmät (ELISA), joissa vitellogeniinin määrä määritetään immunokemian avulla yksittäisiltä kaloilta otetuista veri- tai maksanäytteistä (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Rasvapäämudun verestä, seeprakalan verestä tai pään/pyrstön homogenaatista sekä medakan maksasta otetaan näytteitä vitellogeniinin mittausta varten. Medakalla verestä ja maksasta mitattujen vitellogeniiniarvojen välinen korrelaatio on hyvä (19). Lisäyksessä 6 on esitetty suositeltavat näytteenottomenetelmät vitellogeniinianalyysia varten. Vitellogeniinin mittaukseen tarkoitettuja testipaketteja on saatavilla laajalti, ja niiden on perustuttava validoituun lajikohtaiseen ELISA-menetelmään.

7. Tiettyjen lajien koiraskaloilla sekundaariset sukupuoliominaisuudet ovat ulkoisesti näkyviä, ja ne ovat kvantifioitavissa ja vastaavat verenkierron endogeenisten androgeenien pitoisuutta rasvapäämudulla ja medakalla mutta eivät seeprakalalla, koska sillä ei ole kvantifioitavia sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Naarailla on kyky kehittää koiraan sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, kun ne altistuvat androgeenisesti vaikuttaville kemikaaleille vedessä. Tieteellisessä kirjallisuudessa on useita tutkimuksia, joissa dokumentoidaan tämäntyyppisestä vasteesta rasvapäämudulla (20) ja medakalla (21). Koiraskalojen sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien vähenemisen tulkinnassa on syytä olla varovainen heikon tilastollisen voiman takia, ja sen on perustuttava asiantuntijan arvioon ja näyttöön perustuvaan toimintatapaan. Seeprakalan käyttöön tässä määrityksessä liittyy rajoituksia, koska sillä ei ole kvantifioitavia sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, jotka reagoivat androgeenisesti vaikuttaviin kemikaaleihin.

8. Rasvapäämudulla eksogeenisen androgeenialtistuksen pääindikaattori on naaraskalan kuonossa sijaitsevien kutukyhmyjen lukumäärä. Medakalla tärkein merkki eksogeenisesta altistumisesta androgeenisesti vaikuttaville kemikaaleille on naaraskalojen sukuelinpapillien lukumäärä. Lisäyksissä 5A ja 5B esitetään suositeltavat menetelmät rasvapäämudun ja medakan sukupuoliominaisuuksien arvioimiseksi.

9. Kahdenkymmenenyhden päivän kalatutkimukseen sisältyy määrällisen mätimunatuotannon arviointi ja sukurauhasten säilyttäminen valinnaista histopatologista tutkimusta varten. Jotkin sääntelyviranomaiset saattavat vaatia tätä lisäominaisuutta tutkittavaksi, jotta testieläinten lisääntymiskuntoa voidaan arvioida täydellisesti, tai tapauksissa, joissa vitellogeniini ja sekundaariset sukupuoliominaisuudet eivät vastaa kemiallista altistusta. Vaikka jotkin tutkittavat ominaisuudet saattavat olla erittäin diagnosoivia (kuten vitellogeniinin indusointi uroksissa ja kyhmyjen muodostuminen naaraissa), kaikkien tutkittavien ominaisuuksien ei ole tarkoitus riidattomasti tunnistaa tiettyjä solunsisäisiä toimintamekanismeja. Pikemminkin kaikki tutkittavat ominaisuudet yhdessä antavat mahdollisuuden päätellä, että hormonijärjestelmään saattaa kohdistua häiriöitä, ja sitä kautta saadaan ohjausta jatkotestauksiin.

▼M7

Vaikka hedelmällisyys ei liity yksinomaan hormonijärjestelmään, se on tärkeä tutkittava ominaisuus, koska sen on osoitettu reagoivan herkästi tunnettuihin hormonijärjestelmään vaikuttaviin kemikaaleihin (5). Jos kemikaali ei vaikuta hedelmällisyyteen ja muihin ominaisuuksiin, voidaan suhtautua luottavaisemmin siihen, että yhdiste ei todennäköisesti vaikuta hormonijärjestelmään. Jos kemikaali kuitenkin vaikuttaa hedelmällisyyteen, se lisää voimakkaasti päättelyn todistusarvoa. Jäljempänä tässä testimenetelmässä annetaan ohjeita tietojen tulkintaa ja testitulosten hyväksymistä varten.

10. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ovat lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

11. Lisääntymistilassa olevat koiras- ja naaraskalat altistetaan testiastioissa yhdessä. Kumpikin sukupuoli voidaan erottaa selvästi aikuisuuden ja lisääntymistilan perusteella, joten kukin tutkittava ominaisuus voidaan analysoida sukupuolikohtaisesti, ja myös sukupuolikohtainen herkkyys eksogeenisille kemikaaleille voidaan selvittää varmasti. Testin päätteeksi sukupuoli vahvistetaan sukurauhasten makroskooppisella tutkimuksella, joka tehdään avaamalla kala saksilla vatsan puolelta. Yhteenveto biologisen testin oleellisista olosuhteista on lisäyksessä 2. Yleensä testi aloitetaan kalalla, joka on otettu kutuikäisestä populaatiosta; vanhoja kaloja ei pidä käyttää. Ohjeita kalan iän ja lisääntymistilan selvittämiseen on kohdassa Kalan valinta. Testi tehdään käyttäen kolmea kemikaalialtistuksen pitoisuutta ja vesikontrollia sekä tarvittaessa liuotinkontrollia. Seeprakalan kanssa käytetään kahta astiaa tai rinnakkaisnäytettä käsittelykertaa kohti (kukin astia sisältää viisi koirasta ja viisi naarasta). Rasvapäämudun kanssa käytetään neljää astiaa tai rinnakkaisnäytettä käsittelykertaa kohti (kukin astia sisältää kaksi koirasta ja neljä naarasta). Tällä tavalla voidaan ottaa huomioon rasvapäämutukoiraan reviirikäyttäytyminen ja samalla säilyttää testin riittävä voima. Medakan kanssa käytetään neljää astiaa tai rinnakkaisnäytettä käsittelykertaa kohti (kukin astia sisältää kolme koirasta ja kolme naarasta). Altistusta jatketaan 21 päivää, ja kaloista otetaan näytteet altistuksen 21. päivänä. Määrällistä hedelmällisyyttä seurataan päivittäin.

12. Kalat lopetetaan humaanilla tavalla 21. päivänä tehtävän näytteenoton yhteydessä. Sekundaariset sukupuolisominaisuudet mitataan rasvapäämudulta ja medakalta (ks. lisäykset 5A ja 5B). Verinäytteet vitellogeniinin määrittämiseksi otetaan seeprakalalta ja rasvapäämudulta; vaihtoehtoisesti seeprakalalta voidaan ottaa pää/pyrstö vitellogeniinin määrittämistä varten (lisäys 6). Medakalta otetaan maksa vitellogeniinianalyysia varten (lisäys 6). Sukurauhaset kiinnitetään joko kokonaisina tai dissekoituina mahdollista histopatologista arviointia varten (22).

TESTIN HYVÄKSYTTÄVYYSKRITEERIT

13. Testitulokset ovat hyväksyttäviä, jos seuraavat ehdot täyttyvät:

— kuolleisuus vesi- (tai liuotin)kontrolleissa on enintään 10 prosenttia altistusjakson lopussa,

— liuenneen hapen pitoisuus on vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko altistusjakson ajan,

— veden lämpötila testiastioiden välillä vaihtelee enintään ± 1,5 °C milloin tahansa testin aikana ja poikkeaa enintään 2 °C siitä lämpötila-alueesta, joka on määritelty kyseiselle testilajille (lisäys 2),

— saatavilla on oltava näyttöä, joka osoittaa, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista,

▼M7

— on näyttöä siitä, että kalat kutevat aktiivisesti kaikissa rinnakkaisnäytteissä ennen kemiallisen altistuksen aloittamista ja rinnakkaiskontrolleissa koko testin ajan.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

14. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

a. happi- ja pH-mittarit

b. laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen

c. asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan

d. kemiallisesti inertistä materiaalista valmistettuja tankkeja, jotka ovat riittävän suuria suhteessa suositeltuun kalamäärään ja kalatiheyteen (ks. lisäys 2)

e. rasvapäämudun ja seeprakalan kutualusta; tarkemmat tiedot ovat lisäyksessä 4

f. riittävän tarkka vaaka (ts. tarkkuus ± 0,5 mg).

Vesi

15. Testissä voidaan käyttää mitä tahansa vettä, jossa testilaji selviytyy ja kasvaa riittävän pitkän ajan. Veden laadun on oltava vakio koko testin ajan. Veden pH:n on oltava 6,5–8,5, mutta se saa kunkin testin aikana vaihdella enintään ± 0,5 pH-yksikköä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta), näytteitä on otettava säännöllisin väliajoin analyyseja varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, and SO_4^{2-}), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esimerkiksi kuuden kuukauden välein). Lisäyksessä 3 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia.

Testiliuokset

16. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuos valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittamista tai ultraääntä). Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimen käyttöä kantoaineena ei suositella. Jos liuotin on kuitenkin tarpeen, rinnalla on käytettävä liuotinkontrollia, ja liuotinpitoisuuden on oltava sama kuin kemikaalilla käsittelyissä. Vaikeasti testattavien kemikaalien yhteydessä liuotin voi olla teknisesti paras ratkaisu. Tätä koskevat ohjeet on syytä katsoa vaikeasti testattavien aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevasta OECD:n ohjeasiakirjasta (23). Liuotin valitaan aineen tai seoksen kemiallisten ominaisuuksien perusteella. OECD:n ohjeasiakirjassa enimmäismääräksi suositellaan 100 µl/l, mitä on noudatettava. Hiljattain julkaistussa katsauksessa (24) kuitenkin korostetaan, että ylimääräisiä ongelmia on odotettavissa, jos hormonijärjestelmään kohdistuvia vaikutuksia testattaessa käytetään liuottimia. Sen vuoksi on suositeltavaa, että jos liuotinta tarvitaan, sen pitoisuus on pidettävä mahdollisimman pienenä aina, kun se on teknisesti toteutettavissa (testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan).

▼M7

17. Testissä käytetään läpivirtaustestijärjestelmää. Tällainen järjestelmä annostelee ja laimentaa testiaineen varastoliuosta jatkuvasti (esimerkiksi annostelupumpulla, laimentimella, kyllästävällä järjestelmällä) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saa vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Heikkolaatuisia muoviletkuja tai muita sellaisia materiaaleja, jotka saattavat sisältää biologisesti aktiivisia kemikaaleja, ei pidä käyttää. Kun valitaan materiaalia läpivirtausjärjestelmään, testikemikaalin mahdollinen adsorptio tähän materiaaliin on otettava huomioon.

Kalojen hoito

18. Testikalat on valittava yhdestä laboratoriopopulaatiosta, mieluiten samasta poikueesta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuisessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä. On tärkeää, että kalamäärä ja kalatiheys (ks. määritelmät lisäyksestä 1) ovat asianmukaiset käytettyjen testilajien kannalta (ks. lisäys 2).

19. Kuolleiden kalojen määrä kirjataan 48 tunnin alkutotuttelun jälkeen, ja sitten noudatetaan seuraavia periaatteita:

— jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: koko erä hylätään

— jos kuolleisuus on 5–10 prosenttia populaatiosta: kaloja totutetaan vielä seitsemän vuorokautta; jos kuolleisuus on yli 5 prosenttia toisen seitsemän vuorokauden ajanjakson aikana, koko erä hylätään

— jos kuolleisuus on alle 5 prosenttia populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: erä hyväksytään.

20. Kalat eivät saa saada hoitoa sairauteen totutusjakson, esialtistusjakson tai altistusjakson aikana.

Esialtistus ja kalojen valinta

21. Yhdestä kahteen viikkoa kestävä esialtistusjakso on suositeltava, ja siinä eläimet sijoitetaan samanlaisiin astioihin kuin varsinaisessa testissä. Kaloja on ruokittava *ad libitum* koko hoito- ja altistusjakson ajan. Altistusjakso aloitetaan lisääntymiskypsiin koe-eläimiin kuuluvalla dimorfisella aikuisella kalalla (ts. jonka sekundaariset sukupuolieroominaisuudet ovat rasvapäämudulla ja medakalla selvästi näkyvillä), joka kutee aktiivisesti. Rasvapäämutuja koskeva yleinen ohje on, että niiden iän on oltava 20 (± 2) viikkoa, jos niitä on kasvatettu 25 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan. Lisäksi on tarkkailtava kulloisenkin kalaerän varsinaista lisääntymistilaa. Medakojen iän on oltava 16 (± 2) viikkoa, jos niitä on kasvatettu 25 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan. Seeprakalojen iän on oltava 16 (± 2) viikkoa, jos niitä on kasvatettu 26 ± 2 °C:n lämpötilassa niiden koko elinkaaren ajan. Mätimunatuotantoa on arvioitava päivittäin esialtistusvaiheen aikana. On suositeltavaa, että kutua havainnoidaan kaikissa rinnakkaistankeissa ennen niiden sisällyttämistä tutkimuksen altistusvaiheeseen. Määrällistä suositusta toivottavasta mätimunatuotannosta ei voida tässä vaiheessa antaa, mutta on suhteellisen yleistä havaita kullakin lajilla keskimääräiseksi kuduksi > 10 mätimunaa/naaras/päivä. On käytettävä mätimunatuotannon tuloksen mukaan satunnaistettua lohkoasetelmaa, jotta rinnakkaisnäytteet voidaan jakaa eri testitasoille ja sitä kautta varmistaa rinnakkaisnäytteiden tasapainoinen jakauma

▼M7

TESTISUUNNITELMA

22. Testissä käytetään kolmea pitoisuutta testikemikaalista, yhtä (vesi)kontrollia ja tarvittaessa yhtä liuotinkontrollia. Tiedot voidaan analysoida käsittely- ja kontrollivasteiden välisten, tilastollisesti merkitsevien erojen määrittämiseksi. Näistä analyyseista saadaan tietoa siitä, onko kemikaalin pidempiaikainen lisätestaus haittavaikutusten osalta (eloonjäämiseen, kehitykseen, kasvuun ja lisääntymiseen) tarpeen sen sijaan, että näitä tietoja käytetään riskinarvioinnissa (25).

23. Kunkin käsittelytason seeprakalakoirailta ja -naarailta (viisi koirasta ja viisi naarasta kummassakin rinnakkaisnäytteessä) sekä kontrollikaloilta otetaan kokeen 21. päivänä näytteet vitellogeniinin mittaamista varten. Kunkin käsittelytason medakakoirailta ja -naarailta ja kontrollikaloilta (kolme koirasta ja kolme naarasta kussakin neljässä rinnakkaisnäytteessä) otetaan kokeen 21. päivänä näytteet vitellogeniinin ja sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien mittaamista varten. Rasvapäämutukoirailta ja -naarailta (kaksi koirasta ja neljä naarasta kaikissa neljässä rinnakkaisnäytteessä) ja kontrollikaloilta otetaan kokeen 21. päivänä näytteet vitellogeniinin ja sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien mittaamista varten. Hedelmällisyys on arvioitava määrällisesti, ja sukurauhaskudokset on kiinnitettävä joko kokonaisina tai leikeltynä mahdollista histopatologista arviointia varten, mikäli tarpeen.

Testipitoisuuksien valinta

24. Tässä testissä suurimmaksi testipitoisuudeksi on valittava annostason määrittämistutkimuksista tai muista toksisuustiedoista saatu suurin siedetty pitoisuus (MTC-arvo), tai 10 mg/l tai enimmäisliukoisuus vedessä sen mukaan, mikä arvo on pienin. MTC-arvo on kemikaalin suurin testauspitoisuus, jonka aiheuttama kuolleisuus on alle 10 prosenttia. Tässä menetelmässä edellytetään, että käytettävissä on empiiristä tietoa välittömästä toksisuudesta tai muita toksisuustietoja, joiden perusteella MTC-arvo voidaan estimoida. MTC-arvon estimointi voi olla epätarkkaa, ja siinä tarvitaan yleensä asiantuntijan näkemystä.

25. Testissä tarvitaan siis kolme testipitoisuutta, siten että pitoisuusvälin vakiokerroin saa olla enintään 10, ja laimennusvesikontrolli (sekä tarvittaessa liuotinkontrolli). Pitoisuusvälin kertoimen vaihteluvälin suositellaan olevan 3,2–10.

MENETTELY

Kalojen valinta ja punnitus

26. On tärkeää minimoida kalojen painon vaihtelu testin alussa. Lisäyksessä 2 esitetään suositeltava kokovaihtelu tähän testiin suositelluille eri lajeille. Testissä käytetyssä koko kalaerässä koiras- ja naaraskalojen yksilöllisten painojen vaihteluväli testin alussa on mahdollisuuksien mukaan pidettävä ± 20 prosentissa saman sukupuolen painon aritmeettisesta keskiarvosta. Suositellaan, että osa erän kaloista punnitaan ennen testiä keskimääräisen painon estimoimiseksi.

Altistumisolosuhteet

Kesto

27. Testi kestää esialtistusjakson jälkeen 21 päivää. Suositeltu esialtistusjakso on yhdestä kahteen viikkoa.

Ruokinta

28. Kaloja on ruokittava *ad libitum* sopivalla ravinnolla (lisäys 2) riittävän usein, jotta ne pysyvät hyvässä kunnossa. On varottava, ettei vedessä kasva mikrobeja eikä se samennu. Yleisohje on, että päivittäinen annos voidaan jakaa

▼M7

kahteen tai kolmeen yhtä suureen annokseen, kun ruokintakertoja on useampia päivässä, ja ruokintakertojen välillä on oltava vähintään kolme tuntia aikaa. Suurempi kerta-annos on hyväksyttävää antaa etenkin viikonloppuisin. Kalat on pidettävä ravinnotta 12 tuntia ennen näytteenottoa/ruumiinavausta.

29. Kalojen rehu on tarkastettava mahdollisten kontaminanttien, kuten orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden, polysyklisten aromaattisten hiilivetyjen (PAH-yhdisteiden) ja polykloorattujen bifenyylien (PCB-yhdisteiden) varalta. Runsaasti fytoestrogeeneja sisältävää rehua on vältettävä, koska se heikentää testivastetta tunnetulle estrogeeniagonistille (esim. 17-b-estradiolille).

30. Syömättä jäänyt rehu ja ulosteet on poistettava testiastioista vähintään kaksi kertaa viikossa; kunkin säiliön pohja on puhdistettava huolellisesti esimerkiksi käyttämällä lappoa.

Valo ja lämpötila

31. Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan on oltava sopivia käytetylle testilajille (ks. lisäys 2).

Analyyttisten määritysten ja mittausten taajuus

32. Ennen altistusjakson aloittamista on varmistettava, että kemikaalin annostelujärjestelmä toimii asianmukaisesti. Kaikki analyysimenetelmät on määritettävä, ja kemiallisesta stabiiliudesta testijärjestelmässä on oltava riittävästi tietoa. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet on määritettävä säännöllisesti seuraavasti: laimentimen ja myrkyllisen varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava mieluiten päivittäin mutta vähintään kahdesti viikossa, ja ne saavat vaihdella enintään 10 prosenttia koko testin aikana. Varsinaiset testikemikaalin pitoisuudet suositellaan mitattavan kaikista astioista testin alussa ja sen jälkeen viikon välein.

33. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testiaineen pitoisuus pysyy kuitenkin tyydyttävästi ± 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää joko nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia.

34. Näytteet on mahdollisesti suodatettava (esim. 0,45 μm:n huokoskoon suotimella) tai sentrifugoitava. Mikäli se on tarpeen, sentrifugointi on suositeltava menetelmä. Jos testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää.

35. Testin aikana kaikista testiastioista on mitattava liuennut happi, lämpötila ja pH vähintään kerran viikossa. Kokonaiskovuus ja alkalisuus on mitattava kontrolleista ja suurimman pitoisuuden astiasta vähintään kerran viikossa. Lämpötilaa on mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

Havainnot

36. Monia yleisiä (esimerkiksi eloonjääneisyyttä) ja biologisia vasteita (kuten vitellogeniiniarvot) arvioidaan testin kuluessa tai sen päättyessä. Hedelmällisyyden päivittäinen määrällinen seuranta on tarpeen. Näiden ominaisuuksien mittaamista ja arviointia sekä tulosten käyttökelpoisuutta kuvataan jäljempänä.

Eloonjääneisyys

37. Kalat on tutkittava päivittäin testijakson aikana. Kuolleisuus on kirjattava, ja kuolleet kalat on poistettava testiastiasta mahdollisimman pian. Kuolleiden kalojen tilalle ei tule vaihtaa eläviä sen paremmin kontrolli- kuin käsittelyastioihinkaan. Testin aikana kuolleiden kalojen sukupuoli on määritettävä sukurauhasten makroskooppisella tutkimuksella.

▼M7

Käyttäytyminen ja ulkonäkö

38. Kaikenlainen poikkeava käyttäytyminen (kontrolleihin nähden) on kirjattava muistiin. Siitä osoituksena voivat olla yleisen toksisuuden merkit, kuten hyperventilaatio, koordinoimaton uinti, tasapainon menetys sekä epätyypillinen liikkumattomuus tai syöminen. Myös muut ulkoiset poikkeavuudet (kuten verenvuoto tai värimuutokset) on merkittävä muistiin. Tällaisia toksisuuden merkkejä on tulkittava varovasti tietoja analysoitaessa, koska ne voivat viitata pitoisuuksiin, joiden yhteydessä hormonijärjestelmään kohdistuviin vaikutuksiin liittyvät biomarkkerit eivät ole luotettavia. Näistä käyttäytymiseen liittyvistä havainnoista voidaan saada myös hyödyllistä laadullista tietoa kaloilla testausta koskevia mahdollisia tulevia vaatimuksia varten. Esimerkiksi rasvapäämuduilla on havaittu androgeenialtistuksen yhteydessä reviiriin liittyvää aggressiivisuutta normaaleilla koirailla tai maskulinisoituneilla naarailla, kun taas seeprakaloilla estrogeeni- tai antiandrogeenialtistuksen on havaittu vähentävän lajityypillistä parittelu- ja kutemiskäyttäytymistä tai estävän sen keinovalon syttyessä.

39. Koska jotkin ulkonäköön liittyvät seikat (pääasiassa väri) voivat muuttua nopeasti käsittelyn yhteydessä, on tärkeää, että laadulliset havainnot tehdään ennen kuin eläimet poistetaan testijärjestelmästä. Rasvapäämuduista tähän saakka karttunut kokemus viittaa siihen, että jotkin hormonijärjestelmään vaikuttavat kemikaalit voivat aluksi aiheuttaa muutoksia seuraavissa ulkoisissa ominaisuuksissa: kalan väri (vaalea tai tumma), värityksen kuviot (pystysuorien raitojen ilmaantuminen) ja kalan muoto (pään ja rinnan alue). Sen vuoksi kalan fyysisestä ulkonäöstä on tehtävä havaintoja testin kuluessa ja tutkimuksen päättyessä.

Hedelmällisyys

40. Kutua koskevat määrälliset päivittäiset havainnot on kirjattava rinnakkaisnäytekohtaisesti. Mätimunatuotanto on kirjattava munien määränä eloonjäänyttä naarasta kohden päivässä rinnakkaisnäytekohtaisesti. Munat poistetaan testiastioista päivittäin. Rasvapäämudulle ja seeprakalalle on asetettava testiastiaan kutualusta, jotta kalat voivat kutea tavanomaisissa olosuhteissa. Lisäyksessä 4 on seeprakalalle (lisäys 4A) ja rasvapäämudulle (lisäys 4B) suositeltavia kutualustoja koskevia lisätietoja. Medaka ei tarvitse kutualustaa.

Kalojen humaani lopettaminen

41. Testipäivänä 21 eli altistuksen päättyessä kalat on lopetettava tarkoituksenmukaisella määrällä trikaiinia (trikaiinimetaanisulfonaatti, Metacain MS-222 (CAS 886-86-2), 100–500 mg/l, puskuroitu 300 mg/l:n vahvuisella $NaHCO_3$:lla (natriumbikarbonaatti, CAS 144-55-8), limakalvoärsytyksen vähentämiseksi. Sen jälkeen kaloilta otetaan veri- tai kudosnäytteet vitellogeniinimääritystä varten, kuten vitellogeniinia koskevassa osiossa on selitetty.

Sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien havainnointi

42. Jotkin hormonijärjestelmään vaikuttavat kemikaalit voivat aiheuttaa muutoksia tietyissä erikoistuneissa sekundaarisissa sukupuoliominaisuuksissa (kutukyhmyjen lukumäärä rasvapäämutukoirailla ja sukuelinpapillien lukumäärä medakakoirailla). Kemikaalit, joilla on tiettyjä vaikutustapoja, voivat erityisesti aiheuttaa sen, että vastakkaisen sukupuolen eläimillä esiintyy sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Esimerkiksi androgeenireseptorin agonistit, kuten trenboloni, metyylitestosteroni ja dihydrotestosteroni, voivat aiheuttaa korostuneiden kutukyhmyjen kehittymisen rasvapäämutunaaraille tai sukuelinpapillien kehittymisen medakanaaraille (11, 20, 21). On myös raportoitu, että estrogeenireseptorin antagonistit saattavat vähentää kutukyhmyjen määrää ja pienentää selänpuoleista niskakyhmyä aikuisilla rasvapäämutukoirailla (26, 27). Näistä morfologisista havainnoista voidaan saada myös hyödyllistä laadullista ja määrällistä tietoa kaloilla testausta koskevia mahdollisia tulevia

▼M7

vaatimuksia varten. Rasvapäämudun kutukyhmyjen ja medakan sukuelinpapillien lukumäärä ja koko voidaan määrittää suoraan tai käytännöllisemmin preparoiduilta yksilöiltä. Suositellut menetelmät rasvapäämudun ja medakan sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien arvioimiseen on esitetty lisäyksessä 5A ja lisäyksessä 5B.

Vitellogeniini (VTG)

43. Verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriitti-kapillaariputkeen tai vaihtoehtoisesti sydänpunktiolla, joka tehdään ruiskulla. Kerättävän veren määrä vaihtelee kalan koon mukaan yleensä välillä 5–60 µl rasvapäämutuyksilöä kohti ja välillä 5–15 µl seeprakalayksilöä kohti. Plasma erotetaan verestä sentrifugoimalla, ja sitä säilytetään proteaasin estäjien kanssa – 80 °C:ssa vitellogeniinin analysointiin saakka. Toinen vaihtoehto on se, että vitellogeniinin määrityksen kudoslähteenä käytetään medakan maksaa ja seeprakalan pää-/pyrstöhomogenaattia (lisäys 6). Vitellogeniinin mittauksen on perustuttava validoituun homologiseen ELISA-menetelmään, jossa käytetään homologista vitellogeniinistandardia ja homologisia vasta-aineita. On suositeltavaa käyttää sellaista menetelmää, jolla pystytään havaitsemaan jopa niin alhaisia vitellogeniinitasoja kuin vain muutama ng/ml plasmassa (tai ng/mg kudoksessa), mitä pidetään altistumattomien koiraskalojen taustapitoisuutena.

44. Vitellogeniinianalyysin laatu varmistetaan käyttämällä standardeja, nollakokeita ja vähintään kaksinkertaista analyysia. Jokaisen ELISA-menetelmän yhteydessä on tehtävä matriisivaikutustesti (vaikutus näytteen laimentumiseen), jotta voidaan määrittää näytteen vähimmäislaimennuskerroin. Kuhunkin vitellogeniinianalyysissa käytettävään ELISA-levyyn on sisällytettävä seuraavat laadunvalvontanäytteet: vähintään kuusi kalibrointistandardia, jotka kattavat odotettujen vitellogeniinipitoisuuksien vaihteluvälin, ja vähintään yksi ei-spesifinen sitoutumismääritys -nollakoe (kaksinkertainen analyysi). Näissä nollakokeissa absorbanssin on oltava alle viisi prosenttia kalibrointistandardin enimmäisabsorbanssista. Jokaisesta näytelaimennoksesta analysoidaan vähintään kaksi alikvoottia (kaksi rinnakkaiskuoppaa). Rinnakkaiskuopat, joiden arvot eroavat toisistaan yli 20 prosenttia, on analysoitava uudelleen.

45. Kalibrointikäyrien korrelaatiokertoimen (R^2) on oltava yli 0,99. Suuri korrelaatio ei kuitenkaan yksinään riitä takaamaan pitoisuuden asianmukaista ennustamista kaikissa vaihteluväleissä. Sen lisäksi, että korrelaatio kalibrointikäyrään on riittävän suuri, kunkin standardin pitoisuuden on – kalibrointikäyrästä laskettuna oltava 70–120 prosenttia sen nimellispitoisuudesta. Jos nimellispitoisuuksissa on havaittavissa kalibroinnin regressiolinjasta poispäin suuntautuva trendi (esimerkiksi pienemmillä pitoisuuksilla), voi olla tarpeen jakaa kalibrointikäyrä alempaan ja ylempään vaihteluväliin tai käyttää epälineaarista mallia, jotta absorbanssitiedot saadaan sovitettua asianmukaisesti. Jos käyrä jaetaan, kummankin linjan segmentin R^2 on oltava > 0,99.

46. Havaitsemisrajaksi (LOD) määritetään pienimmän määritysstandardin pitoisuus, ja määritysrajaksi (LOQ) määritetään pienimmän määritysstandardin pitoisuus kerrottuna pienimmällä laimennuskertoimella.

47. Niinä päivinä, kun tehdään vitellogeniinimäärityksiä, analysoidaan myös rikastusnäyte käyttämällä määritysten välistä vertailuainetta (lisäys 7). Odotuksenmukaisen pitoisuuden ja mitatun pitoisuuden välinen suhde ilmoitetaan kyseisenä päivänä tehtyjen määritysten tulosten mukana.

Sukurauhasten histopatologinen arviointi

48. Sääntelyviranomaiset saattavat vaatia sukurauhasten histopatologista tutkimusta kohde-elimen tutkimiseksi HPG-akselilla kemiallisen altistuksen jälkeen. Tätä varten sukurauhaset kiinnitetään joko kokonaisina tai dissekoituina. Jos histopatologiaa vaaditaan, sukurauhasista etsitään erityisesti hormonijärjestelmään liittyviä vasteita, kun testikemikaalin vaikutusta hormonijärjestelmään arvioidaan. Tällaisia diagnostisia vasteita ovat ennen kaikkea

▼M7

testikulaariset munasolut, Lydiginsolun hyperplasia, alentunut ruskuaisen muodostus, lisääntynyt alkusiemensolujen määrä ja perifollikulaarinen hyperplasia. Muilla sukurauhasvaurioilla, kuten munasolujen atresialla, testikulaarisella degeneraatiolla ja kehitysvaihemuutoksilla, voi olla erilaisia syitä. Kalojen sukurauhasten histopatologiaa koskevassa ohjeasiakirjassa ilmoitetaan menettelyt, joita käytetään sukurauhasten dissekointiin, kiinnittämiseen, lohkomiseen ja histopatologiseen arviointiin (22).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Biomarkkerivasteiden arviointi varianssianalyysilla (ANOVA)

49. Jotta voidaan tunnistaa kemikaalin mahdollinen vaikutus, käsittely- ja kontrolliryhmien vasteita verrataan käyttämällä varianssianalyysia (ANOVA). Jos käytetään liuotinkontrollia, on tehtävä asianmukainen tilastollinen testi laimennusvesi- ja liuotinkontrollien välillä kunkin tutkittavan ominaisuuden osalta. Ohjeita siitä, miten laimennusvesi- ja liuotinkontrolleja koskevia tietoja käsitellään tilastollisessa analyysissa, on OECD:n asiakirjassa 2006c (28). Kaikki tiedot biologisesta vasteesta on analysoitava ja raportoitava kummastakin sukupuolesta erikseen. Jos parametristen menetelmien edellyttämät vaatimukset eivät täyty – epänormaali jakauma (esimerkiksi Shapiro-Wilkin testi) tai heterogeeninen varianssi (Bartlettin testi tai Levenen testi) – on harkittava mittaustulosten muuntamista varianssien homogenisoimiseksi ennen ANOVA-analyysia tai painotetun ANOVAn tekemistä. Monivertailuihin liittyvää Dunnettin testiä (parametrinen) tai Mann-Whitneyn testiä ja Bonferronin korjausta (ei-parametrinen) voidaan käyttää ei-monotonisten annosvasteiden yhteydessä. Muita tilastollisia testejä voidaan käyttää (esimerkiksi Jonckheere-Terpstran testi tai Williamsin testi), jos annosvaste on jotakuinkin monotoninen. Lisäyksessä 8 on tilastollinen vuokaavio, joka on tarkoitettu avuksi, kun päätetään, mikä on tarkoituksenmukaisin tilastollinen testi käytettäväksi. Lisätietoja on myös ekotoksisuustietojen tilastollisessa analyysissa sovellettavia nykyisiä lähestymistapoja koskevassa OECD:n asiakirjassa ”Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (28).

Testitulosten raportointi

50. Tutkimustietoihin on sisällytettävä seuraavat seikat:

Testauslaitos:

— vastuuhenkilöstö ja heidän tutkimusta koskevat vastuualueensa

— jokaisen laboratorion pätevyys on osoitettava käyttämällä monenlaisia edustavia kemikaaleja

Testikemikaali:

— testikemikaalin luonnehdinta

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— testipitoisuuksien valmistusmenetelmä ja valmistustiheys

— tiedot stabiiliudesta ja biohajoavuudesta

Liuotin:

— liuottimen luonnehdinta (tyyppi, käytetty pitoisuus)

— liuottimen valinnan perustelut (jos muu kuin vesi)

▼**M7**

Koe-eläimet:

— laji ja kanta

— toimittaja ja toimittajan tilat

— kalan ikä testin alussa ja sen lisääntymis-/kututila

— tarkat tiedot eläinten totutusmenetelmästä

— kalan paino altistuksen alussa (kalaerän osan punnituksen perusteella)

Testiolosuhteet:

— käytettävä testimenetelmä (testin tyyppi, kalamäärä, kalatiheys jne.)

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja virtausnopeus

— nimellistestipitoisuudet, testiliuosten viikoittain mitatut pitoisuudet ja käytetyt analyysimenetelmät, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat testiastioissa ja todisteet siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuuksia todellisessa liuoksessa

— laimennusveden ominaisuudet (mukaan luettuina pH, kovuus, alkalisuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet, orgaanisen hiilen kokonaismäärä, suspendoituneet kiinteät aineet ja muut tehdyt mittaukset)

— testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus

— tarkat tiedot ruokinnasta (esimerkiksi rehu(je)n tyyppi, lähde, annettu määrä ja antotiheys) sekä analyysit merkittävistä kontaminanteista, mikäli saatavilla (esimerkiksi PCB-yhdisteet, PAH-yhdisteet ja orgaanista klooria sisältävät torjunta-aineet)

Tulokset

— näyttö siitä, että kontrollit täyttävät testin hyväksyttävyyskriteerit

— kuolleisuutta koskevat tiedot testipitoisuuksissa ja kontrolleissa

— käytetyt tilastolliset analyysitekniikat, aineiston käsittely ja käytettyjen tekniikoiden perustelut

— paljain silmin näkyviä morfo-biologisia havaintoja, mukaan luettuina sekundaariset sukupuoliominaisuudet, mätimunatuotantoa ja vitellogeniinia koskevat tiedot

— tulokset aineiston analyyseista mieluiten taulukkoina ja graafisessa muodossa

— tiedot kalojen mahdollisista epätavallisista reaktioista ja testikemikaalin aiheuttamista mahdollisista näkyvistä vaikutuksista

▼M7

TESTITULOSTEN TULKINTAA JA HYVÄKSYMISTÄ KOSKEVAT OHJEET

51. Tämä kohta sisältää joitakin seikkoja, jotka on otettava huomioon, kun eri tutkittavia ominaisuuksia koskevia testituloksia tulkitaan. Tuloksia on tulkittava varoen, jos testikemikaali vaikuttaa aiheuttavan ilmeistä toksisuutta tai vaikuttavan koe-eläimen yleiskuntoon.

52. Testipitoisuuksien vaihteluvälin asettamisessa on varottava ylittämästä suurinta siedettyä pitoisuutta, jotta aineiston järkevä tulkinta on mahdollista. On tärkeää, että testissä on vähintään yksi käsittely, jossa ei ilmene merkkejä myrkyllisistä vaikutuksista. Sairauden ja myrkyllisten vaikutusten merkit on arvioitava ja raportoitava perinpohjaisesti. On esimerkiksi mahdollista, että naarailla vitellogeniinin tuotantoon voivat vaikuttaa myös yleinen toksisuus ja muuhun kuin hormonijärjestelmään kohdistuvat myrkylliset vaikutustavat (esimerkiksi hepatotoksisuus). Vaikutusten tulkintaa voidaan kuitenkin vahvistaa muilta käsittelytasoilta saaduilla tuloksilla, joita ei voida perustella systeemisellä toksisuudella.

53. Testituloksen hyväksyttävyyden kannalta on otettava huomioon muutamia seikkoja. Perusohje on, että kontrolliryhmien koiraiden ja naaraiden vitellogeniinitasot on eriytettävä ja eroteltava rasvapäämudulla ja seeprakalalla noin kolmeen suuruusluokkaan ja medakalla noin yhteen suuruusluokkaan. Validointiraporteissa (1, 2, 3, 4) on esimerkkejä kontrolli- ja käsittelyryhmistä saatujen arvojen vaihteluvälistä. Kontrolliryhmän koirailla tavatut suuret vitellogeniiniarvot voivat heikentää testin herkkyyttä ja sen kykyä havaita heikkoja estrogeeniagonisteja. Kontrolliryhmän naarailla tavatut pienet vitellogeniiniarvot voivat niin ikään heikentää testin herkkyyttä ja sen kykyä havaita aromataasin estäjiä ja estrogeeniantagonisteja. Nämä ohjeet on laadittu validointitutkimusten perusteella.

54. Mätimunatuotannon määrälliseen määrittämiseen liittyy merkittävää vaihtelua [variaatiokerroin voi vaihdella 20–60 prosenttia], mikä vaikuttaa kykyyn havaita tutkimuksessa alle 70 prosentin merkitsevä vähennys munatuotannossa, kun variaatiokerroin lähenee 50:tä prosenttia tai ylittää sen. Jos variaatiokerroin rajoitetaan tätä alempiin arvoihin (noin 20–30 prosenttiin), tutkimuksessa saavutetaan hyväksyttävä voima (80 prosenttia) havaita 40–50 prosentin vähennys mätimunatuotannossa. Rasvapäämudulla käytetty testisuunnitelma, johon sisällytetään neljä rinnakkaisnäytettä käsittelytasoa kohden, antaa lisää voimaa hedelmällisyysominaisuuden tutkimiseen verrattuna testisuunnitelmaan, jossa on vain kaksi rinnakkaisnäytettä.

55. Jos laboratorio ei ole tehnyt määritystä aikaisemmin tai jos on tehty huomattavia muutoksia (esimerkiksi kalakannan tai toimittajan vaihto), on syytä tehdä tekninen pätevyystutkimus. On suositeltavaa, että siinä käytetään kemikaaleja, joilla on monenlaisia vaikutustapoja tai jotka vaikuttavat lukuisiin testissä tutkittaviin ominaisuuksiin. Käytännössä jokaista laboratoriota kehotetaan keräämään oma kontrollitietokanta koiraita ja naaraita varten sekä käyttämään positiivista kemikaalikontrollia estrogeeniaktiivisuuden osalta (esimerkiksi 17β-estradioli pitoisuudella 100 ng/l tai tunnettu heikko agonisti), jolloin koiraskalojen vitellogeniini lisääntyy, positiivista kemikaalikontrollia aromataasin eston osalta (esimerkiksi fadrotsoli tai prokloratsi pitoisuudella 300 µg/l), jolloin naaraskalojen vitellogeniini vähenee, ja positiivista kemikaalikontrollia androgeeniaktiivisuuden osalta (esimerkiksi 17β-trenboloni pitoisuudella 5 µg/l), jolloin rasvapäämutu- ja medakanaarille alkaa kehittyä sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia. Kaikkia näitä tietoja voidaan verrata validointitutkimuksista (1, 2, 3) saatuihin tietoihin, jotta laboratorion pätevyys saadaan varmistettua.

56. Yleensä vitellogeniinimittauksia pidetään positiivisina, jos koiraiden vitellogeniini lisääntyy tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,05$), tai jos naaraiden

▼M7

vitellogeniini vähenee tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,05$) ainakin suurimman testatun annoksen yhteydessä kontrolliryhmään verrattuna ja jos merkkejä yleisestä toksisuudesta ei ole. Positiivista tulosta tukee myös se, että annoksen ja vastekäyrän välillä voidaan osoittaa olevan biologisesti todennäköinen suhde. Kuten aiemmin on mainittu, vitellogeniinin vähentyminen ei välttämättä johdu pelkästään hormonijärjestelmästä, mutta positiivinen tulos on yleensä kuitenkin tulkittava todisteeksi hormonijärjestelmään kohdistuvasta vaikutuksesta *in vivo*, minkä perusteella asiaa on tutkittava tarkemmin.

57. Sääntelyviranomaiset saattavat vaatia sukurauhasten histopatologista arviointia, jonka avulla määritetään testieläinten lisääntymiskunto ja testituloksia voidaan arvioida näytön perusteella. Sukurauhasten histopatologinen tutkimus ei ehkä ole tarpeen tapauksissa, joissa joko vitellogeniini tai sekundaariset sukupuoliominaisuudet ovat positiivisia (eli vitellogeniini on lisääntynyt tai vähentynyt tai sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia on kehittynyt).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2006a), Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 60, Pariisi.

(1) OECD (2006b), Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 61, Pariisi.

(2) OECD (2007), Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 78, Pariisi.

(3) Owens, J. W. (2007), Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine, http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (viittauspäivä 18.9.2008).

(4) US EPA (2007), Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report, 15.12.2007, Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto, Washington, DC, 104 s.

(5) OECD (2008), Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, Pariisi.

(6) Sumpter, J. P. ja Jobling, S. (1995), Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173–8 Review.

(7) Pawlowski S. ja muut (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277–91.

(8) Andersen L. ja muut (2006), Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343–52.

(9) Ankley G. T. ja muut (2002), Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121–30.

▼M7

(10) Panter G. H. ja muut (2004), Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11–21.

(11) Parks L. G. ja muut (1999), Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113–25.

(12) Panter G. H. ja muut (1999), Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bryssel, Belgia.

(13) Fenske M. ja muut (2001), Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217–232.

(14) Holbech H. ja muut (2001), Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119–131.

(15) Rose J. ja muut (2002), Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531–539.

(16) Brion F. ja muut (2002), Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; nide 21: 1699–1708.

(17) Yokota H. ja muut (2001), Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(18) Tatarazako N. ja muut (2004), Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301–308.

(19) Ankley G. T. ja muut (2003), Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350–60.

(20) Seki M. ja muut (2004), Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774–81.

(21) OECD (2010), Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Pariisi.

(22) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 23, Pariisi.

(23) Hutchinson T. H. ja muut (2006a), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76, s.69–92.

(24) Hutchinson T. H. ja muut (2006b), Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as ”signposts,” not ”traffic lights,” in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106–14.

(25) Miles-Richardson S. R. ja muut (1999), Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129–145.

▼**M7**

(26) Martinovic D. ja muut (2008), Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478–488.

(27) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Pariisi.

(28) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, 30.1.2008, Yhdysvaltain ympäristönsuojeluvirasto, Washington DC, 110 s.

(29) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Pariisi.

▼**M7**

Lisäys 1

LYHENTEET JA MÄÄRITELMÄT

CV (*coefficient of variation*): Variaatiokerroin.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys.

HPG-akseli: Hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli.

Kalamäärä: Kalojen tuorepaino suhteessa vesimäärään.

Kalatiheys: Kalojen lukumäärä suhteessa vesimäärään.

Kemikaali: Aine tai seos.

MTC (*Maximum Tolerated Concentration*): Suurin siedetty pitoisuus, noin 10 prosenttia LC_{50}-arvosta.

Testikemikaali: Aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

VTG: Vitellogeniini – fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisen esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

▼M7

Lisäys 2

KALOJEN HORMONIJÄRJESTELMÄÄN KOHDISTUVAN SEULONTATUTKIMUKSEN KOEOLOSUHTEET

1. Suositeltu laji	Rasvapäämutu (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Seeprakala (*Danio rerio*)
2. Testityyppi	Läpivirtaus	Läpivirtaus	Läpivirtaus
3. Veden lämpötila	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Valaistus	Loistelamppu (laajakirjoinen)	Loistelamppu (laajakirjoinen)	Loistelamppu (laajakirjoinen)
5. Valovoimat	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot)
6. Valoisa aika (valoisan ja pimeän väliset siirtymät valinnaisia, niitä ei kuitenkaan pidetä välttämättöminä)	16 t valoisaa, 8 t pimeää	12–16 t valoisaa, 12–8 t pimeää	12–16 t valoisaa, 12–8 t pimeää
7. Kalamäärä	< 5 g litraa kohti	< 5 g litraa kohti	< 5 g litraa kohti
8. Testiastian koko	10 l (vähintään)	2 l (vähintään)	5 l (vähintään)
9. Testiliuoksen tilavuus	8 l (vähintään)	1,5 l (vähintään)	4 l (vähintään)
10. Testiliuosten vaihto	Vähintään 6 kertaa päivässä	Vähintään 5 kertaa päivässä	Vähintään 5 kertaa päivässä
11. Testiorganismien ikä	Ks. 21 kohta.	Ks. 21 kohta.	Ks. 21 kohta.
12. Täysikasvuisen kalan arvioitu tuorepaino (g)	Naaraat: 1,5 ± 20 % Urokset: 2,5 ± 20 %	Naaraat: 0,35 ± 20 % Urokset: 0,35 ± 20 %	Naaraat: 0,65 ± 20 % Urokset: 0,4 ± 20 %
13. Kalojen lkm. testiastiaa kohti	6 (2 koirasta ja 4 naarasta)	6 (3 koirasta ja 3 naarasta)	10 (5 koirasta ja 5 naarasta)
14. Käsittelyjen lkm.	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)	= 3 (sekä asianmukaiset kontrollit)
15. Astioiden lkm. käsittelyä kohti	Vähintään 4	Vähintään 4	Vähintään 2
16. Kalojen lkm. testipitoisuutta kohti	16 täysikasvuista naarasta ja 8 koirasta (4 naarasta ja 2 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa)	12 täysikasvuista naarasta ja 12 koirasta (3 naarasta ja 3 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa)	10 täysikasvuista naarasta ja 10 koirasta (5 naarasta ja 5 koirasta jokaisessa rinnakkaisnäyteastiassa)
17. Ruokinta	Eläviä tai pakastettuja täysikasvuisia suolalehtijalkaisia tai niiden nauplius-toukkia 2–3 kertaa päivässä (*ad libitum*), kaupallisesti saatavaa rehua tai edellisten yhdistelmä	Suolalehtijalkaisten nauplius-toukkia 2–3 kertaa päivässä (*ad libitum*), kaupallisesti saatavaa rehua tai edellisten yhdistelmä	Suolalehtijalkaisten nauplius-toukkia 2–3 kertaa päivässä (*ad libitum*), kaupallisesti saatavaa rehua tai edellisten yhdistelmä

▼M7

18. Ilmastus	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta	Ei tarpeen, ellei liuenneen hapen pitoisuus ole alle 60 % ilman kyllästysarvosta
19. Laimennusvesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi
20. Esialtistusjakso	Suositus 7–14 vrk	Suositus 7–14 vrk	Suositus 7–14 vrk
21. Kemikaalialtistuksen kesto	21 vrk	21 vrk	21 vrk
22. Tutkittavat biologiset ominaisuudet	— eloonjäänti — käytös — hedelmällisyys — sekundaariset sukupuoliominaisuudet — vitellogeniini — valinnaisesti sukurauhasten histopatologia	— eloonjäänti — käytös — hedelmällisyys — sekundaariset sukupuoliominaisuudet — vitellogeniini — valinnaisesti sukurauhasten histopatologia	— eloonjäänti — käytös — hedelmällisyys — vitellogeniini — valinnaisesti sukurauhasten histopatologia
23. Testin hyväksyttävyys	Liuennut happi ≥ 60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 25 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.	Liuennut happi ≥ 60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 25 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.	Liuennut happi ≥ 60 % kyllästysarvosta; keskilämpötila 26 ± 2 °C; kontrollikalojen eloonjääneisyys 90 %; mitatut testipitoisuudet 20 %:n sisällä keskimääräisistä mitatuista arvoista käsittelytasoa kohti.

▼**M7**

Lisäys 3

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

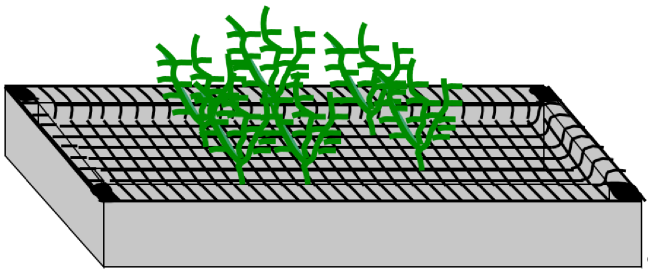
AINESOSA	PITOISUUDET
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

▼M7

Lisäys 4A

SEEPRAKALAN KUTUALUSTA

Kututarjotin: Lasinen instrumenttitarjotin (koko esimerkiksi 22 × 15 × 5,5 cm (p × l × s)), jonka päällä irrotettava ruostumaton teräsristikko (silmäkoko 2 mm). Ristikonon peitettävä instrumenttitarjotin hieman reunojen alapuolelta.



Kutualusta on kiinnitettävä ristikkoon. Kutualustaan on muodostettava rakenne, jolle kalat voivat siirtyä. Sopivia rakenteita ovat esimerkiksi vihreästä muovimateriaalista valmistetut keinotekoiset akvaariokasvit (huom. testikemikaalin adsorptio muovimateriaaliin on muistettava ottaa huomioon). Muovimateriaalia on huuhdeltava runsaassa lämpimässä vedessä riittävän kauan, jotta varmistetaan, ettei testiveteen joudu kemikaaleja. Lasimateriaaleja käytettäessä on varmistettava, etteivät kalat vahingoitu ja että niillä on riittävästi tilaa rajuihinkin liikkeisiin.

Tarjottimen ja lasilevyjen välisen etäisyyden on oltava vähintään kolme senttimetriä sen varmistamiseksi, ettei kuteminen tapahdu tarjottimen ulkopuolella. Tarjottimelle lasketut mätimunat putoavat ristikon läpi, ja ne voidaan kerätä näytteenottoa varten 45–60 minuutin kuluttua valojen sytyttämisestä. Läpinäkyvät mätimunat eivät ole tahmeita, ja ne on helppo laskea poikittaisvalossa. Kun astiassa on viisi naarasta, 20:tä mätimunaa päivässä voidaan pitää pienenä määränä, 100:aa mätimunaa kohtalaisena määränä ja yli 100:aa mätimunaa suurena määränä. Kutualusta on poistettava astiasta ja mätimunat on kerättävä joko mahdollisimman myöhään illalla tai erittäin varhain aamulla, ja alusta on laitettava sen jälkeen takaisin testiastiaan. Alusta on laitettava takaisin astiaan tunnin kuluessa sen poisottamisesta, sillä muutoin kutualusta saattaa houkutella kalat parittelemaan tai kutemaan yksilöllisesti epätavallisiin aikoihin. Jos tilanne vaatii kutualustan laittamista takaisin myöhemmin, se on tehtävä vähintään yhdeksän tunnin kuluttua valojen sytyttämisestä. Niin myöhäiseen vuorokaudenaikaan se ei aiheuta enää kutemista.

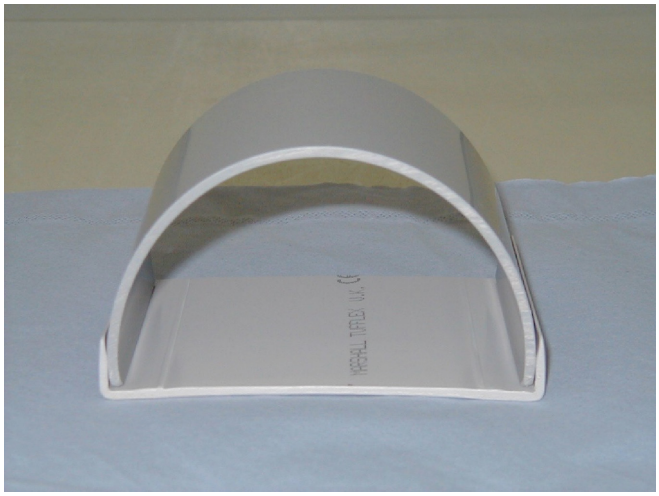
▼M7

Lisäys 4B

RASVAPÄÄMUDUN KUTUALUSTA

Jokaiseen testiastiaan asetetaan kaksi tai kolme muovista/keramiikasta/lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettua kutulaattaa ja -levyä (esimerkiksi 80 mm pitkä harmaa puoliympyrän muotoinen katos 130 mm pitkän huulletun levyn päälle) (ks. kuva). Asianmukaisesti katetut PVC- tai keramiikkalaatat ovat osoittautuneet sopiviksi kutualustoiksi (Thorpe ja muut 2007).

Laattoja kannattaa karhentaa hieman, jotta mätimunat kiinnittyvät niihin paremmin. Tarjotin on suojattava siten, etteivät kalat pääse laskettujen mätimunien luokse, ellei ole osoitettu, että munat kiinnittyvät käytettyyn alustaan pitävästi.



Alusta on suunniteltava siten, että kaikki mätimunat, jotka eivät kiinnity laatan pintaan ja putoaisivat muutoin astian pohjalle, jäävät sille (samoin kuin munat, jotka lasketaan suoraan sileälle muovialustalle). Kaikkia kutualustoja on huuhdeltava vähintään 12 tuntia laimennusvedessä ennen käyttöä.

Thorpe K. L., Benstead R., Hutchinson T. H., Tyler C. R. (2007), An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M7

Lisäys 5A

RASVAPÄÄMUDUN SEKUNDAARISTEN SUKUPUOLIOMINAISUUKSIEN ARVIOINTI TIETTYJEN HORMONIJÄRJESTELMÄÄN VAIKUTTAVIEN KEMIKAALIEN HAVAITSEMISEKSI

Yleiskatsaus

Hormonitoimintaa häiritsevien aineiden testauksessa mahdollisesti tärkeitä fyysiseen ulkonäköön liittyviä piirteitä täysikasvuisilla rasvapäämuduilla ovat väri (vaalea/tumma), värityskuviot (onko esimerkiksi pystysuoria raitoja vai ei), kalan muoto (pään ja rinnan alueen muoto, vatsan pullistuneisuus) sekä erikoistuneet sekundaariset sukupuoliominaisuudet (kutukyhmyjen lukumäärä ja koko, niskakyhmyn koko, munanasetin).

Kutukyhmyt sijaitsevat sukukypsien rasvapäämutukoiraiden päässä (niskakyhmyssä), ja ne ovat useimmiten järjestäytyneet molemmin puolin symmetriseksi kuvioksi (Jensen ja muut 2001). Kontrollinaarailla sekä nuorilla koirailla ja naarailla kyhmyt eivät ole kehittyneet (Jensen ja muut 2001). Koiraiden silmien ympärillä ja sierainten välissä voi olla jopa kahdeksan yksittäistä kyhmyä. Eniten kyhmyjä on kahdella samansuuntaisella viivalla heti sierainten alapuolella ja suun yläpuolella, ja ne ovat myös suurimpia kyhmyjä. Monilla kaloilla kyhmyryhmiä on alaleuan alapuolella. Suuta lähimpänä sijaitsee yleensä yksittäinen kyhmypari, kun taas lähempänä vatsapuolta voi olla jopa neljästä kyhmystä muodostuva sarja. Kyhmyjen todellinen määrä on harvoin yli 30 (vaihteluväli 18–28; Jensen ja muut, 2001). Useimmat kyhmyt (määrän kannalta) ovat yksittäisiä, pyöreähköjä rakenteita, joiden korkeus vastaa suurin piirtein niiden sädettä. Useimmilla sukukypsillä koirailla on ainakin joitakin kyhmyjä, jotka ovat siinä määrin laajentuneita ja korostuneita, ettei niistä voi erottaa yksittäisiä rakenteita.

Tietyntyyppiset hormonitoimintaa häiritsevät kemikaalit voivat aiheuttaa sen, että tiettyjä sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia alkaa esiintyä vastakkaisella sukupuolella. Esimerkiksi androgeenireseptorin agonistit, kuten 17α-metyylitestosteroni tai 17β-trenboloni, voivat aiheuttaa kutukyhmyjen kehittymisen rasvapäämutunaaraille (Smith 1974; Ankley ja muut 2001; 2003), kun taas estrogeenireseptorin agonistit saattavat vähentää koiraiden kutukyhmyjen määrää tai pienentää niiden kokoa (Miles-Richardson ja muut 1999; Harries ja muut 2000).

Jäljempänä on kuvaus rasvapäämutujen kutukyhmyjen luonnehdinnasta, joka perustuu Yhdysvaltain ympäristönsuojeluviraston laboratoriossa (Duluth, MN) käytettyihin menettelyihin. Tietyt tuotteet ja/tai laitteet voidaan korvata saatavilla olevilla samantyyppisillä materiaaleilla.

Kalojen tutkimisessa on parhainta käyttää valollista suurennuslasia tai valollista dissektiomikroskooppia (3X). Tutki kalaa selkäpuolelta ja siten, että sen etupää on eteenpäin (pää tutkijaa kohti).

— Aseta kala pieneen petrimaljaan (halkaisija esimerkiksi 100 mm) etupää eteenpäin ja vatsapuoli alaspäin. Tarkenna etsintä, jotta pystyt tunnistamaan kyhmyt. Käännä kalaa varovasti ja hitaasti puolelta toiselle kyhmyalueiden tunnistamiseksi. Laske ja pisteytä kyhmyt.

— Tutki myös pään pinta vatsapuolelta asettamalla kala petrimaljaan selkäpuoli alaspäin etupää eteenpäin.

— Jokaisen kalan tutkimus on tehtävä kahdessa minuutissa.

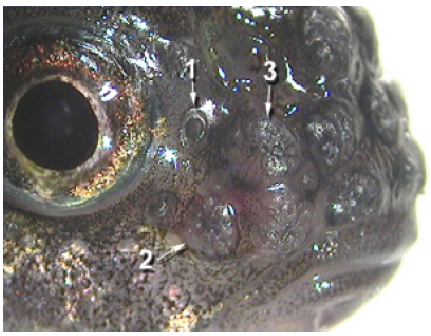
▼M7

Kyhmyjen laskeminen ja arviointi

Täysikasvuisilta rasvapäämuduilta on tunnistettu kuusi aluetta, joilla kyhmyjen esiintymistä ja kehittymistä voidaan arvioida. On laadittu myös malli, johon kyhmyjen sijainti ja lukumäärä voidaan merkitä (ks. tämän lisäyksen loppu). Kyhmyjen lukumäärä merkitään muistiin, ja niiden kokoa voidaan arvioida määrällisesti seuraavasti: 0 – ei kyhmyjä, 1 – kyhmyjä, 2 – laajentuneita kyhmyjä ja 3 – korostuneita kyhmyjä kunkin organismin osalta (kuva 1).

Luokka 0 – kyhmyjä ei ole. Luokka 1 – kyhmyjä: tähän luokkaan kuuluvat kaikki kyhmyt, joissa on yksi piste, jonka korkeus on miltei sama kuin sen säde. Luokka 2 – laajentuneita kyhmyjä: Tähän luokkaan kuuluu sellainen kudos, jonka ulkonäkö muistuttaa asteriskia. Tällaisessa kyhmyssä on yleensä laaja säteittäinen pohja, jossa on keskeltä reunoille päin suuntautuvia uria tai vakoja. Kyhmyn huippu on usein muita epätasaisempi, mutta joskus se voi olla myös hieman pyöristynyt. Luokka 3 – korostunut: Tähän luokkaan kuuluvat kyhmyt ovat tavallisesti varsin suuria ja pyöreitä, ja niiden rakenne on muita epäselvempi. Toisinaan tällaiset kyhmyt yhtyvät muodostaen yhtenäisen massan yhdelle alueelle tai useammalle alueelle (B, C ja D, kuvattu jäljempänä). Kyhmyjen väri ja muoto vastaavat luokkaa 2, mutta joskus ne ovat melko epämääräisiä. Tätä arviointimenetelmää käyttämällä kyhmyjen kokonaispistemäärä on yleensä < 50 normaalilla kontrollikoiraalla, jolla on 18–20 kutukyhmyä (Jensen ja muut 2001).

Kuva 1



Joidenkin kalojen kutukyhmyjen todellinen määrä voi olla suurempi kuin mallin ruuduissa tietyllä pisteytysalueella. Jos näin on, pisteytysnumeroita voi lisätä laatikon oikealle tai vasemmalle puolelle. Mallin ei siis tarvitse näyttää symmetriseltä. Toinen tapa merkitä muistiin parilliset kyhmyt tai sellaiset kyhmyt, jotka ovat yhtyneet pystysuunnassa yhteen suun vaakasuuntaista tasoa pitkin, on merkitä yhteen ruutuun kahdet arviointipisteet.

Merkitsemisalueet:

A – Silmän ympärillä sijaitsevat kyhmyt. Merkitään selkäpuolelta vatsan puolelle silmän etureunan ympäriltä. Sukukypsillä kontrollikoirailla näitä on tavallisesti useita; kontrollinaarailla näitä ei ole; androgeeneille altistuneilla naarailla on yleensä yksi pari kyhmyjä (yksi kummankin silmän lähellä) tai yksittäinen kyhmy.

B-Sierainten (aistikanavahuokosten) välissä sijaitsevat kyhmyt. Kontrollikoirailla ne ovat yleensä parilliset, kehittyneet ylemmän luokituksen (2 – laajentuneet kyhmyt tai 3 – korostuneet kyhmyt) mukaan. Kontrollinaarailla näitä kyhmyjä ei ole; androgeeneille altistuneilla naarailla niitä voi esiintyä ja kehittyä jonkin verran.

C – Sierainten edessä suun vieressä sijaitsevat kyhmyt. Sukukypsillä kontrollikoirailla ne ovat yleensä laajentuneet tai korostuneet. Nuoremmilla koirailla tai androgeenikäsitellyillä naarailla näitä esiintyy, voivat olla laajentuneita.

▼M7

D – Suulinjan suuntaisesti sijaitsevat kyhmyt. Arvioidaan yleensä kehittyneiksi kontrollikoirailla. Näitä kyhmyjä ei ole kontrollinaarailla, kun taas androgeeneille altistuneilla naarailla niitä on.

E – Alaleuassa suun lähellä sijaitsevat kyhmyt, jotka ovat yleensä pieniä ja tavallisesti pareittain. Niitä esiintyy vaihtelevasti kontrollikoirailla tai käsitellyillä koirailla sekä käsitellyillä naarailla.

F – Alaleuassa E:stä vatsaan päin sijaitsevat kyhmyt, jotka ovat yleensä pieniä ja tavallisesti pareittain. Niitän esiintyy kontrollikoirailla ja androgeeneille altistuneilla naarailla.

VIITTEET

(1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J., Makynen, M. E. (2001), Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20:1276–1290.

(2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J, Hornung, M. W., Henry, T. R, Denny, J. S., Leino, R. L, Wilson, V. S, Cardon, M. C, Hartig, P. C, Gray, E. L. (2003), Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow *Environ Toxicol Chem* 22:1350–1360.

(3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A., Maddix, S., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. (2000), Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas), Environ Sci Technol* 34:3003–3011.

(4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S., Ankley, G. T. (2001), Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas), Comp Biochem Physiol C* 128:127–141.

(5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J., Ankley, G. T. (2001), Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow, *J Fish Biol* 59:515–523.

(6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J., Giesy, J. P. (1999), Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas), Aquat Toxicol* 47:129–145.

(7) Smith R. J. F. (1974), Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031–1038.

Kyhmyjen kirjaamismalli:

Tunniste _____

Päiväys _____

Kokonaispistemäärä ____

Numeerinen pisteytys

1 – esiintyy

2 – laajentuneet

3 – korostuneet

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

		E	**X1**	**X1**	
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M7

Lisäys 5B

MEDAKAN SEKUNDAARISTEN SUKUPUOLIOMINAISUUKSIEN ARVIOINTI TIETTYJEN HORMONIJÄRJESTELMÄÄN VAIKUTTAVIEN KEMIKAALIEN HAVAITSEMISEKSI

Jäljempänä on kuvaus sukuelinpapilleista ([1]), jotka ovat sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia medakalla (*Oryzias latipes*).

(1) Maksan poistamisen (lisäys 6) jälkeen kalan ruumis asetetaan kartiomaiseen putkeen (pää ylöspäin, pyrstö alaspäin), joka sisältää noin 10 ml 10-prosenttista neutraalia puskuroitua formaliinia. Jos sukurauhanen on kiinnitetty muuhun kuin 10-prosenttisella neutraalilla puskuroituun formaliiniin, leikkaa ruumis partaterällä poikittain peräevän etuosan ja peräaukon välistä varovasti, jotta gonopori ja sukurauhanen eivät vaurioidu (kuva 3). Laita kalan ruumiin kallonpuoleinen osa kiinnitysliuokseen sukurauhasen säilömiseksi ja pyrstönpuoleinen osa 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin edellä kuvatun mukaisesti.

(2) Kun kalan ruumis on laitettu 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin, tartu peräevän etuosaan pinseteillä ja pidä sitä taitettuna noin 30 sekunnin ajan, jotta peräevä pysyy auki. Kun tartut peräevään pinseteillä, käsittele etuosan eväpoimuja varovasti, jotta sukuelinpapillit eivät vaurioidu.

(3) Kun peräevä on ollut auki noin 30 sekunnin ajan, laita kalan ruumis 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin ja säilytä sitä huoneenlämmössä sukuelinpapillien mittaukseen saakka (mittaus on tehdaan, kun kiinnityksestä on kulunut vähintään 24 tuntia).

Mittaus

(1) Kun kalan ruumis on ollut kiinnitettynä 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin vähintään 24 tuntia, ota se pois kartiomaisesta putkesta ja pyyhi formaliini suodatinpaperiin (tai paperipyyhkeeseen).

(2) Aseta kala pöydälle vatsapuoli ylöspäin. Irrota peräevä varovasti pienillä dissektiosaksilla (peräevä kannattaa leikata siten, että sen mukana tulee myös hieman rintaevän tukiluuta).

(3) Tartu irrotetun peräevän etuosaan pinseteillä ja aseta muutamin vesitipoin kostutetulle lasilevylle. Peitä peräevä peitinlasilla. Kun tartut peräevään pinseteillä, ole varovainen, etteivät sukuelinpapillit vaurioidu.

(4) Laske niiden liitoslevyjen määrä, joissa on sukuelinpapilleja, käyttämällä biomikroskoopin näytetasoa (pystymikroskooppi tai käänteismikroskooppi). Sukuelinpapillit ovat tunnistettavissa liitoslevyn takaosassa näkyvästä pienestä papillimuodostelmasta. Merkitse kunkin eväpoimun liitoslevyssä olevien sukuelinpapillien määrä lomakkeeseen (ts. ensimmäinen eväpoimu: 0,

([1]) Sukuelinpapilleja on yleensä vain täysikasvuisilla koirailla, ja ne sijaitsevat toisen ja seitsemännen tai kahdeksannen eväpoimun välissä peräevän takapäästä laskettuna (kuvat 1 ja 2). Papilleja on kuitenkin harvoin peräevän takapäästä katsottuna ensimmäisessä eväpoimussa. Tämä menettelytapaohje kattaa ensimmäisessä eväpoimussa olevien papillien mittauksen (tässä ohjeessa eväpoimun numero tarkoittaa poimujen järjestystä peräevän takapäästä katsottuna).

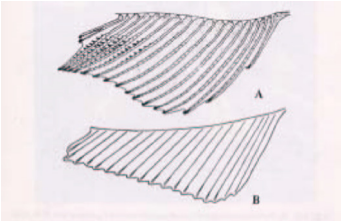
▼M7

toinen eväpoimu: 10, kolmas eväpoimu: 12 jne.) ja kirjoita kokonaislukumäärä Excel-työkirjaan kunkin yksittäisen kalan osalta. Ota peräevästä tarvittaessa valokuva ja laske siitä niiden liitoslevyjen lukumäärä, joissa on sukuelinpapilleja.

(5) Laita peräevä mittauksen jälkeen 1 kohdassa kuvattuun kartioputkeen ja varastoi se.

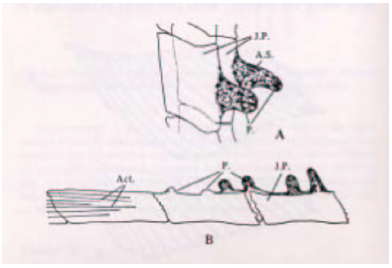
Kuva 1.

Piirros, josta näkee peräevän muotoon ja kokoon liittyvät sukupuolierot. A, uros; B, naaras. Oka, T. B. (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



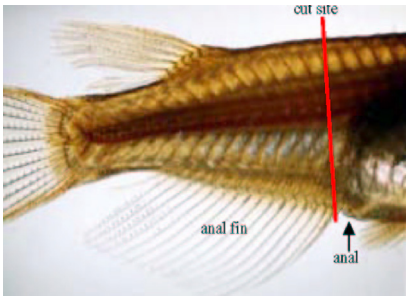
Kuva 2.

A: Peräevän eväpoimun liitoslevyissä olevia sukuelinpapilleja. J.P. = liitoslevy; A.S. = aksiaalinen väli; P. = papilli. B: Eväpoimun distaalinen pää. Actinotrichium-säikeet (Act.) ovat kärjessä. Oka, T. B. (1931), On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.



Kuva 3.

Kuva kalan ruumiista, jossa näkyy leikkauskohta, kun sukurauhanen on kiinnitetty muulla kuin 10-prosenttisella neutraalilla puskuroidulla formaliinilla. Tässä tapauksessa jäljellä oleva ruumis leikataan kahtia peräevän etuosan ja peräaukon välistä partaterällä (punainen viiva). Kalan ruumiin päänpuoleinen osa laitetaan sukurauhasen kiinnitysliuokseen ja pyrstöosa 10-prosenttiseen neutraaliin puskuroituun formaliiniin.



▼M7

Lisäys 6

SUOSITELLUT NÄYTTEENOTTOMENETELMÄT VITELLOGENIININALYYSIA VARTEN

Näytteenotossa on oltava huolellinen koiraiden ja naaraiden vitellogeniininäytteiden välisen ristikontaminaation välttämiseksi.

Menetelmä 1A: Rasvapäämutu, verinäytteen otto pyrstösuonesta

Nukutuksen jälkeen pyrstö leikataan osittain auki skalpellilla ja verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriittikapillaariputkeen. Kun verinäyte on otettu, plasma eristetään nopeasti sentrifugoimalla näytettä kolme minuuttia g-arvolla 15 000 (tai 4 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia g-arvolla 15 000). Haluttaessa hematokriittien prosenttiosuus voidaan määrittää sentrifugoinnin jälkeen. Sen jälkeen plasma poistetaan mikrohematokriittiputkesta ja sitä säilytetään – 80 °C:n lämpötilassa sentrifugiputkessa, jossa on 0,13 yksikköä aprotiniinia (proteaasin estäjää), siihen saakka, kunnes vitellogeniinimääritys voidaan tehdä. Rasvapäämudun (sukupuolen mukaan määräytyvän) koon mukaan kerättävä plasmamäärä on yleensä 5–60 mikrolitraa kalaa kohti (Jensen ja muut 2001).

Menetelmä 1B: Rasvapäämutu, verinäytteen otto sydämestä

Verinäyte voidaan ottaa vaihtoehtoisesti myös sydänpunktiolla, jossa käytetään heparinisoitua ruiskua (1 000 yksikköä hepariinia millilitrassa). Veri siirretään Eppendorf-putkiin (jotka pidetään jäällä) ja sentrifugoidaan (5 minuuttia, g-arvo 7 000, huonelämpötila). Plasma on siirrettävä puhtaisiin Eppendorf-putkiin (alikvooteissa, jos se on plasman tilavuuden perusteella mahdollista) ja jäädytettävä nopeasti – 80 °C:seen, jossa sitä säilytetään analysointiin saakka (Panter ja muut 1998).

Menetelmä 2A: Medaka, maksan poisto

Kalan ottaminen pois testiastiasta

(1) Kala otetaan pois testiastiasta pienen haavin avulla. Ole varovainen, ettei kala putoa muihin testiastioihin.

(2) Periaatteessa kalat on otettava pois astioista seuraavassa järjestyksessä: kontrolli, liuotinkontrolli (tarvittaessa), pienin pitoisuus, keskisuuri pitoisuus, suurin pitoisuus ja positiivinen kontrolli. Lisäksi kaikki koiraat on otettava pois kustakin testiastiasta ennen naaraita.

(3) Kunkin kalan sukupuoli on tunnistettavissa ulkoisten sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien (kuten peräevän muodon) perusteella.

(4) Laita kala kuljetussäiliöön ja vie se työpisteeseen, jossa maksan poisto tehdään. Tarkista testiastian ja kuljetussäiliön merkintöjen oikeellisuus, jotta voit vahvistaa, että testiastiasta otettujen ja siihen jääneiden kalojen lukumäärät ovat odotuksenmukaisia.

(5) Jos kalan sukupuolta ei voi määrittää ulkonäön perusteella, ota kaikki kalat pois testiastiasta. Tässä tapauksessa sukupuoli on määritettävä tutkimalla sukurauhasia tai sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia stereomikroskoopilla.

Maksan poistaminen

(1) Siirrä kala kuljetussäiliöstä nukutusliuokseen pienen haavin avulla.

▼**M7**

(2) Kun kala on nukutettu, siirrä se suodatinpaperin (tai paperipyyhkeen) päälle (tavallisilla) pinseteillä. Tartu pinseteillä kalaan sen pään molemmin puolin, jotta pyrstöosa ei rikkoonnu.

(3) Kuivaa kalan pinta vedestä suodatinpaperiin (tai paperipyyhkeeseen).

(4) Aseta kala pöydälle vatsapuoli ylöspäin. Tee sen jälkeen dissektiosaksilla pieni poikittainen viilto vatsan puolelle kaulan alueen ja vatsan keskiosan väliin.

(5) Laita dissektiosakset pienen viillon sisään ja avaa vatsa keskiviivaa pitkin kiduskannen pyrstönpuoleisesta päästä peräaukon kallonpuoleiseen päähän. Varo työntämästä saksia liian syvälle, jotta maksa ja sukurauhanen eivät vaurioidu.

(6) Tee seuraavat toimenpiteet stereomikroskoopin avulla.

(7) Laita kala vatsapuoli ylöspäin paperipyyhkeen päälle (myös lasista petrimaljaa tai lasista näytelevyä voi käyttää).

(8) Levitä vatsaontelon seinämiä tarkkuuspinseteillä, jotta saat sisäelimet esiin. Sisäelimet voi ottaa esiin myös poistamalla toisen puolen vatsaontelon seinämästä, jos tarpeen.

(9) Ota maksan ja sappirakon yhtyneet osat esiin käyttämällä toista tarkkuuspinsettiparia. Tartu sappitiehen ja leikkaa sappirakko irti. Ole varovainen, jotta sappirakko ei mene rikki.

(10) Tartu sen jälkeen ruokatorveen ja leikkaa ruoansulatuskanava irti maksasta samalla tavalla. Ole varovainen, jotta ruoansulatuskanavan sisältö ei vuoda ulos. Irrota ruoansulatuskanavan pyrstönpuoleinen osa peräaukosta ja ota kanava pois vatsaontelosta.

(11) Poista rasva ja muut kudokset maksan reunoilta. Varo naarmuttamasta maksaa.

(12) Tartu maksan porttialueeseen tarkkuuspinseteillä ja ota maksa pois vatsaontelosta.

(13) Aseta maksa näytelevylle. Poista tarvittaessa maksan pinnalta tarkkuuspinseteillä kaikki mahdollinen rasva ja ulkopuoliset kudokset (esimerkiksi vatsakalvo).

(14) Punnitse maksa elektronisella analyysivaa'alla käyttäen 1,5 ml:n mikroputkea taarana. Merkitse paino lomakkeeseen (lukema: 0,1 mg). Varmista, että mikroputken etiketissä on oikeat tiedot.

(15) Sulje maksan sisältävä mikroputki tulpalla. Aseta putki jäähdytystelineeseen (tai jäätelineeseen).

(16) Kun yhdeltä kalalta on poistettu maksa, puhdista dissektiovälineet tai vaihda ne puhtaisiin.

▼M7

(17) Poista maksa kaikilta kuljetussäiliössä olevilta kaloilta edellä kuvatulla tavalla.

(18) Kun kaikilta kuljetussäiliön kaloilta (ts. kaikilta testiastian koirailta tai naarailta) on poistettu maksa, laita kaikki maksanäytteet putkitelineeseen, varmista, että putkissa on tunniste-etiketit ja laita putkiteline sen jälkeen pakastimeen. Jos maksat toimitetaan esikäsittelyyn heti niiden irrottamisen jälkeen, näytteet on kuljetettava seuraavaan työpisteeseen jäähdytystelineessä (tai jäätelineessä).

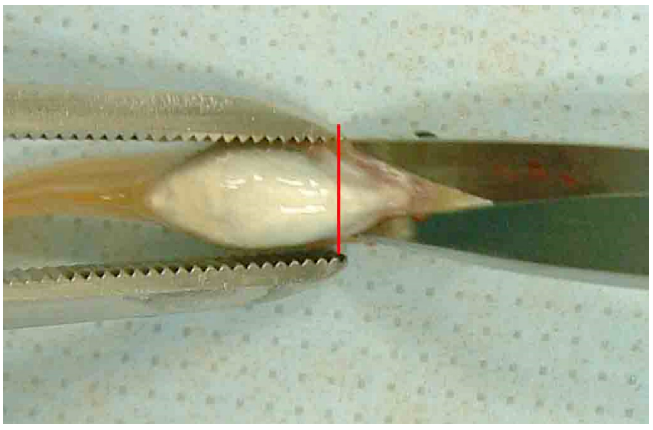
Maksan irrottamisen jälkeen kalan ruumiista voi tutkia sukurauhasten histopatologian ja mitata sekundaariset sukupuoliominaisuudet.

Näyte

Säilytä kaloilta otetut maksanäytteet – 70 °C:n lämpötilassa, jos niitä ei käytetä esikäsittelyyn pian irrottamisen jälkeen.

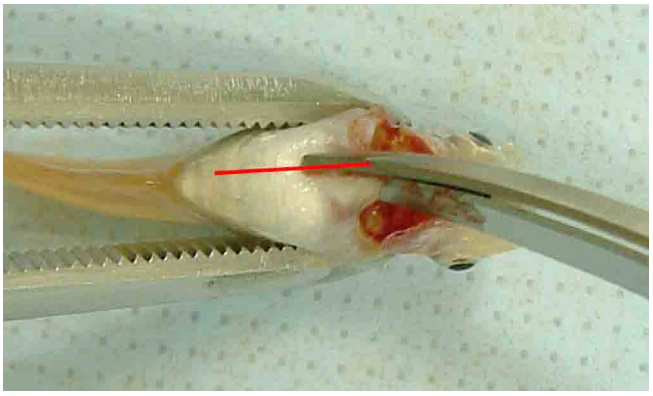
Kuva 1

Viilto tehdään saksilla aivan rintaevien edestä.



Kuva 2

Vatsan keskiviiva leikataan saksilla auki pisteeseen, joka sijaitsee noin kaksi millimetriä kallosta peräaukkoon päin.



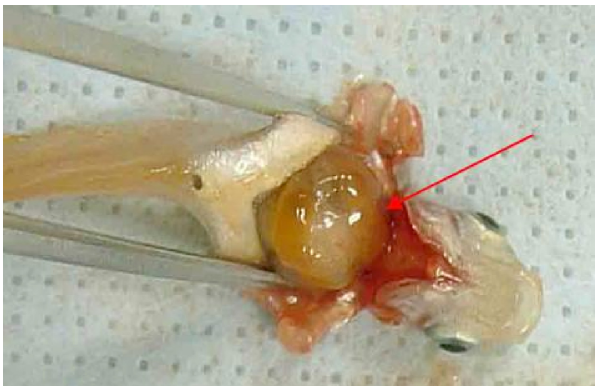
▼M7

Kuva 3

Vatsaontelon seinämät levitetään pihdeillä, jotta maksa ja muut sisäelimet saadaan esiin.

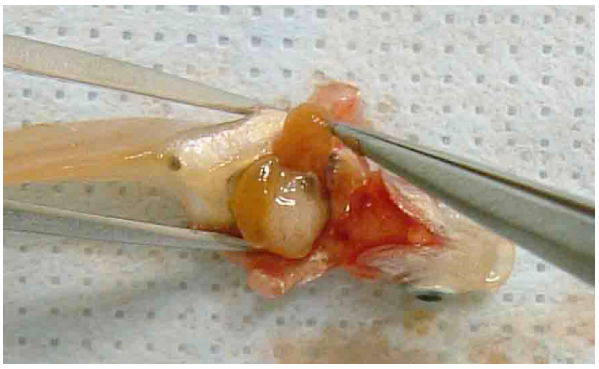
(Vaihtoehtoisesti seinämät voidaan kiinnittää sivuille.)

Nuoli osoittaa maksaa.



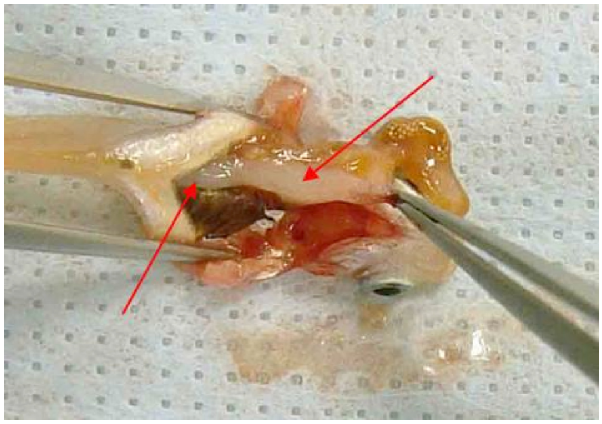
Kuva 4

Maksa leikataan irti suoraan ja otetaan pois pihdeillä.



Kuva 5

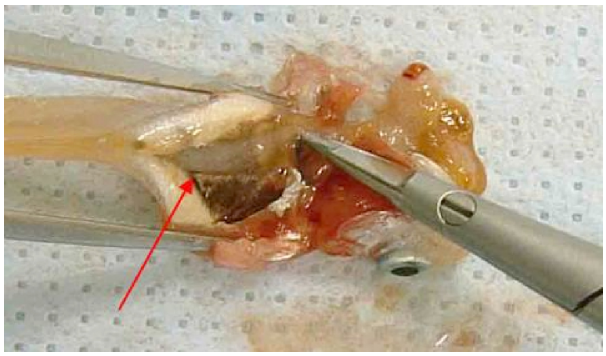
Sisäelimet irrotetaan varovasti pihdeillä.



▼M7

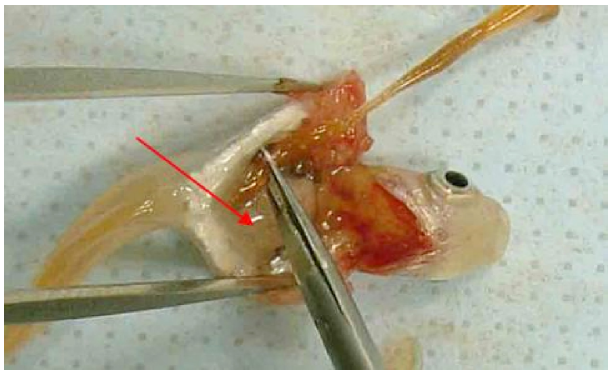
Kuva 6

Sisäelinten molemmat päät ja mahdolliset suoliliepeen kiinnikkeet leikataan irti saksilla.



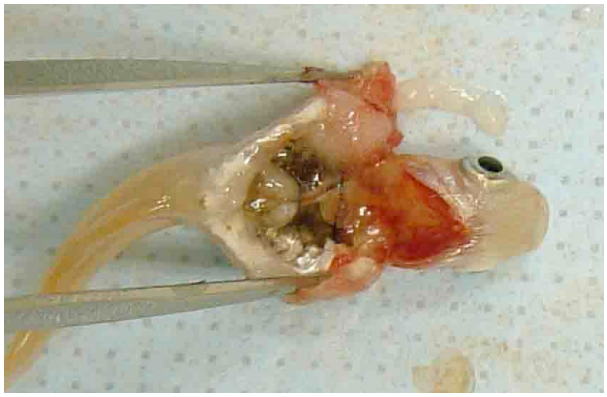
Kuva 7 (naaras)

Menettely on naaraiden osalta samanlainen.



Kuva 8

Toimenpide on valmis.



▼M7

Menetelmä 2 B: Medaka (*Oryzias latipes*), maksan esikäsittely vitellogeniinialyysia varten

Ota homogenaattipuskuria sisältävä pullo ELISA-pakkauksesta ja jäähdytä se jäämurskalla (liuoksen lämpötila: ≤ 4 °C). Jos käytetään EnBio ELISA -järjestelmän homogenaattipuskuria, sulata liuos huoneenlämmössä ja jäähdytä pullo sen jälkeen jäämurskalla.

Laske tarvittavan homogenaattipuskurin määrä maksan painon perusteella (lisää 50 µl homogenaattipuskuria maksan painomilligrammaa kohti). Esimerkki: jos maksa painaa 4,5 mg, tarvittavan homogenaattipuskurin määrä on 225 µl. Tee luettelo kutakin maksaa varten tarvittavan homogenaattipuskurin määrästä.

Maksan valmistelu esikäsittelyä varten

(1) Ota maksan sisältävä 1,5 ml:n putki pakastimesta juuri ennen esikäsittelyä.

(2) Koiraiden maksojen esikäsittely on tehtävä ennen naaraiden maksojen käsittelyä vitellogeniinikontaminaation välttämiseksi. Lisäksi testiryhmät esikäsitellään seuraavassa järjestyksessä: kontrolli, liuotinkontrolli (tarvittaessa), pienin pitoisuus, keskisuuri pitoisuus, suurin pitoisuus ja positiivinen kontrolli.

(3) Pakastimesta ei saa ottaa enempää maksanäytteitä sisältäviä 1,5 ml:n mikroputkia kuin yhdellä kerralla voidaan sentrifugoida.

(4) Laita näytteet sisältävät 1,5 ml:n mikroputket jäätelineeseen näytenumeroiden mukaiseen järjestykseen (maksanäytteitä ei tarvitse sulattaa).

Esikäsittely

1) Homogenaattipuskurin lisääminen

Tarkista luettelosta, kuinka paljon homogenaattipuskuria kutakin maksanäytettä kohti on käytettävä ja säädä mikropipetti (vaihteluväli: 100–1 000 µl) tarvittavan määrän mukaisesti. Kiinnitä mikropipettiin puhdas kärki.

Ota homogenaattipuskuri reagenssipullosta ja lisää puskuri maksanäytteen sisältävään 1,5 ml:n mikroputkeen.

Lisää edellä kuvatun menettelyn mukaisesti homogenaattipuskuri kaikkiin 1,5 ml:n mikroputkiin, jotka sisältävät maksanäytteen. Mikropipettiin ei tarvitse vaihtaa välillä uutta kärkeä, paitsi jos kärki kontaminoituu tai jos epäilet sen kontaminoituneen.

2) Maksan homogenisointi

— Kiinnitä mikroputkihomogenisaattoriin uusi homogenisointipää.

— Työnnä pää 1,5 ml:n mikroputkeen. Pidä homogenisaattoria siten, että maksa puristuu pään pinnan ja 1,5 ml:n mikroputken seinän väliin.

— Käytä homogenisaattoria 10–20 sekunnin ajan. Jäähdytä 1,5 ml:n mikroputkea jäämurskalla toimenpiteen ajan.

▼M7

— Nosta homogenisointipää 1,5 ml:n mikroputkesta ja anna sen levätä noin 10 sekuntia. Tarkasta suspension tila sen jälkeen silmämääräisesti.

— Jos suspensiossa näkyy maksan palasia, toista vaiheet 3 ja 4 hyväksyttävän maksahomogenaatin saamiseksi.

— Jäähdytä suspendoitua maksahomogenaattia jäätelineessä sentrifugointiin saakka.

— Vaihda homogenisaattoriin uusi pää jokaista homogenaattia varten.

— Homogenisoi kaikki maksat homogenaattipuskurilla edellä kuvatun menetelmän mukaisesti.

3) Suspendoidun maksahomogenaatin sentrifugointi

— Tarkista, että jäähdyttävän sentrifugikammion lämpötila on 5 °C.

— Laita suspendoidun maksahomogenaatin sisältävät 1,5 ml:n mikroputket jäähdyttävään sentrifugiin (säädä tasapaino tarvittaessa).

— Sentrifugoi suspendoituja maksahomogenaatteja 5 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia g-arvolla 13 000. Jos supernatanttien erottelu on kuitenkin riittävä, keskipakoisvoimaa ja sentrifugointiaikaa voi tarvittaessa säätää.

— Tarkista sentrifugoinnin jälkeen, että supernatanttien erottelu on riittävä (pintakerros: lipidit, välikerros: supernatantti, pohjakerros: maksakudos). Jos erottelu ei ole riittävä, sentrifugoi suspensio uudestaan samoissa olosuhteissa.

— Ota kaikki näytteet pois jäähdyttävästä sentrifugista ja aseta ne jäätelineeseen näytenumeron mukaiseen järjestykseen. Varo suspendoimasta eroteltuja kerroksia uudestaan sentrifugoinnin jälkeen.

4) Supernatantin kerääminen

— Laita putkitelineeseen neljä 0,5 ml:n mikroputkea supernatantin säilyttämistä varten.

— Ota mikropipetillä 30 µl jokaisesta supernatantista (joka on eroteltu välikerrokseen) ja tyhjennä määrä yhteen 0,5 ml:n mikroputkeen. Varo keräämästä pintakerroksessa olevia lipidejä tai pohjakerroksessa olevaa maksakudosta.

— Kerää supernatantti ja tyhjennä se kahteen muuhun 0,5 ml:n mikroputkeen edellä kuvatulla tavalla.

— Kerää loput supernatantista mikropipetillä (jos mahdollista: ≥ 100 µl). Tyhjennä tämä määrä neljänteen 0,5 ml:n mikroputkeen. Varo keräämästä pintakerroksessa olevia lipidejä tai pohjakerroksessa olevaa maksakudosta.

— Sulje 0,5 ml:n mikroputkien päät tulpalla ja kirjoita supernatantin määrä etikettiin. Jäähdytä mikroputket välittömästi jäätelineessä.

— Vaihda mikropipettiin uusi kärki jokaista supernatanttia varten. Jos kärkeen kiinnittyy suuri määrä lipidejä, vaihda se uuteen välittömästi, jotta rasva ei kontaminoi maksanäytettä.

▼M7

— Tyhjennä kaikki sentrifugoidut supernatantit neljään 0,5 ml:n mikroputkeen edellä kuvatulla tavalla.

— Kun olet tyhjentänyt supernatantin 0,5 ml:n mikroputkiin, laita kaikki etiketöidyt putket putkitelineeseen ja pakasta ne välittömästi. Jos vitellogeniinipitoisuudet mitataan välittömästi esikäsittelyn jälkeen, pidä yksi 0,5 ml:n mikroputki (joka sisältää 30 µl supernatanttia) jäähdytettynä putkitelineessä ja vie se siihen työpisteeseen, jossa ELISA-määritys tehdään. Laita muut mikroputket putkitelineisiin ja pakasta ne.

— Hävitä jäämät supernatantin keräämisen jälkeen asianmukaisesti.

Näytteiden säilytys

Säilytä maksahomogenaatin supernatanttia sisältävät 0,5 ml:n mikroputket – 70 °C:ssa siihen saakka, kun niitä käytetään ELISA-määrityksessä.

Menetelmä 3A: Seeprakala, verinäytteen otto pyrstösuonesta

Pyrstöön tehdään välittömästi nukutuksen jälkeen poikittainen viilto, ja verinäyte otetaan pyrstösuonesta heparinisoituun mikrohematokriittikapillaariputkeen. Verimäärä vaihtelee 5–15 mikrolitraan kalan koon mukaan. Mikrokapillaariputkeen lisätään sama määrä aprotiniinipuskuria (6 mikrogrammaa/ml fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa), ja plasma erotellaan verestä sentrifugoimalla (5 minuuttia g-arvolla 600). Plasma kerätään koeputkiin ja varastoidaan – 20 °C:ssä siihen saakka, kunnes siitä analysoidaan vitellogeniini tai muut tutkittavat proteiinit.

Menetelmä 3B: Seeprakala, verinäytteen otto sydänpunktiolla

Veren koaguloitumisen ja proteiinin hajoamisen välttämiseksi näytteet otetaan fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen, joka sisältää hepariinia (1 000 yksikköä/ml) ja proteaasin estäjää, aprotiniinia (2 TIU/ml). Hepariini-ammoniumsuola ja kylmäkuivattu aprotiniini ovat puskurin suositeltavia ainesosia. Näytteenotossa suositellaan käytettäväksi ruiskua (1 ml) ja kiinteää ohutneulaa (esimerkiksi Braun Omnikan-F). Ruisku on esitäytettävä puskurilla (noin 100 mikrolitraa), jotta jokaisen kalan pieni verimäärä voidaan eluoida kunnolla. Verinäytteet otetaan sydänpunktiolla. Ensin kala on nukutettava MS-222:lla (100 mg/l). Kun anestesian taso on asianmukainen, näytteenottaja voi erottaa seeprakalan sydämensykkeen. Pidä ruiskun mäntä pienen paineen alaisena, kun punktoit sydäntä. Kerättävän veren määrä on 20–40 mikrolitraa. Sydänpunktion jälkeen veri-puskuriseos on laitettava koeputkeen. Plasma erotellaan verestä sentrifugoimalla (20 minuuttia; g-arvo 5 000), ja sitä on säilytettävä – 80 °C:ssa analysointiin saakka.

Menetelmä 3C: Menettelytapaohje – seeprakala, pään ja pyrstön homogenisointi

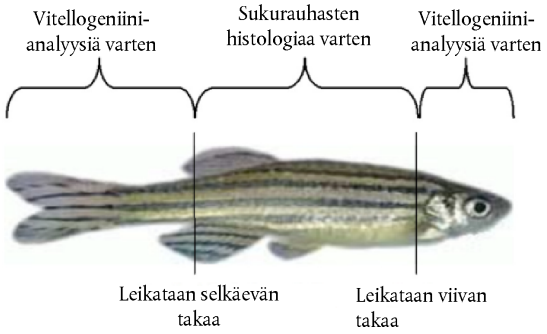
1. Kalat nukutetaan ja lopetetaan testikuvauksen mukaisesti.

2. Kalan pää ja pyrstö leikataan kuvassa 1 näkyvällä tavalla.

Tärkeää: *Kaikki dissektiovälineet ja leikkauspöytä on huuhdeltava ja puhdistettava kunnolla (esimerkiksi 96-prosenttisella etanolilla) jokaisen kalan käsittelyn jälkeen, jotta naaraiden tai niiden koiraiden, joille kemikaali on aiheuttanut vaikutuksia, vitellogeniini ei saastuta terveitä koiraita.*

▼**M7**

Kuva 1



3. Jokaisen kalan pään ja pyrstön yhteispaino punnitaan lähimpään milligrammaan.

4. Punnituksen jälkeen kalan osat laitetaan asianmukaisiin putkiin (esimerkiksi 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin) ja jäädytetään – 80 °C:seen, jossa niitä säilytetään homogenisointiin saakka. Ne voidaan myös homogenisoida suoraan jäällä kahdella muovisurvimella. (Myös muita menetelmiä voi käyttää, jos ne tehdään jäällä ja lopputuloksena on homogeeninen massa.) Tärkeää: *Putket on numeroitava asianmukaisesti, jotta yhden kalan pää ja pyrstö voidaan yhdistää siihen ruumiinosaan, jota käytetään sukurauhasen histologisessa tutkimuksessa.*

5. Kun homogeeninen massa on valmis, siihen lisätään neljä kertaa kudoksen painon verran jääkylmää **homogenisointipuskuria** ([1]). Jatka työskentelyä survimilla, kunnes seos on homogeeninen. Tärkeä huomautus: *Jokaiselle kalalle käytetään uusia survimia.*

6. Näytteet laitetaan jäälle siihen saakka, kunnes ne sentrifugoidaan **4 °C:ssa** (g-arvo 50 000) 30 minuutin ajan.

7. Laita pipetillä 20 µl:n supernatanttiannoksia **vähintään kahteen** putkeen upottamalla pipetin kärki pinnan rasvakerroksen läpi ja vetämällä varovasti supernatanttia pipettiin ilman rasva- tai pellettifraktioita.

8. Putkia säilytetään – 80 °C:ssa siihen saakka, kunnes niitä käytetään.

([1]) Homogenisointipuskuri:
— (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1-prosenttinen proteaasinestäjäsekoitus (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteaasinestäjäsekoitusta
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), valmistaja esimerkiksi Bie & Berntsen, Tanska
— proteaasinestäjäsekoitus: Sigman (nisäkkäiden kudoksille tarkoitettu) tuote nro P 8340

Huomaa: Homogenisointipuskuri on käytettävä samana päivänä kuin se valmistetaan. Pidä puskuri jäällä käytön aikana.

▼M7

Lisäys 7

VITELLOGENIININ RIKASTUSNÄYTTEET JA MÄÄRITYSTEN VÄLINEN VERTAILUAINE

Niinä päivinä, kun tehdään vitellogeniinimäärityksiä, analysoidaan myös rikastusnäyte käyttämällä määritysten välistä vertailuainetta. Määritysten välisen vertailuaineen valmistamisessa käytettävä vitellogeniini on peräisin eri erästä kuin se, jota käytettiin tehtävän määrityksen kalibrointistandardien tekemiseen.

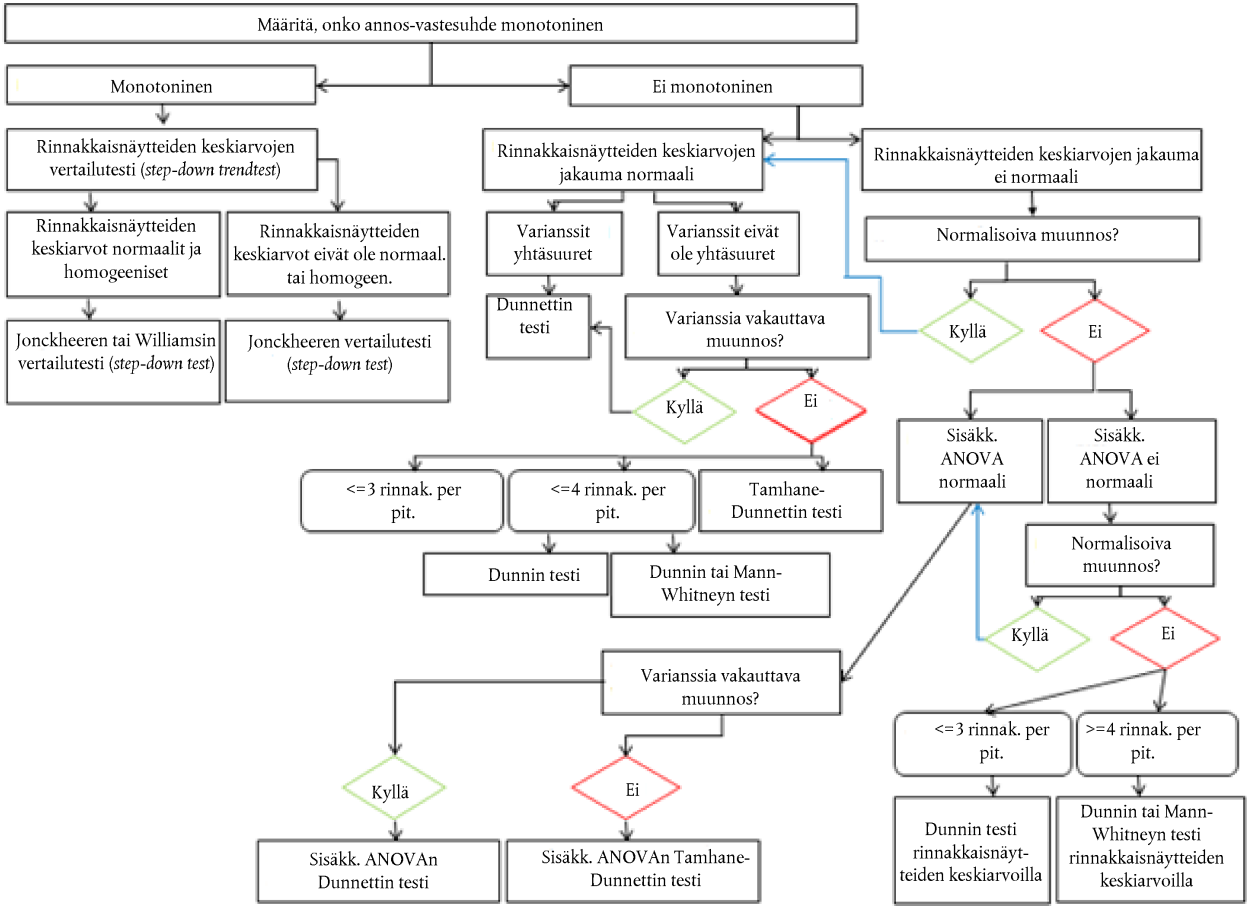
Rikastusnäyte tehdään lisäämällä tunnettu määrä määritysten välistä vertailuainetta kontrollikoiraan plasmanäytteeseen. Näytettä rikastetaan, jotta saadaan sellainen vitellogeniinipitoisuus, joka on 10–100 kertaa suurempi kuin kontrollikoiraan odotettu vitellogeniinipitoisuus. Rikastettava kontrollikoiraan plasmanäyte voi olla peräisin yksittäiseltä kalalta, tai se voidaan yhdistää useilta kaloilta.

Rikastamattomasta kontrollikoiraan plasmasta otettu alanäyte analysoidaan vähintään kahdessa rinnakkaisessa kuopassa. Myös rikastettu näyte analysoidaan vähintään kahdessa rinnakkaisessa kuopassa. Vitellogeniinin keskimääräinen määrä kahdessa rikastamattomassa kontrollikoiraan plasmanäytteessä lisätään siihen vitellogeniinin laskettuun määrään, joka on lisätty näytteiden rikastamiseen, odotetun pitoisuuden määrittämiseksi. Tämä odotetun pitoisuuden ja mitatun pitoisuuden välinen suhde ilmoitetaan kyseisenä päivänä tehtyjen määritysten tulosten mukana.

▼M7

Lisäys 8

VUOKAAVIO TILASTOLLISTA ANALYYSIA KOSKEVAN PÄÄTÖKSENTEON TUEKSI



▼M7

C.49. KALOJEN ALKIOILLA TEHTÄVÄ AKUUTTIA TOKSISUUTTA KOSKEVA TESTI (FET-TESTI)

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) nro 236 (2013). Siinä kuvataan seeprakalan (*Danio rerio*) alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskevat testi (FET-testi). Tämän testin tarkoituksena on määrittää kemikaalien akuutti toksisuus kalojen alkiokehitysvaiheille. FET-testi perustuu seeprakaloilla toteutettuihin tutkimuksiin ja validointitoimiin (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). FET-testiä on sovellettu menestyksellisesti useisiin erilaisiin kemikaaleihin, joiden vaikutustavat, liukoisuudet, haihtuvuudet ja hydrofobisuudet vaihtelevat (tätä on tarkasteltu kirjallisuusviitteissä 15 ja 16).

2. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ovat lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

3. Äskettäin hedelmöityneet seeprakalan munat altistetaan testikemikaalille 96 tunnin ajan. Kuolleisuuden indikaattoreina kirjataan 24 tunnin välein enintään neljä apikaalista havaintoa: i) hedelmöityneiden munien koagulaatio, ii) somiittien muodostumattomuus, iii) häntäsilmun irtoamattomuus ruskuaispussista ja iv) sydämenlyöntien puute. Altistusjakson lopussa akuutti toksisuus määritellään missä tahansa neljästä kirjatusta apikaalisesta havainnosta saadun positiivisen tuloksen perusteella ja lasketaan LC_{50}-arvo.

ALUSTAVAT HUOMIOT

4. Hyödyllisiä tietoja ainekohtaisista ominaisuuksista ovat muun muassa rakennekaava, molekyylipaino, puhtaus, stabiilisuus vedessä ja valossa, pK_a ja K_{ow}, vesiliukoisuus ja höyrynpaine sekä nopean biohajoavuuden testin tulokset (testimenetelmä C.4 (17) tai testimenetelmä C.29 (18)). Liukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää haihtumisen vuoksi testin aikana. Käytettävissä pitäisi olla myös tarkkuudeltaan ja määritysrajaltaan tunnettu sopiva analyyttinen menetelmä aineen määrittämiseksi kvantitatiivisesti testiliuoksissa.

5. Jos testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen, seoksen koostumus olisi luonnehdittava mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallinen koostumuksen, esiintymistiheyden ja ainekohtaisten erityisominaisuuksien avulla (ks. 4 kohta). Ennen kuin testimenetelmää käytetään lainsäädännössä edellytettyyn seosten testaukseen, on harkittava, antaako se hyväksyttävät tulokset lainsäädännön tavoitteen kannalta..

6. Metabolian avulla aktivoitavissa olevien aineiden osalta on näyttöä siitä, että seeprakalojen alkioilla on biotransformaatiokykyjä (19) (20) (21) (22). Alkiovaiheessa olevien kalojen metabolointikyky ei kuitenkaan aina ole sama kuin kalanpoikasten tai täysikasvuisten kalojen metabolointikyky. Esimerkiksi protoksista allyylialkoholia (9) ei ole havaittu FET-testissä. Jos on viitteitä siitä, että metaboliitit tai muut merkitykselliset hajoamistuotteet saattavat olla myrkyllisempiä kuin alkutuote, suositellaan tästä syystä, että testi suoritetaan myös näillä metaboliiteilla/hajoamistuotetilla ja myös näitä tuloksia käytetään tehtäessä johtopäätöksiä testikemikaalin toksisuudesta tai että vaihtoehtoisesti suoritetaan toinen testi, jossa metabolointi otetaan paremmin huomioon.

7. Alkioiden ei odoteta olevan herkkiä aineille, joiden molekyylipaino on ≥ 3kDa, aineille, joilla on hyvin tilaa vievä molekyylirakenne sekä aineille, jotka viivästyttävät kuoriutumista ja saattavat estää kuoriutumisen jälkeisen altistumisen tai vähentää sitä, aineiden rajallisen biologisen hyödynnettävyyden vuoksi, ja muut toksisuustestit saattavat olla asianmukaisempia.

▼M7

TESTIN VALIDITEETTI

8. Testitulokset ovat valideja, jos seuraavat ehdot täyttyvät:

a) Kaikkien kerättyjen munien kokonaishedelmöitymisasteen on oltava ≥ 70 prosenttia testattavassa erässä.

b) Veden lämpötilan testauskammioissa on oltava 26 ± 1 °C koko testin ajan.

c) Alkioiden eloonjäämisasteen negatiivisessa kontrollissa (laimennusvesi) ja tarvittaessa liuotinkontrollissa on oltava ≥ 90 prosenttia 96 tuntia kestävän altistuksen loppuun asti.

d) Altistuksen positiiviselle kontrollille (seeprakalojen osalta esimerkiksi 4,0 mg/l 3,4-dikloorianiliinia) kuolleisuuden on oltava vähintään 30 prosenttia 96 tuntia kestävän altistuksen lopussa.

e) Kuoriutumisasteen on negatiivisessa kontrollissa (ja tarvittaessa liuotinkontrollissa) oltava ≥ 80 prosenttia 96 tuntia kestävän altistuksen lopussa.

f) Veteen liuenneen hapen pitoisuuden negatiivisessa kontrollissa ja suurimman testipitoisuuden on oltava 96 tuntia kestävän altistuksen lopussa ≥ 80 prosenttia kyllästymisarvosta.

MENETELMÄN KUVAUS

9. Yhteenveto suositelluista ylläpito- ja testiolosuhteista on lisäyksessä 2.

Laitteisto

10. Menetelmässä tarvitaan seuraavat laitteet:

a) kalasäiliöitä, jotka ovat kemiallisesti inerttiä materiaalia (esimerkiksi lasia) ja riittävän suuria suhteessa suositeltuun lastaustiheyteen (ks. ”Syöttökalojen ylläpito”, 14 kohta)

b) vähintään 80-kertaisesti suurentava käänteismikroskooppi ja/tai kaksiokulaarinen mikroskooppi; jos havaintojen kirjaamiseen käytettävän tilan lämpötilaa ei voida säätää 26 ± 1 celsiusasteeseen, tarvitaan lämpötilakontrolloitu näytepöytä tai muita lämpötilan ylläpitokeinoja

c) testauskammiot; esimerkiksi tavanomaisia 24-kuoppalevyjä, joiden syvyys on noin 20 mm (ks. ”Testauskammiot”, 11 kohta)

d) esimerkiksi tarrakalvoa 24-kuoppalevyjen peittämiseen

e) inkubaattori tai ilmastoitu tila, jonka lämpötila on säädettävissä ja jonka avulla lämpötila kuopissa (tai testauskammioissa) voidaan pitää 26 ± 1 celsiusasteessa

f) ph-mittari

g) happimittari

h) laite veden kovuuden ja johtavuuden määritykseen

i) kutuastia: instrumenttitarjottimia, jotka ovat lasia, ruostumatonta terästä tai muuta inerttiä materiaalia; mätimunia suojaava verkko (silmäkoko 2 ± 0,5 mm), joka on ruostumatonta terästä tai muuta inerttiä materiaalia; kutualusta (esimerkiksi inertistä materiaalista valmistettuja keinotekoisia kasveja (testimenetelmä C.48, lisäys 4a (23))

j) suurikärkisiä pipettejä mätimunien keräämiseen

▼M7

k) lasiastioita eri testipitoisuuksien ja laimennusveden valmistamiseen (dekantterilaseja, mitta-asteikoilla varustettuja pulloja, mittalaseja ja pipettejä) tai seeprakalan munien keräämiseen (esimerkiksi dekantterilaseja, kiteytysmaljoja)

l) jos testin suorittamiseen käytetään vaihtoehtoisia altistusjärjestelmiä, kuten läpivirtausjärjestelmää (24) tai passiivista annostelua (25), tarvitaan asianmukaiset tilat ja laitteet.

Testiastiat

11. On käytettävä lasista tai polystyreenistä valmistettuja testiastioita (esimerkiksi 24-kuoppalevyjä, joissa kunkin kuopan täyttötilavuus on 2,5–5 ml). Jos epäillään (esimerkiksi ei-polaaristen, rakenteeltaan tasomaisten aineiden, joilla on korkea K_{OW}-arvo) adsorboitumista polystyreeniin, on käytettävä inerttejä materiaaleja (lasi) adsorboitumisesta aiheutuvan häviämän vähentämiseksi (26). Testiastiat on sijoitettava inkubaattoriin sattumanvaraiseen järjestykseen.

Vesi ja koeolosuhteet

12. Ylläpitovesi suositellaan laimennettavan siten, että saavutetaan useille erilaisille pintavesille tyypillinen kovuustaso. Laimennusvesi on valmistettava synteettisestä vedestä (27). Tuloksena saatavan kovuusarvon on oltava 100–300 mg/l $CaCO_3$, jotta estetään kalsiumkarbonaatin liiallinen saostuminen. Myös muuta hyvin kuvattua pinta- tai lähdevettä voidaan käyttää. Synteettinen vesi voidaan mukauttaa kovuudeltaan alhaiseksi ylläpitovedeksi laimentamalla sitä deionisoidulla vedellä enintään suhteessa 1:5 vähimmäiskovuuteen 30–35 mg/l $CaCO_3$. Vesi ilmastetaan happikyllästykseen asti ennen testikemikaalin lisäämistä. Lämpötilan kuopissa on oltava 26 ± 1 °C koko testin ajan. pH-arvon on oltava 6,5–8,5 ja se saa vaihdella tämän vaihteluvälin sisällä enintään 1,5 yksikköä testin aikana. Jos pH-arvon ei odoteta pysyvän tämän vaihteluvälin sisällä, pH-arvoa on säädettävä ennen testin aloittamista. pH-arvoa on säädettävä siten, että se ei muuta kantaliuoksen pitoisuutta merkittävästi eikä aiheuta testikemikaalin kemiallisia reaktioita tai saostumista. Vetykloridin (HCl) ja natriumhydroksidin (NaOH) käyttöä testikemikaalia sisältävien liuosten pH-arvon korjaamiseen suositellaan.

Testiliuokset

13. Testiliuosten halutut pitoisuudet voidaan valmistaa esimerkiksi laimentamalla kantaliuosta. Kantaliuokset valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testikemikaali laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä (kuten sekoittamista ja/tai ultraääntä). Vaikeasti veteen liukenevien testikemikaalien yhteydessä tulee noudattaa vaikeasti testattavia aineita ja seoksia koskevaa OECD:n ohjeasiakirjaa nro 23 (28). Liuottimien tai dispergointiaineiden käyttöä tulee välttää, mutta se voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi. Kun kantaliuosten valmistuksessa käytetään jotakin liuotinta, sen loppupitoisuus testiastioissa ei saisi olla suurempi kuin 100 µl/l, ja pitoisuuden pitäisi olla sama kaikissa testiastioissa. Liuottimen käyttö edellyttää ylimääräistä liuotinkontrollia.

Emokalojen ylläpito

14. Mätimunien tuotantoon käytetään altistamattomien villien seeprakalojen kutukantaa, jonka munien hedelmöitymisaste on hyvin dokumentoitu. Kaloilla ei saa olla makroskooppisesti havaittavia tulehduksen ja sairauden oireita eikä niitä saa olla hoidettu lääkkeillä (akuutisti tai profylaktisesti) kutua edeltävien kahden kuukauden aikana. Emokaloja ylläpidetään akvaarioissa, joiden suositeltu tilavuus on 1 l vettä kalaa kohti ja kiinteä valoisa aika 12–16 tuntia (29) (30) (31) (32) (33). Optimaaliset suodatusnopeudet on säädettävä; liiallisia suodatusnopeuksia, jotka aiheuttavat veden voimakasta

▼M7

sekoittumista, on vältettävä. Tietoja ruokintaolosuhteista on lisäyksessä 2. Liiallista ruokintaa on vältettävä ja veden laatua ja akvaarioiden puhtautta on valvottava säännöllisesti ja ne on palautettava tarvittaessa alkuperäiseen tilaan.

Pätevyyden testaaminen

15. 3,4-dikloorianiliiniä (jota on käytetty validointitutkimuksissa (1) (2)) on testattava vertailukemikaalina mieluiten kahdesti vuodessa pitoisuus-vastesuhteen koko vaihteluvälillä käytetyn kalakannan herkkyyden tarkistamiseksi. Kun laboratorio alkaa käyttää tätä määritysmenetelmää, sen on käytettävä vertailukemikaalia. Laboratorio voi käyttää tätä kemikaalia osoittaakseen teknisen pätevyytensä määritysmenetelmän suorituksessa ennen kuin se toimittaa tuloksia sääntelytarkoituksiin.

Mätimunien tuotanto

16. Seeprakalan munia voidaan tuottaa kuturyhmissä (yksittäisissä kututankeissa) tai massakudun avulla (ylläpitotankeissa). Jos käytetään kuturyhmiä, ryhmän koiraat ja naaraat (esimerkiksi suhteessa 2:1) laitetaan kututankkeihin muutama tunti ennen pimeän tuloa testiä edeltävänä päivänä. Koska seeprakalojen kuturyhmät saattavat joskus jättää kutematta, suositellaan vähintään kolmen kututankin käyttämistä samanaikaisesti. Geneettisen vinouman välttämiseksi mätimunat kerätään vähintään kolmesta kuturyhmästä, sekoitetaan ja valitaan satunnaisesti.

17. Mätimunien keräämiseksi kutuastioita sijoitetaan kututankkeihin tai ylläpitotankkeihin ennen valon sammuttamista testiä edeltävänä päivänä tai ennen valon sytyttämistä testipäivänä. Jotta täysikasvuiset seeprakalat eivät voi syödä munia, kutuastiat peitetään inertistä materiaalista valmistetuilla verkoilla, joiden silmäkoko on sopiva (noin 2 ± 0,5 mm). Keinotekoisia kasveja, jotka ovat inerttiä materiaalia (esimerkiksi muovia tai lasia), voidaan kiinnittää verkkoon kudun stimuloimiseksi, jos tämän katsotaan olevan tarpeen (3) (4) (5) (23) (35). Tässä on käytettävä kuluneita muovimateriaaleja, jotka eivät liukene (esimerkiksi ftalaatit). Pariutuminen, kuteminen ja hedelmöityminen tapahtuvat 30 minuutin kuluessa valon sytyttämisestä, ja kutuastiat, joissa kerätyt mätimunat ovat, voidaan poistaa varovasti. Mätimunat suositellaan huuhdeltavan synteettisellä vedellä sen jälkeen, kun ne on kerätty kutuastioista.

Mätimunien erottelu

18. Lämpötilassa 26 °C hedelmöityneet munat jakautuvat ensimmäisen kerran noin 15 minuutin kuluttua, ja seuraavissa synkronisissa jakautumisissa muodostuu 4-, 8-, 16- ja 32-soluisia blastomeerejä (ks. lisäys 3) (35). Näissä vaiheissa hedelmöityneet munat voidaan tunnistaa selvästi blastulan kehittymisen perusteella.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

19. Testikemikaalille altistetaan 20 alkiota pitoisuutta kohti (yksi alkio kussakin kuopassa). Altistuminen on toteutettava siten, että ± 20 prosenttia kemikaalin nimellispitoisuudesta pidetään yllä koko testin ajan. Jos tämä ei ole mahdollista staattisessa järjestelmässä, on sovellettava helposti käsiteltävää semistaattista vaihtoväliä (esimerkiksi testikemikaalin vaihtaminen 24 tunnin välein). Näissä tapauksissa altistumispitoisuudet on todennettava vähintään suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista kunkin altistumisvälin alussa ja lopussa (ks. 36 kohta). Jos altistumispitoisuutta, joka on ± 20 prosenttia nimellispitoisuuksista, ei voida pitää yllä, kaikki pitoisuudet on mitattava kunkin altistumisvälin alussa ja lopussa (ks. 36 kohta). Vaihtamisen yhteydessä on huolehdittava siitä, että pieni määrä vanhaa testiliuosta peittää

▼M7

alkiot koko ajan, jotta ne eivät kuivu. Testiä voidaan mukauttaa vastaamaan tiettyjen aineiden testausta koskevia vaatimuksia (esimerkiksi läpivirtausjärjestelmät (24) tai passiiviset annostelujärjestelmät (25) helposti hajoavia tai hyvin adsorboituvia aineita varten (29) tai muut järjestelmät haihtuvia aineita varten (36) (37)). Joka tapauksessa olisi huolehdittava siitä, että alkioille aiheutetaan mahdollisimman vähän stressiä. Testikammiot on sopeutettava vähintään 24 tunnin ajan testiliuoksilla ennen testin aloittamista. Yhteenveto testiolosuhteista on lisäyksessä 2.

Testipitoisuudet

20. Tilastollisen vaatimusten täyttämiseksi tarvitaan tavallisesti viisi testikemikaalin pitoisuutta, joiden välinen ero on vakio ja enintään 2,2-kertainen. Jos käytetään alle viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Suosituksena on, että suurin testattava pitoisuus johtaa 100 prosentin kuolleisuuteen ja että pienin testattava pitoisuus ei aiheuta havaittavaa vaikutusta 28 kohdan mukaisesti. Ennen varsinaista koetta tehtävällä alueenmäärityskokeella voidaan valita asianmukainen pitoisuusalue. Alueenmäärityskoe tehdään tavallisesti kymmenellä alkiolla pitoisuutta kohti. Seuraavat ohjeet koskevat kokeen suorittamista 24-kuoppalevyissä. Jos käytetään erilaisia testauskammioita (esimerkiksi pieniä Petri-maljoja) tai testataan useampia pitoisuuksia, ohjeita on mukautettava vastaavasti.

21. Yksityiskohtaisia ja visuaalisia ohjeita pitoisuuksien jakamiseksi eri 24-kuoppalevyihin on 27 kohdassa sekä lisäyksessä 4 olevassa kuvassa 1.

Kontrollit

22. Laimennusvesikontrolleja tarvitaan sekä negatiivisena kontrollina että levyjen sisäisinä kontrolleina. Jos levyn sisäisessä kontrollissa havaitaan enemmän kuin yksi kuollut alkio, levy hylätään, mikä vähentää LC_{50}-arvon määrittämisessä käytettyjen pitoisuuksien määrää. Jos koko levy hylätään, havaittujen vaikutusten arvioiminen ja erottaminen vaikeutuu, varsinkin jos hylätty levy on liuotinkontrollilevy tai levy, jossa on myös käsiteltyjä alkioita. Ensin mainitussa tapauksessa koe on toistettava. Jälkimmäisessä tapauksessa kokonaisen käsitellyn ryhmän (tai ryhmien) menettäminen sisäisen kontrollin kuolleisuuden vuoksi saattaa rajoittaa kykyä arvioida vaikutuksia ja määrittää LC_{50}-arvoja.

23. Kunkin testauksessa käytetyn munaerän osalta suoritetaan positiivinen kontrolli vakiopitoisuudella 4 mg/l 3,4-dikloorianiliinia.

24. Jos käytetään liuotinta, 20 alkion lisäryhmä altistetaan liuottimelle erillisellä 24-kuoppalevyllä, joka toimii liuotinkontrollina. Jotta testi voidaan katsoa hyväksyttäväksi, on osoitettava, että liuottimella ei ole merkittävää vaikutusta kuoriutumisaikaan ja eloonjäämiseen eikä se aiheuta mitään muita haittavaikutuksia alkioille (vrt. 8 kohdan c alakohta).

Altistuksen aloittaminen ja testin kesto

25. Testi aloitetaan mahdollisimman pian munien hedelmöitymisen jälkeen ja se päättyy 96 tunnin altistuksen jälkeen. Alkiot upotetaan testiliuoksiin ennen alkiolevyn jakaantumisvaihetta tai viimeistään 16 solun vaiheessa. Altistuksen aloittamiseksi mahdollisimman pian valitaan satunnaisesti vähintään kaksi kertaa kutakin käsiteltävää ryhmää tarvittava määrä munia ja ne siirretään eri pitoisuuksiin ja kontrolleihin (esimerkiksi 100 ml:n kiteytysmaljoihin; munien on oltava täysin upotettuina) viimeistään 90 minuuttia hedelmöitymisen jälkeen.

26. Elinkykyiset hedelmöityneet munat erotetaan hedelmöittymättömistä munista ja siirretään 24 tunnin ajan esikäsiteltyihin 24-kuoppalevyihin, joihin kaadetaan 2 ml vastavalmistettua testiliuosta kuoppaa kohti 180 minuutin

▼M7

kuluessa hedelmöitymisestä. Stereomikroskoopin (mieluiten ≥ 30-kertainen suurennus) avulla valitaan hedelmöityneet munat, jotka jakautuvat eivätkä osoita selviä epänormaaleja ilmiöitä jakautumisen aikana (esimerkiksi asymmetria, vesikkelien muodostuminen) tai korionin vaurioita. Munien keräämisestä ja erottelusta katso lisäyksessä 3 olevat kuvat 1 ja 3 sekä lisäyksessä 4 oleva kuva 2.

Mätimunien jakaminen 24-kuoppalevyihin

27. Mätimunat jaetaan kuoppalevyihin seuraavasti (ks. myös lisäyksessä 4 oleva kuva 1):

— 20 munaa yhdelle levylle kutakin testipitoisuutta kohti

— 20 munaa liuotinkontrollina yhdelle levylle (tarvittaessa)

— 20 munaa positiivisena kontrollina yhdelle levylle

— 4 munaa laimennusvedessä sisäisenä levykontrollina jokaiselle edellä mainituista levyistä

— 24 munaa laimennusvedessä negatiivisena kontrollina yhdelle levylle.

Havainnot

28. Kustakin testatusta alkiosta tehdään seuraavat apikaaliset havainnot: alkioiden koaguloituminen, somiittien muodostumattomuus, hännän irtoamattomuus ja sydämenlyöntien puute (taulukko 1). Näitä havaintoja käytetään kuolleisuuden määrittämiseen: positiivinen tulos jossain näistä havainnoista merkitsee sitä, että seeprakalan alkio on kuollut. Lisäksi kuoriutuminen kirjataan käsitellyissä ja kontrolliryhmissä päivittäin 48 tunnin jälkeen. Havainnot kirjataan 24 tunnin välein testin loppuun asti.

Taulukko 1

Akuuttia toksisuutta koskevat apikaaliset havainnot seeprakalojen alkioissa 24–96 tuntia hedelmöittymisen jälkeen

	Altistusajat			
	24 tuntia	48 tuntia	72 tuntia	96 tuntia
Koaguloituneet alkiot	+	+	+	+
Somiittien muodostumattomuus	+	+	+	+
Hännän irtoamattomuus	+	+	+	+
Sydämenlyöntien puute		+	+	+

29. *Alkion koaguloituminen:* Koaguloituneet alkiot ovat maidonvalkeita ja näkyvät mikroskoopissa tummina (ks. lisäyksessä 5 oleva kuva 1). Koaguloituneiden alkioiden määrä lasketaan 24, 48, 72 ja 96 tunnin jälkeen.

30. *Somiittien muodostumattomuus:* Lämpötilassa 26 ± 1 °C normaalisti kehittyvässä seeprakalan alkiossa on 24 tunnin jälkeen muodostunut noin 20 somiittia (ks. lisäyksessä 5 oleva kuva 2). Normaalisti kehittynyt alkio liikkuu spontaanisti (sivuttaissuuntaisia supistuksia). Spontaanit liikkeet ovat osoitus somiittien muodostumisesta. Somiittien puuttuminen kirjataan 24, 48, 72 ja 96 tunnin jälkeen. Somiittien muodostumattomuus 24 tunnin jälkeen saattaa johtua kehityksen yleisestä hidastumisesta. Viimeistään 48 tunnin jälkeen somiitteja pitäisi olla muodostunut. Jos näin ei ole, alkiot katsotaan kuolleiksi.

31. *Hännän irtoamattomuus:* Normaalisti kehittyvissä seeprakalojen alkioissa hännän havaitaan irtoavan (ks. lisäyksessä 5 oleva kuva 3) ruskuaisesta

▼M7

alkion takaosan pidennyttyä. Hännän irtoamattomuus kirjataan 24, 48, 72 ja 96 tunnin jälkeen.

32. *Sydämenlyöntien puute:* Normaalisti kehittyvissä seeprakalojen alkioissa sydämenlyönnit näkyvät 26 ± 1 °C lämpötilassa 48 tunnin jälkeen (ks. lisäyksessä 5 oleva kuva 4). Tämän päätepisteen kirjaamisessa on oltava erityisen huolellinen, sillä epäsäännöllisiä sydämenlyöntejä *ei* saa kirjata letaalina päätepisteenä. Lisäksi näkyviä sydämenlyöntejä ilman verenkiertoa vatsa-aortassa ei katsota letaaliksi päätepisteeksi. Tämän päätepisteen kirjaamiseksi alkioita, joilla ei havaita sydämenlyöntejä, on havainnoitava vähintään 80-kertaisella suurennuksella vähintään minuutin ajan. Sydämenlyöntien puute kirjataan 48, 72 ja 96 tunnin jälkeen.

33. Kaikkien käsiteltyjen ryhmien ja kontrolliryhmien kuoriutumisasteet on kirjattava 48 tunnista lähtien ja raportoitava. Vaikka kuoriutuminen ei ole LC_{50}-arvon laskennassa käytettävä päätepiste, se varmistaa alkion altistumisen ilman korionin suojaavaa vaikutusta ja voi siten auttaa tietojen tulkinnassa.

34. Yksityiskohtaisia kuvauksia seeprakalan alkioiden normaalista (35) kehityksestä ja esimerkkejä epänormaalista kehityksestä esitetään lisäyksissä 3 ja 5.

Mittaukset

35. Testin alussa ja lopussa määritetään pH, kokonaiskovuus ja johtavuus kontrollissa (tai kontrolleissa) ja testikemikaalin suurimmassa pitoisuudessa. Semistaattisissa vaihtojärjestelmissä pH on määritettävä ennen veden vaihtamista ja sen jälkeen. Liuenneen hapen pitoisuus mitataan testin lopussa negatiivisissa kontrolleissa sekä suurimmassa testipitoisuudessa, jossa on elinkykyisiä alkioita, ja sen olisi siinä oltava testin validiteettikriteerien mukainen (ks. 8 kohdan f alakohta). Jos lämpötilan pelätään vaihtelevan eri 24-kuoppalevyjen välillä, lämpötila mitataan kolmesta satunnaisesti valitusta astiasta. Lämpötila olisi kirjattava mieluiten jatkuvasti testin ajan tai vähintään päivittäin.

36. Staattisessa järjestelmässä testikemikaalin pitoisuus on mitattava ainakin suurimmassa ja pienimmässä testipitoisuudessa, mutta mieluiten kaikissa käsittelyissä, testin alussa ja lopussa. Semistaattisissa testeissä (joissa liuokset vaihdetaan) suositellaan, että määritetään vähintään suurimmat ja pienimmät pitoisuudet tuoreesta liuoksesta ja juuri ennen liuoksen vaihtoa, jos testikemikaalipitoisuuksien odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta. Jos testikemikaalin pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta, kaikki testipitoisuudet on analysoitava vasta valmistettuina sekä välittömästi ennen vaihtamista. Jos määrä ei ole riittävä analysointia varten, voi olla hyödyllistä yhdistää testiliuoksia tai käyttää korvaavia kammioita, jotka ovat samaa materiaalia kuin 24-kuoppalevyt ja joiden tilavuuden ja pinta-alan suhde on sama. On erittäin suositeltavaa määritellä tulokset mitattujen pitoisuuksien perusteella. Jos mitatut pitoisuudet eivät pysy 80–120 prosentissa nimellispitoisuudesta, vaikuttavat pitoisuudet olisi ilmaistava suhteessa mitattujen pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon; katso vaikeiden aineiden ja seosten toksisuustestausta vesieliöillä koskevan OECD:n ohjeasiakirjan luku 5 (28).

RAJA-ANNOSTESTI

37. Tässä testimenetelmässä kuvattuja menettelyjä käyttäen voidaan suorittaa raja-annostesti, jossa testikemikaalin pitoisuus on 100 mg/l tai sama kuin aineen liukoisuusraja-arvo testissä käytettävässä viljelynesteessä (sen mukaan, kumpi on alempi), sen osoittamiseksi, että LC_{50}on suurempi kuin

▼M7

kyseinen pitoisuus. Raja-annostesti on suoritettava 20 alkiolla käsittelyssä, positiivisessa kontrollissa ja – tarvittaessa – liuotinkontrollissa ja 24 alkiolla negatiivisessa kontrollissa. Jos kuolleisuus testatussa pitoisuudessa ylittää negatiivisen kontrollin (tai liuotinkontrollin) kuolleisuuden 10 prosentilla, on suoritettava kattava testi. Kaikki havaitut vaikutukset on kirjattava. Jos kuolleisuus negatiivisessa kontrollissa (tai liuotinkontrollissa) on suurempi kuin 10 prosenttia, testiä ei voida hyväksyä ja se on uusittava.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

38. Tässä testissä yksittäisiä kuoppia pidetään tilastollisen analyysin kannalta riippumattomina toistoina. Niiden alkioiden prosenttiosuus, joista ainakin yksi apikaalinen havainto on positiivinen 48 ja/tai 96 tunnin jälkeen, esitetään testipitoisuuksien funktiona. Kuvaajien kulmakertoimien, LC_{50}-arvojen ja luottamusvälin (95 prosenttia) laskemiseksi on käytettävä sopivia tilastomenetelmiä (38) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa ”Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data” (39).

Testiraportti

39. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin esimerkiksi sen ainesosien kemiallinen koostumuksen, esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla

Testiorganismit:

— tieteellinen nimi, kanta, hedelmöityneiden munien toimittaja ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

Testiolosuhteet:

— käytetty testimenettely (esimerkiksi liuos vaihtuu semistaattisissa olosuhteissa)

— valoisa aika

— koejärjestely (esimerkiksi testauskammioiden määrä, kontrollien tyyppi)

— kalojen ylläpitoon käytetyn veden laatua koskevat tiedot (esimerkiksi pH, kovuus, lämpötila, johtavuus, liuenneen hapen pitoisuus)

— testiliuosten liuenneen hapen pitoisuus, pH, kokonaiskovuus, lämpötila ja johtavuus kokeen alussa ja 96 tunnin jälkeen

— kantaliuosten ja testiliuosten valmistusmenetelmä sekä vaihtotiheys

▼M7

— perustelut liuottimen käyttämiselle ja sen valinnalle, jos se on muu kuin vesi

— nimelliset testipitoisuudet sekä tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritetään testikemikaalin pitoisuus koeastioissa; lisäksi on ilmoitettava menetelmän saantoteho sekä kvantifiontiraja (LoQ)

— näyttö siitä, että kontrollit täyttivät yleiset eloonjäämistä koskevat validiteettivaatimukset

— munien hedelmöitymisaste

— kuoriutumisaste käsitellyissä ryhmissä ja kontrolliryhmissä.

Tulokset:

— suurin pitoisuus, joka ei ole aiheuttanut kuolleisuutta kokeen aikana

— pienin pitoisuus, joka on aiheuttanut 100 prosentin kuolleisuuden kokeen aikana

— kumulatiivinen kuolleisuus kussakin pitoisuudessa suositeltuina havainnointiajankohtina

— jos mahdollista LC_{50}-arvot kuolleisuudelle 96 tunnin (ja valinnaisesti 48 tunnin) kohdalla 95 prosentin luottamusrajoin

— pitoisuus/kuolleisuus -käyrä kokeen päätyttyä

— kuolleisuus kontrolleissa (negatiiviset kontrollit, levyjen sisäiset kontrollit sekä positiivinen kontrolli ja mahdollisesti käytetty liuotinkontrolli)

— tiedot kunkin neljän apikaalisen havainnon tuloksista

— mahdollisten morfologisten ja fysiologisten poikkeavuuksien esiintyvyys ja kuvaus (ks. lisäyksessä 5 olevassa kuvassa 2 esitetyt esimerkit)

— testin aikaiset tapahtumat, jotka ovat saattaneet vaikuttaa tuloksiin

— tilastollinen analyysi ja tietojen käsittely (Probit-analyysi, logistinen regressiomalli ja LC_{50}-arvojen geometrinen keskiarvo)

— (muunnetun) pitoisuus-vastekuvaajan regression kaltevuus ja luottamusväli.

Mahdolliset poikkeamat testimenetelmästä ja syyt niihin.

Tulosten tarkastelu ja tulkinta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. ja Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish

▼M7

LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: s. 87–102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: s. 38–48.

(6) Schulte, C. ja Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test – preliminary results. ATLA 22, s. 12–19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. ja Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: s. 2087–2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, s. 9690–9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. ja Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: s. 97–102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. ja Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: s. 401–406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: s. 878–882.

(13) Nguyen, L.T. ja Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: s. 566–571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. ja Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: s. 3024–3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. ja Carr G. J. (2013) Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32:1768–1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), s. 196-209

(17) Tämän liitteen luku C.4: Biohajoavuuden määritys

(18) Tämän liitteen luku C.29: Biohajoavuus – CO_2 suljetuissa astioissa

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: s. 25–36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: s. 133–141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: s. 242–249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Toxicol. 253: s. 244–252.

(23) Tämän liitteen luku C.48: Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus. Ks. lisäys 4a.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: s. 1436–1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, s. 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, s. 1676–1682.

(27) ISO (1996) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3 Flow-through method. Saatavilla osoitteessa: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: s. 121–173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5. painos. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Euroopan komissio (2007): Komission suositus 2007/526/EY, annettu 18 päivänä kesäkuuta 2007, kokeellisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten säilytystä ja hoitoa koskevista ohjeista (tiedoksiannettu numerolla K(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:EN:PDF]

(33) Euroopa unioni (2010): Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta. EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: s. 173–181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. ja Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: s. 253–310.

(36) Tämän liitteen luku C.2: Daphnia sp., akuutin immobilisaation testi

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: s. 1970–1978

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Saatavilla osoitteessa: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper ”Fish embryo toxicity assays”. UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. s. 298

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Apikaalinen päätepiste: aiheuttaa vaikutuksen populaation tasolla.

Blastula: Alkion animaalisen navan ympärillä oleva solumuodostuma, joka peittää ruskuaisen tietyn osan.

Epibolia: pääasiassa epidermaalisten solujen voimakas lisääntyminen alkion gastrulaatiovaiheessa ja niiden liikkuminen dorsaalipuolelta ventraalipuolelle, jolloin entodermaaliset solukerrokset internalisoituvat invaginaatiota muistuttavassa prosessissa ja ruskuainen siirtyy osaksi alkiota.

IUPAC: Kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto (International Union of Pure and Applied Chemistry)

Kemikaali: aine tai seos.

Levyn sisäinen kontrolli: Sisäinen kontrolli, joka muodostuu neljästä laimennusvedellä täytetystä kuopasta kutakin 24-kuoppalevyä kohti ja jolla havaitaan valmistajan tai tutkijan menettelyn aikana mahdollisesti aiheuttama levyjen kontaminaatio ja testin tulokseen mahdollisesti vaikuttavat levyjen vaikutukset (esimerkiksi lämpötilagradientti).

Läpivirtauskoe: Koe, jossa testiliuokset virtaavat jatkuvasti testijärjestelmän läpi altistuksen aikana.

Mediaani tappava pitoisuus (LC_{50}): Testikemikaalin pitoisuus, jonka arvioidaan aiheuttavan 50 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa testin aikana.

Semistaattinen ajoittaisvaihtotesti: Testi, jossa testiliuokset vaihdetaan säännöllisesti määritellyin välein (esimerkiksi 24 tunnin välein).

SMILES: SMILES-järjestelmä (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Somiitti: Somiitit ovat kehittyvissä selkärankaisten alkioissa hermostoputken molemmin puolin olevia mesodermirykelmiä, joista kehittyy verinahka (dermatomi), luustolihakset (myotoomi) ja selkäranka (sklerotomi).

Staattinen testi: Testi, jossa testiliuokset pysyvät muuttumattomina testin ajan.

Testikemikaali: aine tai seos, jota testataan tällä testimenetelmällä.

UVCB-aineet: koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet, kompleksit reaktiotuotteet tai biologiset materiaalit (Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials)

Ylläpitovesi: Vesi, jossa täysikasvuisia kaloja pidetään.

▼M7

Lisäys 2

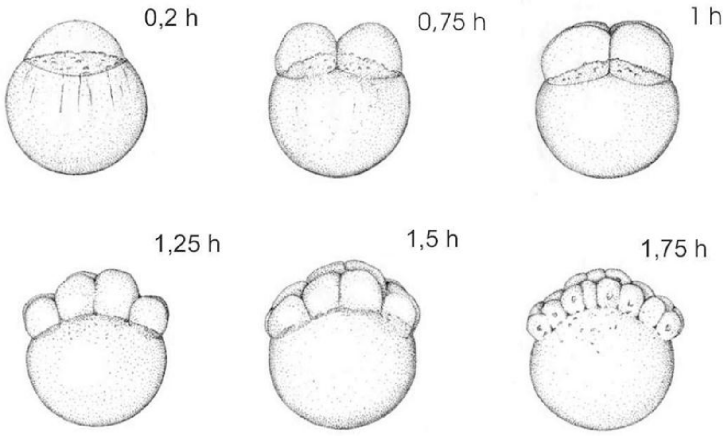
YLLÄPITO, KASVATUS JA TYYPILLISET OLOSUHTEET SEEPRAKALAN ALKIOILLA TEHTÄVÄÄ AKUUTTIA TOKSISUUSTESTIÄ VARTEN

Seeprakala (*Danio rerio*)		
Lajin alkuperä		India, Burma, Malakka, Sumatra
Naaraiden ja koiraiden erilaisuus		Naaraat: esiin työntyvä vatsa mätiä kantavina Koiraat: hoikempia, oranssi vivahde sinisten pituussuuntaisten raitojen välissä (erityisen näkyvä peräevän lähellä)
Ruokinta		Kuivaa hiutaleruokaa (enintään 3 prosenttia kalan painosta päivässä) 3–5 kertaa päivässä; lisäksi suolalehtijalkaisen (*Artemia*-suku) *nauplius*-toukkia ja/tai kontaminoitumattomasta lähteestä saatuja sopivan kokoisia pieniä vesikirppuja. Elävä ravinto lisää ympäristön virikkeellisyyttä, joten sitä olisi käytettävä lisäksi aina, kun se on mahdollista. Veden optimaalisen laadun varmistamiseksi ylimääräinen rehu ja ulosteet on poistettava noin tunnin kuluttua ruokinnasta.
Täysikasvuisen kalan arvioitu paino		Naaraat: 0,65 ± 0,13 g Koiraat: 0,5 ± 0,1 g
Emokalojen ylläpito	Valaistus	Loistelamppu (laajakirjoinen); 10–20 µE/m^2/s, 540–1 080 luksia, tai 50–100 ft-c (laboratorion ympäristötasot); valojakso 12–16 tuntia
	Veden lämpötila	26 ± 1 °C
	Veden laatu	O_2 ≥ 80 prosentin kyllästymispitoisuus, kovuus: esim. ~ 30–300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤48mg/l, NH_4^+ ja NO_2^-: < 0,001 mg/l, jäännöskloori < 10 µg/l, orgaanisen kloorin kokonaismäärä < 25 ng/l, pH = 6,5–8,5
	Muita veden laatua koskevia kriteereitä	hiukkaset < 20 mg/l, orgaanisen hiilen kokonaismäärä < 2 mg/l, orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä < 50 ng/l, orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä < 50 ng/l
	Ylläpitotankin koko	esim. 180 l, 1 kala/l
	Vedenpuhdistus	Jatkuva (hiilisuodatus); muita mahdollisuuksia ovat semistaattisen vedenvaihdon tai jatkuvasti vettä vaihtavan läpivirtausjärjestelmän yhdistelmät.
	Koiraiden ja naaraiden suositeltu suhde kasvatusta varten	2:1 (tai massakutu)
Kututankit		Esim. 4 litran kokoiset tankit, joissa on teräsverkkopohja ja keinokasvi kudun stimuloijana; ulkoiset lämpömatot, tai massakutu ylläpitotankeissa
Mätimunien rakenne ja ulkonäkö		Vakaa korion (eli hyvin läpinäkyvä, tarttumaton, halkaisija ~ 0,8–1,5 mm)
Kutumäärä		Yksi täysikasvuinen naaras laskee vähintään 50–80 munaa päivässä. Kutumäärät voivat olla kannasta riippuen huomattavasti suurempia. Hedelmöitymisasteen on oltava ≥ 70 prosenttia. Ensi kertaa kutevilla kaloilla munien hedelmöitymisaste saattaa olla pienempi muutamalla ensimmäisellä kutukerralla.
Testityyppi		Staattinen, semistaattinen, läpivirtaus, 26 ± 1 °C, 24 tunnin ajan esikäsitellyt testauskammiot (esim. 24-kuoppalevyt, 2,5–5 ml kuoppaa kohti)

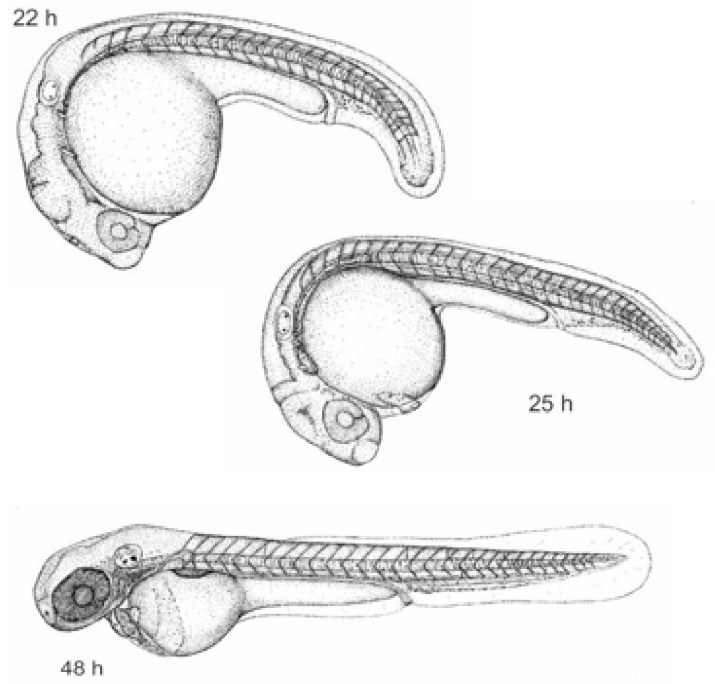
▼M7

Lisäys 3

SEEPRAKALAN NORMAALI KEHITYS 26 °C:N LÄMPÖTILASSA

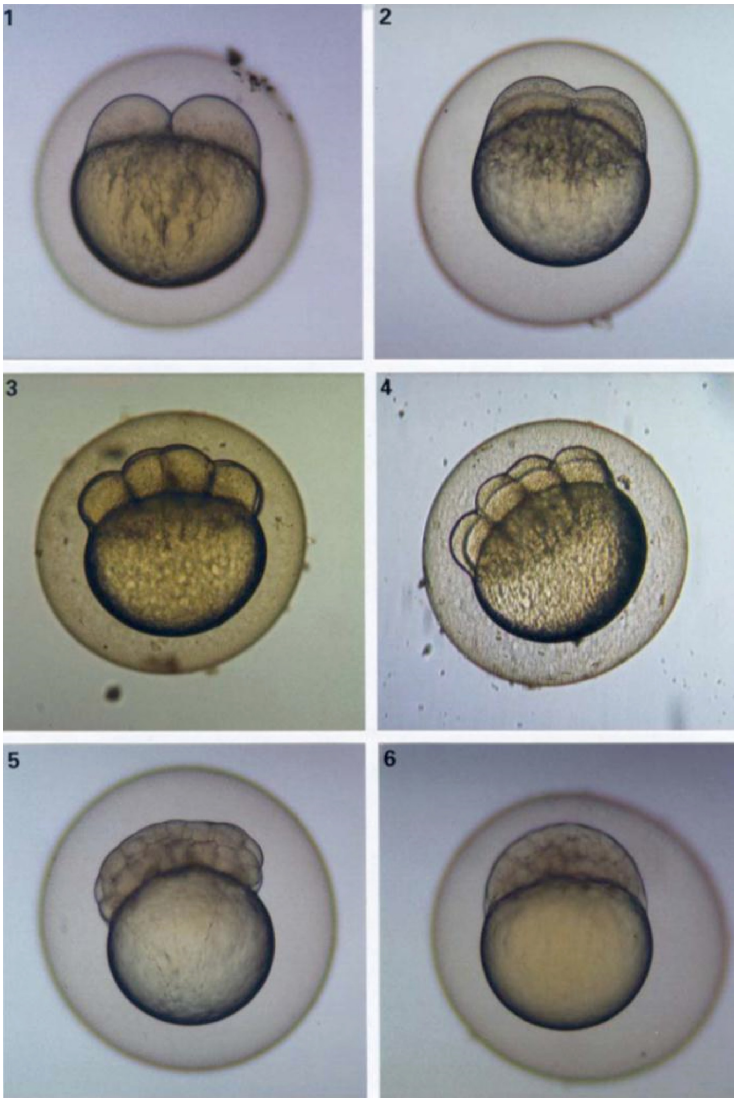


Kuva 1: Seeprakalan (Danio rerio) varhaisen kehityksen tiettyjä vaiheita: 0,2–1,75 tuntia hedelmöitymisen jälkeen (lähde: Kimmel *et al*., 1995 (35)). Normaalin kehityksen aikajärjestystä voidaan käyttää sekä munien hedelmöitymisen että niiden elinkyvyn diagnosointiin (ks. 26 kohta: Hedelmöityneiden munien valinta).



Kuva 2: Tiettyjä seeprakalan (Danio rerio) kehityksen vaiheita (alkiosta on poistettu korion näkyvyyden parantamiseksi) 22–48 tuntia hedelmöitymisen jälkeen (lähde: Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7



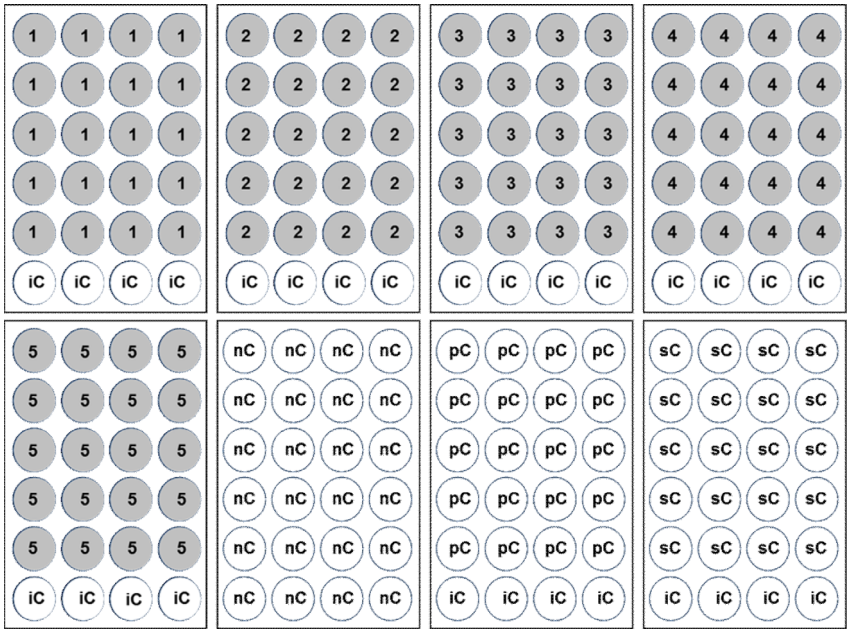
Kuva 3: Seeprakalan (Danio rerio) alkioiden normaali kehitys: (1) 0,75 tuntia, 2-soluinen alkio; (2) 1 tunti, 4-soluinen alkio; (3) 1,2 tuntia, 8-soluinen alkio; (4) 1,5 tuntia, 16-soluinen alkio; (5) 4,7 tuntia, alkava epibolia; (6) 5,3 tuntia, noin 50-prosenttinen epibolia (lähde: Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼**M7**

Lisäys 4

Kuva 1

24-kuoppalevyjen täyttö



1–5 = viisi testipitoisuutta / kemikaali;

nC = negatiivinen kontrolli (laimennusvesi);

iC = levyn sisäinen kontrolli (laimennusvesi);

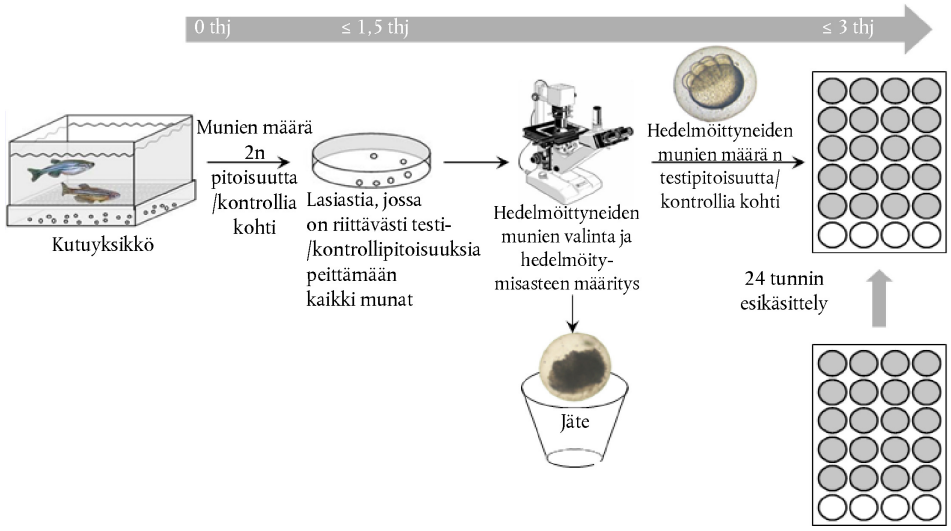
pC = positiivinen kontrolli (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = liuotinkontrolli

▼M7

Kuva 2

Kaavio seeprakalan alkioilla tehtävän akuuttia toksisuutta koskeva testimenettely (vasemmalta oikealle): munien tuotanto, munien kerääminen, esialtistus välittömästi hedelmöitymisen jälkeen lasiastioissa, hedelmöityneiden munien valinta käänteismikroskoopilla tai kaksiokulaarisella mikroskoopilla ja niiden jakaminen 24-kuoppalevyihin, joissa on kutakin testipitoisuutta/kontrolliliuosta, n = testipitoisuutta/kontrolliliuosta kohti tarvittavien munien määrä (tässä 20), thj = tuntia hedelmöitymisen jälkeen.



▼M7

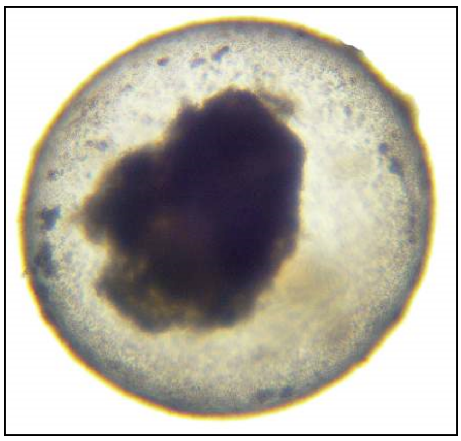
Lisäys 5

KUVASTO SEEPRAKALAN ALKIOILLA TEHTÄVÄN AKUUTIN TOKSISUUSTESTIN LETAALEISTA PÄÄTEPISTEISTÄ

Seuraavat apikaaliset päätepisteet ovat osoitus akuutista toksisuudesta ja siten alkioiden kuolemasta: *alkion koaguloituminen, hännän irtoamattomuus, somiittien muodostumattomuus ja sydämenlyöntien puute*. Seuraavat mikroskooppikuvat on valittu havainnollistamaan näitä päätepisteitä.

Kuva 1

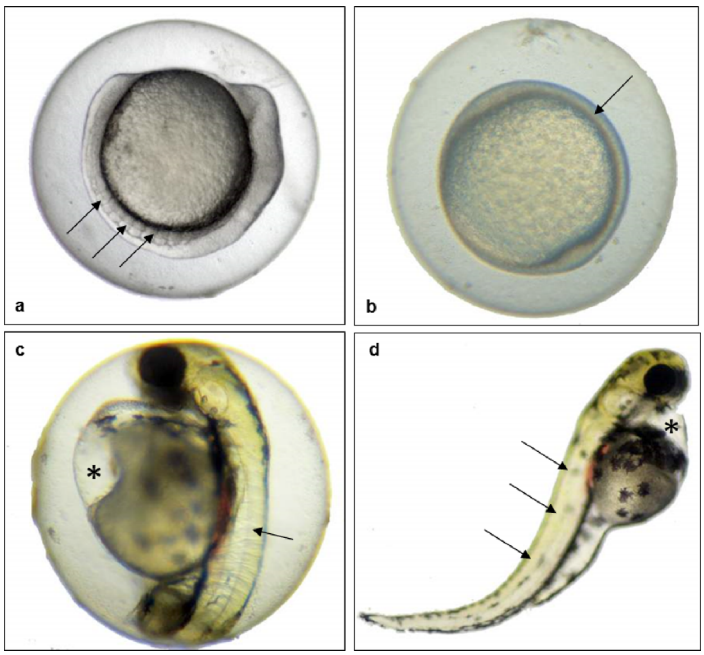
Alkion koaguloituminen:



Helotaustavalaistuksessa koaguloituneissa seeprakalan alkioissa näkyy erilaisia läpinäkymättömiä osia.

Kuva 2

Somiittien muodostumattomuus:

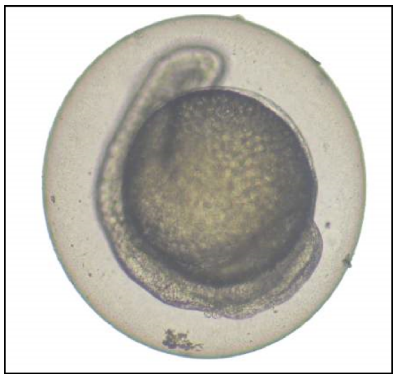


▼M7

Vaikka 24 tuntia vanhan seeprakalan alkion kehitys on myöhässä noin 10 tuntia, siinä näkyy kuvassa (a) hyvin kehittyneitä somiitteja (→), kun taas kuvan (b) alkiossa ei näy mitään merkkejä somiittien muodostumisesta (→). Vaikka kuvan (c) 48 tuntia vanha seeprakalan alkiolla on selvä ruskuaispussin ödeema, siinä näkyy selvää somiittien muodostumista (→), kun taas kuvassa (d) 96 tuntia vanhassa seeprakalan alkiossa ei näy mitään merkkejä somiittien muodostumisesta (→). Huomaa myös kuvassa (d) olevan alkion selkärangan kieroutuma (skolioosi) sekä perikardiaalinen ödeema (*).

Kuva 3

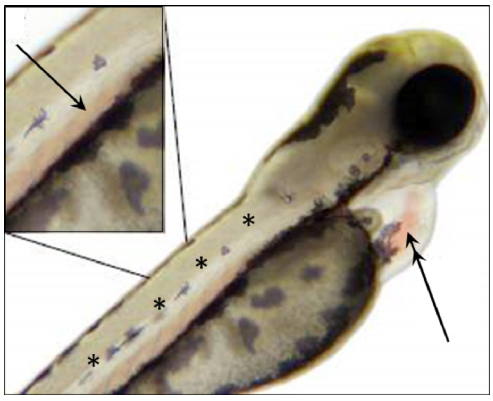
Häntäsilmun irtoamattomuus sivulta nähtynä



(a: →; 96 tuntia vanha seeprakalan alkio). Huomaa myös näkörakkulan puuttuminen (*).

Kuva 4

Sydämenlyöntien puutetta



Sydämenlyöntien puutetta on luonnollisesti vaikea kuvata mikroskooppikuvassa. Sydämenlyöntien puutetta osoittaa se, että sydän ei supistu (kaksoisnuoli). Verisolujen liikkumattomuus esimerkiksi vatsa-aortassa (→ pienemmässä kuvassa) ei ole osoitus sydämenlyöntien puutteesta. Huomaa myös somiittien muodostumattomuus tässä alkiossa (*, lihaskudosten homogeeninen eikä segmentaalinen ulkonäkö). Sydämenlyöntien puutteen kirjaamiseksi vaadittava havainnointiaika on vähintään yksi minuutti vähintään 80-kertaisella suurennuksella.

▼M7

C.50. SEDIMENTITÖN *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* -LAJILLA TEHTÄVÄ TOKSISUUSTESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 238 (2014). Sillä arvioidaan kemikaalien toksisuutta *Myriophyllum spicatum* -lajille (tähkä-ärviä), joka on ärviöihin kuuluva kaksisirkkainen uposvesikasvi. Menetelmä perustuu olemassa olevaan ASTM-testimenetelmään (1), joka on muutettu sedimentittömäksi testijärjestelmäksi (2) testikemikaalien todellisen ekotoksisuuden (joka ei riipu testikemikaalin jakautumisesta veden ja sedimentin välillä) arvioimiseksi. Sedimentittömässä testijärjestelmässä analysointi on yksinkertaista (vain vesifaasissa), ja tuloksia voidaan analysoida rinnakkain ja/tai vertaillen limaskoilla (*Lemna sp.*) tehdystä testistä (3) saatujen tulosten kanssa; lisäksi vaadittavien steriilien olosuhteiden avulla mikro-organismien ja levien vaikutukset (muun muassa kemikaalin kulutus/hajoaminen) voidaan pitää mahdollisimman vähäisinä. Tämä testi ei korvaa muita vesieliötoksisuutta koskevia testejä; sen tarkoituksena on pikemminkin täydentää niitä ja mahdollistaa kattavampi vesikasveille aiheutuvan vaaran ja riskin arviointi. Tämä testimenetelmä on validoitu kansainvälisellä yhteistutkimuksella (ring test) (4).

2. Testimenetelmässä kuvataan yksityiskohtaisesti testausta, jossa testiliuos vaihtuu (semistaattinen) tai ei vaihdu (staattinen menetelmä). Testin tavoitteista ja sääntelyvaatimuksista riippuen on suositeltavaa harkita semistaattisen menetelmän käyttöä muun muassa sellaisten aineiden testauksessa, jotka häviävät nopeasti liuoksesta haihtumisen, adsorboitumisen, valohajoamisen, hydrolyysin, saostumisen tai biohajoavuuden vuoksi. Tästä annetaan tarkempia ohjeita kirjallisuusviitteessä (5). Tätä testimenetelmää sovelletaan aineisiin, joita varten testimenetelmä on validoitu (ks. lähemmin kansainvälisen yhteistutkimuksen raportti (4)) tai valmisteisiin tai tunnettuihin seoksiin; seosta testattaessa sen ainesosat on mahdollisimman pitkälti tunnistettava ja määritettävä kvantitatiivisesti. Sedimentitön *Myriophyllum spicatum* -testimenetelmä täydentää vesisedimenttijärjestelmässä tehtävää *Myriophyllum spicatum* -toksisuustestiä (6). Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen sääntelytarkoituksiin, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

TESTIN PERIAATE

3. Jatkuvasti kasvavien *Myriophyllum spicatum* -lajin kasviviljelmien (vain Andrewsin elatusaineen muunnoksessa, ks. lisäys 2) 14 päivän ajan monokulttuureina testiaineen eri pitoisuuksissa sedimentittömässä testijärjestelmässä. Testin tavoitteena on kvantifioida testikemikaaliin liittyvät vaikutukset kasvien kasvuun tämän ajan kuluessa tiettyjen mittausmuuttujien arvioinnin perusteella. Versojen, sivuhaarojen ja juurien pituuden kasvu sekä tuoreja kuivapainon kehitys ja kiehkuroiden lisääntyminen ovat mittausmuuttujia. Lisäksi huomioon otetaan koe-eliöiden selvästi erottuvat kvalitatiiviset muutokset, kuten epämuotoisuus tai kloroosi ja nekroosi, joka ilmenee kellastumisena tai valkoisena ja ruskeana värinä. Testikemikaaliin liittyvien vaikutusten kvantifioimiseksi testiliuoksissa tapahtunutta kasvua verrataan kontrolleissa tapahtuneeseen kasvuun, minkä jälkeen määritetään pitoisuus, jossa kasvu estyy ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran. Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan EC_x-arvona, esimerkiksi EC_{10}, EC_{20} tai EC_{50}. On syytä huomata, että EC_{10}- ja EC_{20}-arvojen arviot ovat luotettavia ja asianmukaisia vain testeissä, joissa kontrollikasvien variaatiokertoimet ovat pienemmät kuin arvioitava vaikutustaso. Toisin sanoen vaikutuskertoimien on oltava < 20 prosenttia, jotta EC_{20}-arvo voidaan arvioida luotettavasti.

4. Käsittelemättömistä ja käsitellyistä kasveista on määritettävä sekä keskimääräinen spesifinen kasvunopeus (joka arvioidaan pääverson pituuden ja kolmen muun mittausmuuttujan määrittämisen perusteella) että tuotos (joka arvioidaan pääverson pituuden sekä kolmen muun mittausmuuttujan lisääntymisen perusteella). Spesifistä kasvunopeutta (r) ja tuotosta (y) käytetään

▼M7

tämän jälkeen E_rC_x-arvon (esimerkiksi E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) ja E_yC_x-arvon (esimerkiksi E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) määrittämiseen.

5. Tilastollisesti voidaan määrittää myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

6. Käytettävissä on oltava analyysimenetelmä, jolla testiviljelyaineessa oleva testikemikaali voidaan kvantifioida riittävän herkästi. Testikemikaalia koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, puhtaus ja epäpuhtaudet, vesiliukoisuus, stabiilius vedessä ja valossa, hapon dissosiaatiovakio (pK_a), jakaantumiskerroin oktanoli/vesi (K_{ow}), höyrynpaine ja biohajoavuus. Vesiliukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää merkittävästi testin aikana. Tämän perusteella voidaan päättää, vaativatko tällaiset häviöt erityistoimia. Jos testikemikaalin liukoisuutta ja stabiiliutta koskevat tiedot ovat epäluotettavia, nämä ominaisuudet olisi arvioitava testiolosuhteissa, toisin sanoen siinä viljelyaineessa, lämpötilassa ja valaistuksessa, joita testissä käytetään.

7. Testiviljelyaineen pH:n tarkistaminen on erityisen tärkeää esimerkiksi testattaessa metalleja tai hydrolyyttisesti epästabiileja aineita. OECD:n ohjeasiakirjassa (5) annetaan lisäohjeita sellaisten kemikaalien testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

TESTIN VALIDITEETTI

8. Jotta testi olisi validi, pääverson pituuden on kaksinkertaistuttava kontrolliviljelmässä alle 14 päivässä. Käytettäessä tässä testimenetelmässä kuvattuja testiliuoksia ja -olosuhteita tämä vaatimus voidaan täyttää käyttämällä staattista tai semistaattista testausta.

9. Versojen tuorepainon määrityksiin perustuvan tuoton (testin aloittamisesta testi päättämiseen) sekä muiden mittausmuuttujien (ks. 37 kohta) keskimääräinen variaatiokerroin kontrolliviljelmien välillä ei saa olla yli 35 prosenttia rinnakkaisnäytteiden välillä.

10. Yli 50 prosenttia kontrolliryhmän rinnakkaisnäytteistä pidetään steriileinä koko 14 päivää kestävän altistusajan. Tämä tarkoittaa, että niissä ei ole muita organismeja, kuten leviä, sieniä ja bakteereita, näkyvinä epäpuhtauksina (kirkas liuos). *Huom.* Ohjeita steriiliyden arvioinnista annetaan kansainvälisen yhteistutkimuksen raportissa (4).

VERTAILUKEMIKAALI

11. Vertailukemikaali(t), kuten kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (4) käytetty 3,5-dikloorifenoli, voidaan testata testimenettelyn tarkistamiseksi; kansainvälisen yhteistutkimuksen tietojen mukaan 3,5-dikloorifenolin keskimääräiset EC_{50}-arvot eri vastemuuttujille (ks. tämän testimenetelmän 37–41 kohta) ovat 3,2–6,9 mg/l (tarkempia tietoja näiden arvojen luottamusvälistä on kansainvälisen yhteistutkimuksen raportissa). Vertailukemikaali on suotavaa testata vähintään kahdesti vuodessa tai, jos testausta tehdään harvemmin, rinnakkain määritettäessä testikemikaalin toksisuutta.

▼M7

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

12. Kaikkien välineiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Viljelyyn ja testaukseen käytettävien lasiastioiden on oltava steriilejä ja ne on puhdistettava kemiallisista epäpuhtauksista, jotka voivat päästä testiviljelyaineeseen. Koeastioiden on oltava niin korkeita, että eri versot voivat kasvaa kontrolliastioissa vesifaasissa ulottumatta testiviljelyaineen pintaan testin lopussa. Koeastioiksi suositellaan paksuseinäisiä borosilikaattilasista valmistettuja reunuksettomia koeputkia, joiden sisähalkaisija on noin 20 mm ja pituus noin 250 mm ja joissa on alumiinitulpat.

13. Koska muunnettu Andrewsin kasvualusta sisältää sakkaroosia (joka stimuloi sienten ja bakteerien kasvua), testiliuokset on valmistettava steriileissä olosuhteissa. Kaikki nesteet sekä laitteet on steriloitava ennen käyttöä. Sterilointi tehdään 4 tuntia kestävällä kuumailmakäsittelyllä (210 °C) tai autoklavoimalla 20 minuutin ajan lämpötilassa 121 °C. Lisäksi kaikki pullot, maljat, kulhot ja muut tarvikkeet liekitetään steriilillä työpöydällä välittömästi ennen käyttöä.

14. Viljelmiä ja koeastioita ei saa säilyttää toistensa kanssa. Sen vuoksi on paras käyttää erillisiä ilmastoituja kasvatuskaappeja, inkubaattoreita tai huoneita. Valaistuksen ja lämpötilan on oltava säädettävissä, ja ne on pidettävä tasaisina.

Koe-eliö

15. *Myriophyllum spicatum* on ärviöiden sukuun kuuluva kaksisirkkainen uposkasvilaji. Kesäkuusta elokuuhun sen vaaleanpunertavat huomaamattomat kukat kurottuvat vedenpinnan yläpuolelle. Kasvit juurtuvat pohjaan lujilla juurakoilla, ja niitä tavataan koko pohjoisella pallonpuoliskolla rehevöityneissä, mutta pilaantumattomissa ja kalkkipitoisissa rauhallisissa mutapohjaisissa vesissä. *Myriophyllum spicatum* viihtyy parhaiten makeassa vedessä, mutta sitä tavataan myös murtovesissä.

16. Sedimentitöntä toksisuustestiä varten tarvitaan steriilejä kasveja. Jos testilaboratoriolla ei ole *Myriophyllum spicatum* -lajin kantaviljelmiä, steriili kasvimateriaali voidaan hankkia toisesta laboratoriosta tai (epästeriili) kasvimateriaali voidaan kerätä luonnosta tai hankkia kaupalliselta toimittajalta; jos kasvit kerätään luonnosta, lajimääritys on todennettava taksonomisesti. Jos kasvit kerätään luonnosta tai hankitaan kaupalliselta toimittajalta, ne on steriloitava (1) ja niitä on viljeltävä testissä käytettävässä viljelyaineessa vähintään kahdeksan viikkoa ennen käyttöä. Paikoissa, joista alkuviljelmien kasvit kerätään, ei saa olla ilmeisiä kontaminaatiolähteitä. Kerättäessä *Myriophyllum spicatum* -kasveja luonnosta on varmistettava huolellisesti, että kerätään oikeaa lajia, erityisesti alueilla, jossa se voi risteytyä muiden *Myriophyllum*-lajien kanssa. Jos kasvit hankitaan toisesta laboratoriosta, niitä on viljeltävä vastaavalla tavalla kolmen viikon ajan. Kasvimateriaalin lähde sekä testauksessa käytettävät lajit on aina ilmoitettava.

17. Testissä käytettävät kasvit on valittava huolellisesti, koska niiden laatu ja yhtenäisyys vaikuttavat merkittävästi testin tulokseen. Testissä on käytettävä nuoria, nopeasti kasvavia kasveja, joissa ei ole näkyviä vaurioita tai värimuutoksia (kloroosia). Koe-eliön valmistelu on kuvattu yksityiskohtaisesti lisäyksessä 4.

Viljely

18. Viljelmien ylläpidon helpottamiseksi (esimerkiksi silloin, kun *Myriophyllum*-testejä ei aiota tehdä tiettynä aikana) niitä voidaan säilyttää normaalia heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa (50 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, 20 ± 2 °C). Viljelyä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 3.

▼M7

19. Riittävä määrä koe-eliöitä siirretään aseptisesti vähintään 14–21 päivää ennen testausta tuoreeseen steriiliin viljelyaineeseen, ja niitä viljellään 14–21 päivän ajan testiolosuhteissa esiviljelmänä. Esiviljelyä on kuvattu yksityiskohtaisesti lisäyksessä 4.

Testiviljelyaine

20. *Myriophyllum spicatum* -lajia varten suositellaan vain yhtä viljelyainetta sedimentittömässä testijärjestelmässä lisäyksen 2 mukaisesti. Andrewsin kasvualustan muunnosta suositellaan *Myriophyllum spicatum* -lajin viljelyyn ja sillä tehtävään testaukseen kirjallisuusviitteen (1) mukaisesti. Muutettu Andrewsin kasvualusta sekoitetaan viidestä erikseen valmistetusta kantaravinneliuoksesta lisäämällä 3 prosenttia sakkaroosia. Esiviljelyä käsitellään tarkemmin lisäyksessä 2.

21. Kymmenkertaisesti tiivistettyä muutettua Andrewsin kasvualustaa tarvitaan testiliuosten valmistamiseen (tarvittaessa laimentamalla). Tämän viljelyaineen koostumus esitetään lisäyksessä 2.

Testiliuokset

22. Testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla kantaliuosta. Testikemikaalin kantaliuokset valmistetaan tavallisesti liuottamalla kemikaali demineralisoituun (eli tislattuun tai deionisoituun) veteen. Ravinteet lisätään käyttämällä kymmenkertaisesti tiivistettyä muutettua Andrewsin kasvualustaa.

23. Testikemikaalin kantaliuokset voidaan steriloida autoklavoimalla ne 121 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan tai steriilin suodatuksen avulla edellyttäen, että käytettävä sterilointimenetelmä ei denaturoi testikemikaalia. Testiliuokset voidaan myös valmistaa steriiliin demineralisoituun veteen tai viljelyaineeseen steriileissä olosuhteissa. Lämpövakaus ja adsorboituminen erilaisiin pintoihin on otettava huomioon testikemikaalin kantaliuosten sterilointimenettelyn valinnassa. Tästä syystä suositellaan, että kantaliuokset valmistetaan steriileissä olosuhteissa eli käyttämällä steriiliä materiaalia testikemikaalin liuottamiseen steriileissä olosuhteissa (esimerkiksi liekitykssterilointi, laminaarivirtauskuvut) steriiliin veteen. Tämä steriilien kantaliuosten valmistusmenetelmä on validi sekä aineille että seoksille.

24. Testikemikaalin suurin testattu pitoisuus ei yleensä saa ylittää kyseisen kemikaalin vesiliukoisuutta testiolosuhteissa. Jos testikemikaali liukenee huonosti veteen, voi olla tarpeen valmistaa kyseisestä kemikaalista väkevä kantaliuos tai dispersio käyttämällä orgaanista liuotinta tai dispergointiainetta, joilla voidaan helpottaa tarkkojen testikemikaalimäärien lisäämistä testiviljelyaineeseen sekä testikemikaalin dispersiota ja liukenemista. Tällaisten aineiden käyttöä on vältettävä mahdollisimman pitkälle. Jos liuottimia tai dispergointiaineita käytetään apuna testiliuosten valmistuksessa, niistä ei saa aiheutua fytotoksisuutta. Asetoni ja dimetyyliformamidi ovat esimerkkejä yleisesti käytetyistä liuottimista, jotka eivät aiheuta fytotoksisuutta pitoisuuden ollessa enintään 100 µl/l. Jos liuotinta tai dispergointiainetta käytetään, sen lopullinen pitoisuus on ilmoitettava ja pidettävä mahdollisimman pienenä (≤ 100 µl/l), ja liuottimeen tai dispergointiaineen pitoisuuden on oltava sama kaikissa käsitellyissä ja kontrolliliuoksissa. Dispergointiaineiden käytöstä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (5).

Testi- ja kontrolliryhmät

25. Sopivat testipitoisuudet on helpompi valita, jos testikemikaalin toksisuudesta *Myriophyllum spicatum* -lajille on saatavilla aiempia tietoja esimerkiksi alustavista pitoisuusalueen määrityskokeista. Lopullisessa toksisuustestissä on

▼M7

yleensä oltava vähintään viidestä (kuten limaskojen kasvunestymistestissä, tämän liitteen C.26 luku) seitsemään testipitoisuutta, jotka muodostavat geometrisen sarjan; ne on valittava siten, että NOEC- ja EC_{50}-arvot ovat kyseisellä pitoisuusalueella (ks. jäljempänä). Testipitoisuuksien suhdeluvun ei tulisi olla suurempi kuin 3,2, mutta suurempikin suhdeluku sallitaan, jos pitoisuus-vastekäyrä on laakea. Jos käytetään alle viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Jokaisesta testipitoisuudesta on tehtävä vähintään kolme toistoa.

26. Valittaessa testin pitoisuusaluetta (pitoisuusalueen määritystä ja/tai lopullista toksisuustestiä varten) on otettava huomioon seuraavat näkökohdat:

EC_x-pitoisuuden määrittämiseksi testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta saavutettaisiin riittävä luottamustaso. Esimerkiksi EC_{50}-pitoisuutta arvioitaessa suurimman testipitoisuuden on ylitettävä EC_{50}-arvo. Jos EC_{50}-arvo on testin pitoisuusalueen ulkopuolella, vastaavat luottamusvälit ovat suuria, jolloin voi olla mahdotonta arvioida mallin tilastollista sopivuutta.

Jos tavoitteena on arvioida LOEC- tai NOEC-pitoisuus, pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, että kasvu ei ole merkittävästi vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Suurimman testipitoisuuden on myös oltava niin suuri, että kasvu on huomattavasti vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Muussa tapauksessa testi on toistettava käyttämällä toista pitoisuusaluetta (jollei suurin pitoisuus ole liukoisuusrajalla tai jollei se ole suurin vaadittu rajapitoisuus, esimerkiksi 100 mg/l).

27. Jokaiseen testiin on sisällyttävä kontrolleja, joissa ravinneliuos, koe-eliö (valitaan mahdollisimman homogeeninen kasvimateriaali, tuoreita sivuhaaroja esiviljelmistä, jotka lyhennetään 2,5 cm:n mittaisiksi haaran juuresta mitattuna), ympäristöolosuhteet ja menettelyt ovat samat kuin testiryhmässä mutta ilman testikemikaalia. Jos apuna käytetään liuotinta tai dispergointiainetta, testiin on kuuluttava ylimääräinen kontrollikäsittely, jossa liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuus on sama kuin testikemikaalia sisältävissä astioissa. Toistoissa kontrolliastioiden (ja liuotinta käytettäessä liuotinta sisältävien astioiden) lukumäärän on oltava vähintään kymmenen.

28. Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, testimenetelmää voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden. Kontrollitoistoja on kuitenkin oltava vähintään kymmenen.

Altistus

29. Tuoreita sivuhaaroja, jotka on lyhennetty 2,5 cm:n mittaisiksi tyvestä mitattuna, siirretään esiviljelmästä ja jaetaan satunnaisesti koeastioihin aseptisissa olosuhteissa. Jokaisessa koeastiassa on oltava yksi 2,5 cm:n pituinen sivuttaishaara, jonka yhdessä päässä on oltava apikaalimeristeemi. Valitun kasvimateriaalin olisi oltava laadultaan samanlaista jokaisessa koeastiassa.

30. Koeastiat on sijoitettava inkubaattoriin satunnaistetusti, jotta valon voimakkuuden ja lämpötilan spatiaalisista eroista johtuvat vaikutukset olisivat mahdollisimman pienet. Vaatimuksena on myös, että jokaisella havainnointikerralla käytetään lohkoittaista järjestystä tai astioiden satunnaistettua uudelleensijoittelua (joka voidaan tehdä useamminkin)

31. Jos alustava stabiiliustesti osoittaa, että testikemikaalin pitoisuutta ei voida pitää yllä testin ajan eli 14 päivää (toisin sanoen mitattu pitoisuus vähenee alle 80 prosenttiin mitatusta alkupitoisuudesta), on suositeltavaa käyttää semistaattista testijärjestelmää. Siinä tapauksessa kasvit on altistettava vastavalmistetuille testi- ja kontrolliliuoksille ainakin kerran testin aikana (esimerkiksi päivänä 7). Testikemikaalin stabiiliudesta riippuu, kuinka usein koloniat

▼M7

on altistettava vastavalmistetulle viljelyaineelle. Testattaessa hyvin epästabiileja tai haihtuvia kemikaaleja pitoisuuksien pitäminen lähes vakioina voi vaatia useampia altistuskertoja.

32. Tähän testimenetelmään ei kuulu versojen altistaminen ruiskuttamalla.

Testiolosuhteet

33. Testissä käytetään lämpimän- tai kylmänvalkoista loistevaloa, jotta valon säteilyvoimakkuudeksi saadaan 100–150 μE m^{-2} s^{-1}, kun se mitataan fotosyynteesille suotuisalla aallonpituusalueella (400–700 nm) pisteissä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin koeastioiden pohjat (tämä vastaa voimakkuusaluetta 6 000–9 000 luksia), ja valoisien ja pimeiden jaksojen kestot ovat 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää.Valoilmaisin- ja valonmittausmenetelmä ja erityisesti anturityyppi vaikuttavat mittausarvoon. Pallomaiset anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) ja kosinikorjaimella varustetut anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta) ovat suositeltavampia kuin yksisuuntaiset anturit. Ensin mainitut antavat suurempia lukemia mitattaessa tässä kuvatun kaltaista monipisteistä valonlähdettä.

34. Lämpötilan on oltava koeastioissa 23 ± 2 °C. Erityistapauksissa, esimerkiksi testattaessa epästabiileja kemikaaleja tai metalleja, on kiinnitettävä erityistä huomiota pH:n vaihteluun; pH-arvon on pysyttävä välillä 6–9. Tästä annetaan lisäohjeita kirjallisuusviitteessä (5).

Kesto

35. Testi päättyy 14 päivän kuluttua kasvien siirtämisestä koeastioihin.

Mittaukset ja analyyttiset määritykset

36. Testin alussa koe-eliön pääverson pituus on 2,5 cm (ks. 29 kohta); se mitataan mittaviivaimella (ks. lisäys 4) tai valokuvaamalla ja kuva-analyysillä. Normaaleilta tai epänormaaleilta vaikuttavien koe-eliöiden pääverson pituus määritetään testinalussa, ainakin kerran 14 päivää kestävän altistusjakson aikana ja testin päättyessä. Huomautus: Jos kuva-analyysiä ei ole käytettävissä, pääverson pituuden mittaamiseen testin alussa ja sen aikana voidaan vaihtoehtoisesti käyttää myös steriiliä mittaviivainta edellyttäen, että työpöytä steriloidaan ennen kasvien laittamista koeastioihin. Kasvien kehityksessä tapahtuvat muutokset, esimerkiksi versojen epämuodostumat, merkit nekroosista tai kloroosista, hajoaminen tai kelluvuuden heikkeneminen sekä muutokset juurien pituudessa ja ulkonäössä, rekisteröidään. Lisäksi on rekisteröitävä testiviljelyaineen erityiset ominaisuudet (esimerkiksi liukenemattoman materiaalin esiintyminen ja levien, sienien ja bakteerien kasvu koeastiassa).

37. Pääverson pituuden määrittämisen lisäksi testin aikana arvioidaan myös testikemikaalin vaikutuksia kolmeen (tai useampaan) seuraavista mittausmuuttujista:

i. Sivuhaarojen kokonaispituus

ii. Versojen kokonaispituus

iii. Juurien kokonaispituus

iv. Tuorepaino

v. Kuivapaino

vi. Kiehkuroiden määrä

▼M7

Huomautus 1: Alueenmäärityskokeen aikana tehdyt havainnot voivat auttaa valitsemaan merkitykselliset muut mitattavat muuttujat edellä luetelluista kuudesta muuttujasta.

Huomautus 2: Tuore- ja kuivapainon (muuttujat iv ja v) määrittäminen on erittäin suositeltavaa.

Huomautus 3: Koska sakkaroosi ja valo (juurien altistaminen valolle testin aikana) voi vaikuttaa auksiinin (kasvien kasvuhormoni) kuljettajiin ja eräiden kemikaalien vaikutustapa saattaa muistuttaa auksiinia, juuria koskevan päätepisteen (muuttuja iii) mukaan ottaminen on kyseenalaista.

Huomautus 4: Kansainvälisen yhteistutkimuksen tulokset osoittavat, että sivuhaarojen kokonaispituuden (muuttuja i) variaatiokertoimet ovat suuria (> 60 prosenttia). Sivuhaarojen kokonaispituus sisältyy joka tapauksessa versojen kokonaispituuden (muuttuja ii) mittaamiseen, jonka variaatiokertoimet ovat hyväksyttävämmällä tasolla (< 30 prosenttia).

Huomautus 5: Edellä esitettyjen näkökohtien perusteella suositellut tärkeimmät mitattavat päätepisteet ovat: versojen kokonaispituus, tuorepaino ja kuivapaino (muuttujat ii, iv ja v); muuttuja vi – kiehkuroiden määrä – jätetään kokeen suorittajan harkinnan varaan.

38. Pääverson pituudella ja kiehkuroiden määrällä on se etu, että ne voidaan määrittää jokaisen testi- ja kontrolliastian osalta testin alussa, sen aikana ja sen lopussa valokuvien ja kuva-analyysin avulla, joskin myös (steriiliä) mittaviivainta voidaan käyttää.

39. Sivuhaarojen kokonaispituus, juurien kokonaispituus (kaikkien sivuhaarojen tai juurien summa) ja versojen kokonaispituus (pääverson pituuden ja sivuhaarojen kokonaispituuden summa) voidaan mitata mittaviivaimella altistuksen lopussa.

40. Tuore- ja/tai kuivapaino on määritettävä testin alussa esiviljelmästä otetusta näytteestä, jonka on oltava edustava näyte testin käynnistämiseen käytetystä materiaalista, sekä testin lopussa jokaisesta testi- ja kontrolliastiasta otetusta kasvimateriaalista.

41. Sivuhaarojen kokonaispituus, versojen kokonaispituus, juurien kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino ja kiehkuroiden määrä voidaan määrittää seuraavasti:

i. Sivuhaarojen kokonaispituus: Sivuhaarojen kokonaispituus voidaan määrittää mittaamalla kaikki sivuhaarat mittaviivaimella altistuksen lopussa. Sivuhaarojen kokonaispituus on jokaisen testi- ja kontrolliastian kaikkien sivuhaarojen summa.

ii. Versojen kokonaispituus: Pääverson pituus voidaan määrittää kuva-analyysillä tai mittaviivaimella. Versojen kokonaispituus on jokaisen testi- ja kontrolliastian pääverson pituuden ja sivuhaarojen kokonaispituuden summa altistuksen lopussa.

iii. Juurien kokonaispituus: Juurien pituus voidaan määrittää mittaamalla kaikki sivuhaarat mittaviivaimella altistuksen lopussa. Juurien kokonaispituus on jokaisen testi- ja kontrolliastian kaikkien juurien summa.

iv. Tuorepaino: Tuorepaino voidaan määrittää punnitsemalla koe-eliöt altistuksen lopussa. Jokaisessa testi- ja kontrolliastiassa oleva kaikki kasvimateriaali huuhdotaan tislatulla vedellä ja imeytetään kuivaksi selluloosapaperiin.

▼M7

Tämän valmistelun jälkeen tuorepaino määritetään punnitsemalla. Testin alussa oleva biomassa (tuorepaino) määritetään samasta erästä otetun koe-eliönäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen.

v. Kuivapaino: Tuorepainon määrittämiseksi tehtyjen valmistelujen jälkeen koe-eliöt kuivataan 60 °C:n lämpötilassa, kunnes niiden paino on vakio. Tämä massa on kuivapaino. Testin alussa oleva biomassa (kuivapaino) määritetään samasta erästä otetun koe-eliönäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen.

vi. Kiehkuroiden määrä: Kaikki pääversosta kasvavat kiehkurat lasketaan.

Mittausten ja analyyttisten määritysten tiheys

42. Käytettäessä staattista testimenetelmää kunkin käsittelyn liuoksen pH on mitattava testin alussa ja lopussa. Jos testimenetelmä on semistaattinen, pH on mitattava jokaisesta erästä ”tuoretta” testiliuosta ennen kutakin vaihtoa ja myös vastaavista ”käytetyistä” liuoksista.

43. Valon voimakkuus kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa on mitattava pisteistä, jotka ovat samalla etäisyydellä valolähteestä kuin koe-eliöistä. Mittaukset on tehtävä ainakin kerran testin aikana. Viljelyaineen lämpötila surrogaattiastiassa, jota säilytetään kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa samoissa olosuhteissa, on mitattava vähintään kerran päivässä (tai jatkuvasti tiedonkeruulaitteen avulla).

44. Testikemikaali(e)n pitoisuudet määritetään testin aikana sopivin väliajoin. Staattisissa testeissä vähimmäisvaatimuksena on määrittää pitoisuudet testin alussa ja lopussa.

45. Semistaattisissa testeissä, joissa testikemikaali(e)n pitoisuuksien ei oleteta pysyvän ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, on analysoitava kaikki vastavalmistetut testiliuokset ja samat liuokset käytettyinä kunkin vaihdon yhteydessä. Kuitenkin niissä testeissä, joissa testikemikaali(e)n mitatut alkupitoisuudet eivät ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta joissa voidaan antaa riittävä näyttö siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista. Kaikissa tapauksissa on testipitoisuudet ennen vaihtoa määritettävä vain yhdestä toistossa käytetystä astiasta (tai kaikkien toistoissa käytettyjen astioiden yhdistetystä sisällöstä) kutakin testipitoisuutta kohden.

46. Jos on näyttöä siitä, että testipitoisuus on pysynyt tyydyttävästi ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin. Jos pitoisuus poikkeaa enemmän kuin ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta, tulosten analysoinnin on perustuttava pitoisuuksien geometriseen keskiarvoon altistuksen aikana tai malleihin, jotka kuvaavat testikemikaalin pitoisuuden vähenemistä (5).

Raja-annostesti

47. Joissakin tapauksissa, esimerkiksi silloin, kun alustava testi osoittaa, että testikemikaalilla ei ole myrkkyvaikutuksia pitoisuusarvoon 100 mg/l saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testikemikaalilla on testiviljelyaineessa, tai jos kyseessä on formulaatti, sen dispergoituvuusrajaan asti, voidaan tehdä raja-annostesti, jossa verrataan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn

▼M7

ryhmän vasteita (pitoisuudessa 100 mg/l tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa). On erittäin suotavaa analysoida altistuspitoisuus raja-annostestin tueksi. Kaikki edellä kuvatut testiolosuhteet ja validiteettivaatimukset koskevat myös raja-annostestiä, lukuun ottamatta käsiteltyjen toistojen määrää, joka on kaksinkertaistettava. Kontrolli- ja käsitellyssä ryhmässä tapahtunutta kasvua voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Vastemuuttujat

48. Testin tarkoituksena on määrittää testikemikaalin vaikutukset *Myriophyllum spicatum* -lajin kasvuun. Tässä testimenetelmässä kuvataan kahta eri vastemuuttujaa.

a) Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä seuraavien kahden muuttujan avulla: pääverson pituuden logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos ja jonkin toisen mittausmuuttujan (versojen kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän) logaritmiarvossa tietyn (päivinä ilmaistun) ajan kuluessa tapahtunut muutos. *Huom.* Sivuhaarojen kokonaispituutta ja juurien kokonaispituutta koskevien mittausmuuttujien osalta keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden laskeminen ei ole mahdollista. Testin alussa koe-eliöllä ei ole sivuhaaroja eikä juuria (esiviljelmän valmistelun vuoksi); koska alkuarvona on nolla, keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden laskentaa ei ole määritetty.

b) Tuotos: Tämä vastemuuttuja lasketaan seuraavien kahden muuttujan avulla: pääverson pituuden muutokset ja jonkin toisen mittausmuuttujan – mieluiten versojen kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän tai muiden hyödyllisiksi katsottujen muuttujien – muutokset kontrolleissa ja kussakin käsitellyssä ryhmässä testin loppuun saakka.

49. Toksisuuden arviointien on perustuttava pääverson pituuteen ja kolmeen muuhun mittausmuuttujaan (mieluiten versojen kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino tai kiehkuroiden määrä, ks. 37 kohta ja tämän kohdan huomautukset 2, 4 ja 5), koska eräät kemikaalit voivat vaikuttaa enemmän muihin mittausmuuttujiin kuin pääverson pituuteen. Tätä vaikutusta ei havaittaisi laskemalla pelkästään pääverson pituus.

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus

50. Tietyn ajanjakson keskimääräinen spesifinen kasvunopeus lasketaan kasvumuuttujien – pääverson pituuden ja kolmen muun mittausmuuttujan (esimerkiksi versojen kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän) – logaritmisena kasvuna soveltamalla seuraavaa kaavaa kaikkiin kontrolliliuosten ja käsiteltyjen liuosten toistoihin:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln\left(N_j\right) - \ln\left(N_i\right)}{t}$$

jossa

μ_{i-j} = keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä i–j

N_i = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä i

N_j = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä j

t = aikaväli i–j.

▼M7

Kullekin testiryhmälle ja kontrolliryhmälle lasketaan kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

51. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on laskettava koko testijaksolta (edellä olevassa kaavassa hetki ”i” tarkoittaa testin alkua ja hetki ”j” testin päättymistä). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen. Sen lisäksi on määritettävä jaksoittaiset kasvunopeudet, jotta voidaan arvioida testikemikaalin vaikutuksia koko altistusaikana (esimerkiksi analysoimalla logaritmisia kasvukäyriä).

52. Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen (I_r) voidaan sen jälkeen laskea kutakin testipitoisuutta varten (käsittelyryhmässä) seuraavan kaavan avulla:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

jossa

% Ir = keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

μC = μ:n keskiarvo kontrolliryhmässä

μT = μ:n keskiarvo käsittelyryhmässä.

Tuotos

53. Tuotokseen kohdistuvat vaikutukset määritetään seuraavien mittausmuuttujien avulla: pääverson pituus ja kolme muuta mittausmuuttujaa (mieluiten versojen kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino tai kiehkuroiden määrä), jotka mitataan jokaisesta koeastiasta testin alussa ja lopussa. Jos toisena mittausmuuttujana käytetään tuorepainoa tai kuivapainoa, testin alussa oleva biomassa määritetään samasta erästä otetun koe-eliönäytteen avulla, jota on käytetty koeastioiden siirrostamiseen. Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan tuotoksen keskiarvo varianssiestimaatteineen. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen (% I_y) voidaan laskea kutakin käsittelyryhmää varten seuraavasti:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

jossa

% Iy = tuotoksen prosentuaalinen estyminen

bC = kontrolliryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa

bT = käsittelyryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa.

Kaksinkertaistumisaika

54. Seuraavan kaavan avulla, jota sovelletaan kontrolliastioita koskeviin tietoihin, voidaan määrittää pääverson pituuden kaksinkertaistumisaika (T_d) ja varmistaa samalla, että testi täyttää tämän validiteettivaatimuksen (ks. 8 kohta):

$T_d = \ln 2 / \mu$

Kaavassa μ on keskimääräinen spesifinen kasvunopeus, joka lasketaan 50–52 kohdassa kuvatulla tavalla.

▼M7

Pitoisuus-vastekäyrien piirtäminen

55. Pitoisuus-vastekäyrät piirretään merkitsemällä y-akselille vastemuuttujan keskimääräinen prosentuaalinen estyminen (vastemuuttujana on I_r tai I_y, joka lasketaan 53 kohdan mukaan) ja x-akselille testiaineen pitoisuuden logaritmi.

EC_x-pitoisuuden arviointi

56. EC_x-pitoisuuden estimaattien on perustuttava sekä keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen (E_rC_x) että tuotokseen (E_yC_x). Näistä kummankin on puolestaan perustuttava pääverson pituuteen ja mahdollisesti johonkin toiseen mittausmuuttujaan (mieluiten versojen kokonaispituuteen, tuorepainoon, kuivapainoon tai kiehkuroiden määrään), koska eräät kemikaalit vaikuttavat eri tavalla pääverson pituuteen kuin muihin mittausmuuttujiin. Tavoitteena on siis saada toksisuusparametreiksi seuraavat neljä EC_x-arvoa kutakin laskettua kasvunestymistasoa x kohden: E_rC_x (pääverson pituus); E_rC_x (mieluiten versojen kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino tai kiehkuroiden määrä); E_yC_x (pääverson pituus); ja E_yC_x (mieluiten versojen kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino tai kiehkuroiden määrä).

57. On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut EC_x-arvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat useimmiten suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen.

Tilastomenetelmät

58. Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus-vastesuhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logitti- tai Weibull-malleilla (7) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten analyysiä (7). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (8), (9) ja (10) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista.

59. Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus-vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaatit. Jokaiselle estimaatille on määritettävä 95 prosentin luottamusväli, jos se on mahdollista. Vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja.

60. EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit saadaan myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (10), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

61. LOEC-pitoisuuden ja siten myös NOEC-pitoisuuden arvioimiseksi on verrattava käsiteltyjen liuosten keskiarvoja käyttämällä varianssianalyysitekniikoita (ANOVA). Sen jälkeen kunkin pitoisuuden keskiarvoa verrataan kontrolliryhmän keskiarvoon käyttämällä sopivaa moniulotteista vertailumenetelmää tai trenditestimenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testi voi olla käyttökelpoinen (12) (13) (14) (15) (16). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Arviointi voidaan tehdä graafisesti tai virallisen testin avulla (15). Sopivia testejä ovat Levenen ja

▼M7

Bartlettin testit. Jos oletus varianssin homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Jonckheeren alaspäin askeltava trenditesti. Kirjallisuusviitteessä (10) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

62. Tieteen viimeaikaisen kehityksen perusteella on suositeltu, että NOEC-käsitteestä luovuttaisiin ja se korvattaisiin regressioanalyysiin perustuvilla EC_x:n piste-estimaateilla. Sopivaa x:n arvoa ei ole vielä vahvistettu tätä *Myriophyllum*-testiä varten. Sopivalta kuitenkin vaikuttaisi väli 10–20 prosenttia (valitun vastemuuttujan mukaan), ja suositeltavaa on ilmoittaa sekä EC_{10}- että EC_{20}-arvo.

Raportointi

63. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testilajit

— tieteellinen nimi ja alkuperä.

Testiolosuhteet

— käytetty testimenettely (staattinen tai puolistaattinen)

— testin alkamispäivä ja kesto

— testiviljelyaine

— koejärjestely: koeastiat ja niiden sulkimet, liuostilavuudet, pääverson pituus koeastiaa kohden testin alussa

— testipitoisuudet (nimellis- ja mitatut pitoisuudet tapauksen mukaan) sekä toistojen määrä pitoisuutta kohden

— kanta- ja testiliuosten valmistusmenetelmät, mukaan luettuina tiedot mahdollisesta liuottimen tai dispergointiaineen käytöstä

— lämpötila testin aikana

— valolähde, valon voimakkuus ja homogeenisuus

— testi- ja kontrolliviljelyaineen pH-arvot

— testikemikaalin analyysimenetelmä sekä laadunarviointiin tarvittavat tiedot (validointitutkimukset, analyysien keskihajonnat ja luottamusvälit)

▼M7

— pääverson pituuden ja muiden mittausmuuttujien, esimerkiksi sivuhaarojen kokonaispituuden, versojen kokonaispituuden, juurien kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän määrittämismenetelmät

— kunkin testi- ja kontrolliastian viljelmän tila (steriili vai epästeriili) kullakin havainnointikerralla

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä,

Tulokset

— käsittelemättömät tiedot: pääverson pituus ja muut mittausmuuttujat jokaisessa testaukseen ja toistoihin käytetyssä koeastiassa kullakin havainnointi- ja analysointikerralla

— kunkin mittausmuuttujan keskiarvot ja keskihajonnat

— kunkin mittausmuuttujan kasvukäyrät

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin

— pitoisuuden ja vaikutuksen välisen suhteen graafinen esitys

— toksisuusarvioinnin päätepisteiden estimaatit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, EC_{10} ja EC_{20}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja/tai NOEC-pitoisuus, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi vähiten merkitsevä erotus)

— mahdollinen kasvun edistyminen käsittelyissä liuoksissa

— näkyvät merkit fytotoksisuudesta ja testiliuoksia koskevat havainnot

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) ASTM Designation E 1913–04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(1) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, s. 702–710.

(2) Tämän liitteen luku C.26: *Limaskojen (Lemna-lajien)* kasvunestymistesti.

(3) OECD (2014), ”*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(4) OECD (2000), ”Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(5) Tässä liitteessä oleva C.51 luku: *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävä toksisuustesti vesisedimenttijärjestelmässä

▼**M7**

(6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, s. 713–718.

(7) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, s. 157–167.

(8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, s. 1485–1494.

(9) OECD (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(10) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, s. 1096–1121.

(12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, s. 482–491.

(13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, s. 103–117.

(14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, s. 519–531.

(15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, s. 93–96.

▼M7

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin tuore- ja/tai kuivapaino. Tässä testissä biomassa on pääverson, kaikkien sivuhaarojen ja kaikkien juurien summa.

EC_x: Testiviljelyaineeseen liuenneen testikemikaalin pitoisuus, jossa *Myriophyllum spicatum* -kasvin kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia ”E_rC” ja jälkimmäisestä symbolia ”E_yC”, joiden jälkeen mainitaan mittausmuuttuja, esimerkiksi E_rC (pääverson pituus).

Kasvu: mittausmuuttujan, kuten pääverson pituuden, sivuhaarojen kokonaispituuden, versojen kokonaispituuden, juurien kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän, kasvaminen testijakson aikana.

Kasvunopeus (keskimääräinen spesifinen kasvunopeus): mitattavan muuttujan logaritminen kasvu altistuksen aikana. *Huom.* Kasvunopeuteen liittyvät vastemuuttujat ovat riippumattomia testin kestosta, jos altistamattomien kontrollieliöiden kasvu on eksponentiaalista.

Kemikaali: aine tai seos.

Kloroosi: koe-eliön, erityisesti kiehkuroiden, värin muutos vihreästä kellertäväksi.

Mittausmuuttujat: Kaikentyyppiset muuttujat, jotka mitataan testin päätepisteen ilmaisemiseksi yhden tai useamman erilaisen vastemuuttujan avulla. Tässä testimenetelmässä mittausmuuttujia ovat pääverson pituus, sivuhaarojen kokonaispituus, versojen kokonaispituus, juurien kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino ja kiehkuroiden määrä.

Monokulttuuri: yhtä kasvilajia sisältävä viljelmä.

Nekroosi on testieliön kuollutta (eli valkoista tai tummanruskeaa) kudosta.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa kemikaalilla havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0{,}05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Semistaattinen (ajoittaisvaihtoinen) testi: testi, jossa testiliuos vaihdetaan tietyin väliajoin testin aikana.

Staattinen testi: testi, jossa testiliuosta ei vaihdeta testin aikana.

▼M7

Testikemikaali on mikä tahansa tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Testin päätepiste kuvaa yleistä tekijää, joka testin tavoitteen mukaisesti muuttuu testikemikaalin vaikutuksesta verrattuna kontrolliin. Tässä testimenetelmässä testin päätepisteenä on kasvun estyminen, joka voidaan ilmaista erilaisilla vastemuuttujilla, jotka perustuvat yhteen tai useampaan mittausmuuttujaan.

Testiviljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testikasvit kasvavat, kun ne altistetaan testikemikaalille. Yleensä testikemikaali liuotetaan testiviljelyaineeseen.

Tuotos: altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo. Huomautus: Kun altistamattomien eliöiden kasvu on eksponentiaalista, tuotokseen perustuvat vastemuuttujat vähenevät testin keston pidentyessä.

UVCB-aine: koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Vastemuuttuja: Muuttuja, jonka avulla arvioidaan toksisuutta. Vastemuuttuja johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä testimenetelmässä kasvunopeus ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittausmuuttujista, kuten pääverson pituudesta, versojen kokonaispituudesta, tuorepainosta, kuivapainosta tai kiehkuroiden määrästä.

▼M7

Lisäys 2

MUUTETTU ANDREWSIN KASVUALUSTA KANTAVILJELMÄÄ JA ESIVILJELMÄÄ VARTEN

Kantaviljelmää ja esiviljelmää varten tarvittava muutettu Andrewsin kasvualusta valmistetaan viidestä erikseen valmistetusta kantaliuoksesta ja siihen lisätään 3 prosenttia sakkaroosia.

Taulukko 1

Andrewsin ravinneliuoksen koostumus: (ASTM Designation E 1913-04)

Kantaravinneliuoksen valmistus			Ravinneliuoksen valmistus
Kantaliuos	Kemikaali	Alkupaino / 1 000 ml	ml / 5 l ravinneliuosta
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Ks. jäljempänä kantaliuos nro 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0 278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0 372 g	

Kantaliuoksia voidaan säilyttää jääkaapissa 6 kuukautta (5–10 °C lämpötilassa) Vain kantaliuoksella nro 5 on lyhyempi säilyvyysaika (kaksi kuukautta).

Taulukko 2

Kantaliuoksen nro 3.1 valmistus kantaliuoksen nro 3 valmistusta varten

Kemikaali	Alkupaino g / 100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Kantaliuoksen nro 3.1 valmistamisen jälkeen (taulukko 2) tämä liuos pakastetaan noin 11 ml:n määräosissa (vähintään – 18 °C:n lämpötilassa). Pakastettujen annosten säilyvyysaika on viisi vuotta.

Kantaliuoksen nro 3 valmistamiseksi sulatetaan kantaliuos nro 3.1, kaadetaan 10 ml sitä 1 litran vetoiseen mittapulloon ja lisätään ultrapuhdasta vettä pullon mittamerkkiin asti.

Muutetun Andrewsin kasvualustan valmistamiseksi 5 litran mittapulloon kaadetaan noin 2 500 ml ultrapuhdasta vettä. Kun siihen on lisätty 50 ml kutakin kantaliuosta, mittapullo täytetään 90 prosenttiin asti ultrapuhtaalla vedellä ja pH-arvoksi säädetään 5,8.

▼M7

Tämän jälkeen lisätään 150 g liuotettua sakkaroosia (3 prosenttia 5 litraa kohti) ja täytetään mittapullo ultrapuhtaalla vedellä mittamerkkiin asti. Lopuksi ravinneliuos kaadetaan 1 litran Schott-pulloihin ja autoklavoidaan 121 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan.

Näin saatu ravinneliuos voidaan säilyttää steriilinä jääkaapissa (5–10 °C:n lämpötilassa) kolme kuukautta.

Muutettu Andrewsin kasvualusta sedimentitöntä toksisuustestiä varten

Taulukoissa 1 ja 2 mainituista viidestä kantaravinneliuoksesta valmistetaan testiliuosten valmistamiseen tarvittava kymmenkertaisesti tiivistetty muutettu Andrewsin viljelyneste, johon lisätään 30 prosenttia sakkaroosia. Tätä varten kaadetaan noin 100 ml ultrapuhdasta vettä 1 litran mittapulloon. Siihen lisätään 100 ml kutakin kantaliuosta ja pH-arvoksi säädetään 5,8. Tämän jälkeen lisätään 30 prosenttia liuotettua sakkaroosia (300 g / 1 000 ml) ja mittapullo täytetään ultrapuhtaalla vedellä mittamerkkiin asti.

Lopuksi ravinneliuos kaadetaan 0,5 litran Schott-pulloihin ja autoklavoidaan 121 °C:n lämpötilassa 20 minuutin ajan.

Näin saatu kymmenkertaisesti tiivistetty muutettu ravinneliuos voidaan säilyttää steriilinä jääkaapissa (5–10 °C:n lämpötilassa) kolme kuukautta.

▼M7

Lisäys 3

KANTAVILJELMÄN YLLÄPITO

Tässä lisäyksessä kuvaillaan ärviöiden sukuun kuuluvan kaksisirkkaisen *Myriophyllum spicatum* L -uposkasvilajin ([1]) kantaviljelmää. Kasvin vaaleanpunertavat huomaamattomat kukat työntyvät kesäkuusta elokuuhun vedenpinnan yläpuolelle. Kasvit juurtuvat pohjaan lujilla juurakoilla, ja niitä tavataan koko pohjoisella pallonpuoliskolla rehevöityneissä, mutta pilaantumattomissa ja kalkkipitoisissa rauhallisissa mutapohjaisissa vesissä. *Myriophyllum spicatum* viihtyy parhaiten makeassa vedessä, mutta sitä tavataan myös murtovesissä.

Laboratorio-olosuhteissa viljeltävää sedimentitöntä kantaviljelmää varten tarvitaan steriilejä kasveja. Steriilejä kasveja on saatavissa Saksan liittovaltion ympäristöviraston (Umweltbundesamt) ekotoksikologian laboratoriosta.

Vaihtoehtoisesti koe-eliöt voidaan valmistaa epästeriileistä kasveista standardin ASTM E 1913-04 mukaisesti. Seuraavassa esitetään – ASTM-standardioppaasta lainattu – menettely luonnosta kerättyjen *Myriophyllum sibiricum* -kasvien viljelemiseksi:

”Jos viljely aloitetaan luonnosta kerätyillä epästeriileillä kasveilla, *Myriophyllum sibiricum* -kasvien talvehtimissilmut kerätään syksyllä. Talvehtimissilmut asetetaan 20 litran vetoiseen akvaarioon, jossa on 5 cm silikahiekalla tai esimerkiksi Turface®-soralla peitettyä steriiliä sedimenttiä, sekä 18 l reagenssivettä. Akvaario ilmastetaan ja sen lämpötilana pidetään 15 °C ja kokonaisvuon tiheytenä 200–300 μmol m^{-2} s^{-1} 16 tunnin ajan päivässä. Akvaariossa kasvatettavaa kasviviljelmää voidaan ylläpitää kasvien varalähteenä siltä varalta, että steriilit kasviviljelmät tuhoutuvat kasvatuskaapin mekaanisen toimintahäiriön, kontaminaation tai muun syyn vuoksi. Akvaariossa kasvatetut kasvit eivät ole steriilejä, eikä steriilejä viljelmiä voida ylläpitää panosviljelyjärjestelmässä. Viljelmän steriloimiseksi kasvit poistetaan akvaarioista ja niitä huuhdellaan virtaavassa deionisoidussa vedessä noin 0,5 tuntia. Kasvin desinfioidaan aseptisissa olosuhteissa laminaarivirtauskaapissa alle 20 minuutin ajan (kunnes suurin osa kasvikudoksesta on valkaistunut ja vain kasvukärki on edelleen vihreä) 3 tilavuusprosentin natriumhypokloriittiliuoksessa, jossa on 0,01 prosenttia sopivaa pinta-aktiivista ainetta. Desinfiointiainetta ja kasvimateriaalia ravistellaan. Useita niveliä sisältävät segmentit siirretään steriileihin viljelyputkiin, joissa on 45 ml steriloitua muutettua Andrewsin kasvualustaa, ja putket suljetaan sileillä viljelyputkien tulpilla. Kuhunkin testiastiaan laitetaan vain yksi kasvisegmentti. Viljelyastian sulkeminen varmistetaan laboratoriokäyttöön tarkoitetulla tiivistyskalvolla. Kun steriili viljelmä on perustettu, useita niveliä sisältävät kasvisegmentit on siirrettävä 10–12 päivän välein uusiin testiastioihin, jotka sisältävät tuoretta ravinneliuosta. Kuten agar-maljoissa suoritetut viljelyt ovat osoittaneet, kasvien on oltava steriilejä ja pysyttävä steriileinä kahdeksan viikon ajan, ennen kuin testaus voidaan aloittaa.”

Koska muunnettu Andrewsin kasvualusta sisältää sakkaroosia (joka stimuloi sienten ja bakteerien kasvua), kaikkia materiaaleja, liuoksia ja viljelmiä on käsiteltävä steriileissä olosuhteissa. Kaikki nesteet sekä laitteet on steriloitava ennen käyttöä. Sterilointi tehdään 4 tuntia kestävällä kuumailmakäsittelyllä (210 °C) tai autoklavoimalla 20 minuutin ajan lämpötilassa 121 °C. Lisäksi kaikki pullot, maljat, kulhot ja muut tarvikkeet liekitetään steriilillä työpöydällä välittömästi ennen käyttöä.

Kantaviljelmiä voidaan säilyttää heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) suhteellisen pitkiä aikoja käynnistämättä niitä uudelleen. *Myriophyllum*-kasvien viljelyaine voi olla sama kuin testauksessa

([1]) Carl von Linné (* 23. toukokuuta 1707, Råshult /Älmhult; † 10. tammikuuta 1778, Uppsala).

▼M7

käytetty viljelyaine, mutta kantaviljelmissä voidaan käyttää myös muita ravinteikkaita viljelyaineita.

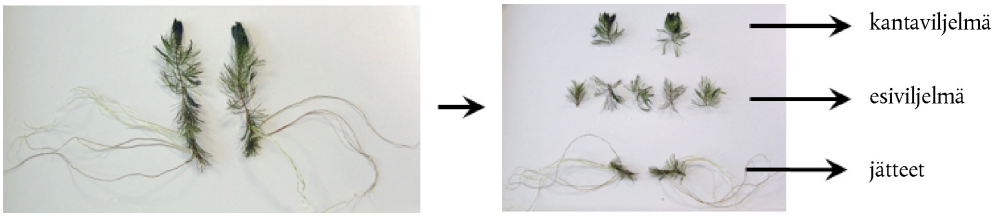
Kasvisegmentit jaetaan akseenisesti useisiin 500 ml:n Erlenmeyer-pulloihin tai/ja 2 000 ml:n Fernbach-pulloihin, joista kuhunkin kaadetaan 450 ml (Erlenmeyer-pullot) tai 1 000 ml (Fernbach-pullot) muutettua Andrewsin kasvualustaa. Tämän jälkeen pullot suljetaan akseenisesti selluloosatulpilla.

Lisäksi tarvikkeet on ehdottomasti liekitettävä steriilillä työpöydällä välittömästi ennen käyttöä. Määrästä ja koosta riippuen kasvit on siirrettävä tuoreeseen ravinneliuokseen noin kolmen viikon välein.

Tähän uuteen viljelmään voidaan käyttää kärkiä sekä varren keskiosan segmenttejä. Siirrettävien kasvien (tai kasvisegmenttien) määrä ja koko riippuvat tarvittavien kasvien määrästä. Esimerkiksi voidaan siirtää viisi versosegmenttiä yhteen Fernbach-puolloon ja kolme versosegmenttiä yhten Erlenmeyer-pulloon. Kaikkien segmenttien pituus on 5 cm. Kaikki juuria kasvattaneet, kukkivat, kuolleet tai muutoin silmiinpistävät osat heitetään pois.

Kuva 1

Kasvien leikkaaminen kanta- ja esiviljelmää varten 3 viikkoa kestäneen viljelyn jälkeen



Kasvit viljellään 500 ml:n Erlenmeyer-pulloissa ja 2 000 ml:n Fernbach-pulloissa jäähdyttävässä inkubaattorissa 20 ± 2 °C:n lämpötilassa jatkuvassa valaistuksessa, jonka voimakkuus on noin 100–150 μE m^{-2} s^{-1} tai 6 000–9000 luksia (viljelykaapin sisäinen valaistus, värilämpötila ”lämpimänvalkoinen”.

Kuva 2

Kasvien viljely jäähdyttävässä inkubaattorissa, jossa on sisäinen valaistus.



Kasveja viljeltäessä on käytettävä kemiallisesti puhtaita (happopestyjä) ja steriilejä lasisia kasvatusastioita sekä aseptisia käsittelytekniikoita. Jos esimerkiksi levät, sienet ja/tai bakteerit kontaminoivat kantaviljelmän, on valmistettava uusi viljelmä tai käytettävä toisesta laboratoriosta saatavaa kantaviljelmää kyseisen viljelmän uudistamiseen.

▼M7

Lisäys 4

ESIVILJELMÄN YLLÄPITO JA KOE-ELIÖN VALMISTELU TESTAUSTA VARTEN

Esiviljelmän valmistamiseksi kantaviljelmästä peräisin olevat versot leikataan segmenteiksi, joissa on kaksi kiehkuraa kussakin. Segmentit laitetaan muutetulla Andrewsin kasvualustalla(jossa on 3 prosenttia sakkaroosia) täytettyihin Fernbach-pulloihin. Kussakin pullossa voi olla enintään 50 versosegmenttiä. On kuitenkin huolehdittava siitä, että segmentit ovat elinkykyisiä eikä niissä ole juuria tai sivuhaaroja tai niiden silmuja (ks. lisäyksessä 3 oleva kuva 1).

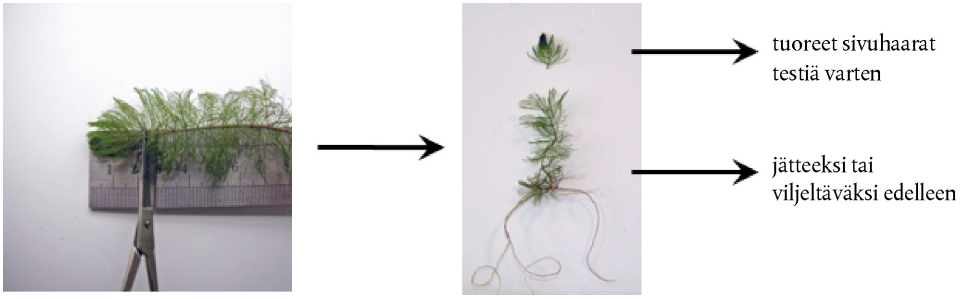
Esiviljelmän eliöitä viljellään 14–21 päivää steriileissä olosuhteissa ilmastoidussa kaapissa valaistuksessa, jossa 16 tunnin valoisat ja 8 tunnin pimeät jaksot vuorottelevat. Valon voimakkuuden on oltava 100–150 µE m^{-2} s^{-1}. Lämpötilan on oltava koeastioissa 23 ± 2 °C.

Koska muunnettu Andrewsin elatusaine sisältää sakkaroosia (joka stimuloi sienten ja bakteerien kasvua), testikemikaalin liuokset on valmistettava ja viljely suoritettava steriileissä olosuhteissa. Kaikki nesteet sekä laitteet on steriloitava ennen käyttöä. Sterilointi tehdään 4 tuntia kestävällä kuumailmakäsittelyllä (210 °C) tai autoklavoimalla 20 minuutin ajan lämpötilassa 121 °C. Lisäksi kaikki pullot, maljat, kulhot ja muut tarvikkeet liekitetään steriilillä työpöydällä välittömästi ennen käyttöä.

Versot poistetaan akseenisesti esiviljelypulloista, ja tässä yhteydessä valitaan mahdollisimman homogeenista materiaalia. Kuhunkin testiin tarvitaan vähintään 60 koe-eliötä (testaus kahdeksalla testikemikaalin pitoisuudella). Testausta varten esiviljelmistä otetaan tuoreita sivuhaaroja, jotka lyhennetään 2,5 cm:n pituuteen tyvestä (mittaviivaimella mitattuna) ja siirretään steriiliä muutettua Andrewsin kasvualustaa sisältävään dekantterilasiin. Näitä tuoreita sivuhaaroja voidaan käyttää sedimentittömään *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävään toksisuustestiin.

Kuva 2

Esiviljelmästä peräisin olevien kasvien leikkaaminen sedimentittömään *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävään toksisuustestiin.



▼M7

C.51. *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* -LAJILLA TEHTÄVÄ TOKSISUUSTESTI VESISEDIMENTTIJÄRJESTELMÄSSÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 239 (2014). Testimenetelmiä on saatavilla kelluvalle yksisirkkaiselle *Lemna*-vesikasville (1) ja leville (2). Näitä menetelmiä käytetään rutiininomaisesti tuottamaan tietoja, joilla torjutaan testikemikaalien, erityisesti rikkaruohoja tuhoavien kemikaalien, vedessä kasvaville muille kuin kohdekasveille aiheuttamaa riskiä. Eräissä tapauksissa saatetaan kuitenkin tarvita tietoja muista makrofyyttilajeista. Society of Environmental Toxicology and Chemistry -järjestön (SETAC) vesimakrofyyteillä tehtävää torjunta-aineiden riskinarviointia (AMRAP) käsittelevän työpajan äskettäin julkaisemissa ohjeissa todettiin, että tietoja juurellisesta makrofyyttilajista saatetaan tarvita sellaisia tapauksia varten, joissa tiedetään, että *Lemna*-kasvit ja levät eivät ole herkkiä testikemikaalin vaikutustavalle, tai joissa ongelmana on kemikaalin jakautuminen sedimenttiin, mikä johtaa altistumiseen juuriin imeytymisen kautta (3). Nykyisen tietämyksen ja kokemuksen perusteella *Myriophyllum* spp. valittiin soveltuvimmaksi lajiksi tapauksissa, joissa tarvitaan tietoa juurellisesta kaksisirkkaisesta uposkasvilajista (4) (5) (6). Tämä testi ei korvaa muita vesieliötoksisuutta koskevia testejä; sen tarkoituksena on pikemminkin täydentää niitä ja mahdollistaa kattavampi vesikasveille aiheutuvan vaaran ja riskin arviointi. Vesisedimenttijärjestelmässä tehtävä *Myriophyllum spicatum* -testimenetelmä täydentää sedimentitöntä *Myriophyllum spicatum* -toksisuustestiä (7).

2. Tässä asiakirjassa kuvataan testimenetelmä, jolla voidaan arvioida testikemikaalin vaikutuksia vesisedimenttijärjestelmässä kasvaviin juurellisiin *Myriophyllum spicatum* -vesikasveihin. Testimenetelmä perustuu osittain olemassa oleviin menetelmiin (1) (2) (8), ja siinä otetaan huomioon vesikasvien riskinarviointia koskeva viimeaikainen tutkimus (3). Vesisedimenttimenetelmä on validoitu kansainvälisellä yhteistutkimuksella, joka suoritettiin staattisissa olosuhteissa kasvatetuilla *Myriophyllum*-lajeilla, jotka altistettiin testikemikaalille vesipatsaan kautta tapahtuvan applikoinnin avulla (9). Testijärjestelmää on kuitenkin helppo mukauttaa siten, että mahdollistetaan altistaminen käsitellyn sedimentin kautta tai vesifaasin kautta semistaattisissa tai sykäysannoskokeissa, vaikka näistä kokeista ei ole tehty virallista yhteistutkimusta. Lisäksi yleistä menetelmää voidaan käyttää muita uposlajeja ja puolikelluvia lajeja, kuten muita *Myriophyllum*-lajeja (esimerkiksi *Myriophyllum aquaticum*) ja *Glyceria maxima* -lajia, varten (10). Käytettäessä muita lajeja testiolosuhteita, testisuunnitelma ja testin kestoa saattaa olla tarpeen muuttaa. Erityisesti *Myriophyllum aquaticum* -lajin osalta tarvitaan lisätyötä asianmukaisten menettelyjen määrittämiseksi. Näitä vaihtoehtoja ei esitetä yksityiskohtaisesti tässä testimenetelmässä, jossa kuvataan normaali menettely *Myriophyllum spicatum* -lajin altistamiseksi staattisessa järjestelmässä vesifaasin kautta.

3. Tätä testimenetelmää sovelletaan aineisiin, joita varten testimenetelmä on validoitu (ks. lähemmin kansainvälisen yhteistutkimuksen raportti (9)) tai valmisteisiin tai tunnettuihin seoksiin. *Myriophyllum*-testi voidaan suorittaa vaiheen 1 tietovaatimusten täyttämiseksi, jotka aiheutuvat testikemikaalin mahdollisesta jakautumisesta sedimenttiin tai vaikutustapaan/valikoivuuteen liittyvistä kysymyksistä. Vastaavasti laboratoriossa suoritettavaa *Myriophyllum*-testiä saatetaan tarvita osana myöhemmän vaiheen strategiaa vesikasveihin kohdistuvaa riskiä koskevien huolenaiheiden ratkaisemiseksi. Se erityinen syy, jonka vuoksi testi suoritetaan, määrää altistusreitin (veden vai sedimentin kautta). Ennen kuin testimenetelmää käytetään seoksen testaamiseen sääntelytarkoituksiin, on harkittava, antaako se asianmukaiset tulokset tämän tavoitteen kannalta, ja jos antaa, miksi. Tällaista harkintaa ei tarvita, jos seoksen testaamista edellytetään sääntelyvaatimuksissa.

▼M7

TESTIN PERIAATE

4. Tällä testillä on tarkoitus arvioida kemikaaleihin liittyviä vaikutuksia standardoidussa viljelyaineessa (vesi, sedimentti ja ravinteet) kasvavien *Myriophyllum*-kasvien kasvuun. Tätä varten terveistä ja kukkimattomista kasveista otettuja versojen kärkiä istutetaan standardoituun keinosedimenttiin, jota on täydennetty lisäravinteilla kasvien asianmukaisen kasvun varmistamiseksi, minkä jälkeen niitä ylläpidetään Smartin ja Barkon kasvualustassa (lisäys 1). Tietyn perustamisajan jälkeen, jonka kuluessa kasvit muodostavat juuria, kasvit altistetaan useille vesipatsaaseen lisättäville testipitoisuuksille. Vaihtoehtoisesti voidaan simuloida sedimentin kautta tapahtuvaa altistumista lisäämällä testikemikaalia keinosedimenttiin ja siirtämällä kasvit tähän käsiteltyyn sedimenttiin. Molemmissa tapauksissa kasveja ylläpidetään tämän jälkeen kontrolloiduissa ympäristöolosuhteissa 14 päivän ajan. Vaikutukset kasvuun määritetään verson pituuden, tuorepainon ja kuivapainon kvantitatiivisten määritysten sekä kloroosin, nekroosin tai epämuodostumien kaltaisten oireiden kvalitatiivisen havainnoinnin perusteella.

5. Testikemikaaliin liittyvien vaikutusten kvantifioimiseksi testiliuoksissa tapahtunutta kasvua verrataan kontrollikasvien kasvuun, minkä jälkeen määritetään pitoisuus, jossa kasvu estyy ennalta määrätyn prosenttimäärän x verran. Kyseinen pitoisuus ilmoitetaan EC_x-arvona, esimerkiksi EC_{10}, EC_{20} tai EC_{50}. On syytä huomata, että EC_{10}- ja EC_{20}-arvojen arviot ovat luotettavia ja asianmukaisia vain testeissä, joissa kontrollikasvien variaatiokertoimet ovat pienemmät kuin arvioitava vaikutustaso. Toisin sanoen vaikutuskertoimien on oltava < 20 prosenttia, jotta EC_{20}-arvo voidaan arvioida luotettavasti.

6. Käsittelemättömistä ja käsitellyistä kasveista on määritettävä sekä keskimääräinen spesifinen kasvunopeus (joka arvioidaan verson pituuden, verson tuorepainon ja verson kuivapainon määrittämisen perusteella) että tuotos (joka arvioidaan verson pituuden, verson tuorepainon ja verson kuivapainon kasvun määrittämisen perusteella). Spesifistä kasvunopeutta (r) ja tuotosta (y) käytetään tämän jälkeen E_rC_x-arvon (esimerkiksi E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) ja E_yC_x-arvon (esimerkiksi E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}) määrittämiseen.

7. Tarvittaessa keskimääräisen spesifisen kasvuvauhdin ja tuotoksen estimaateista voidaan määrittää tilastollisesti myös pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) sekä pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

8. Käytettävissä on oltava analyysimenetelmä, jolla testiviljelyaineessa oleva testikemikaali voidaan kvantifioida riittävän herkästi.

9. Testikemikaalia koskevia tietoja, joista voi olla hyötyä päätettäessä testiolosuhteista, ovat rakennekaava, koostumus, jos kyse on useista ainesosista koostuvista aineista, UVCB-aineista, seoksista tai valmisteista, puhtaus, vesiliukoisuus, stabiilius vedessä ja valossa, hapon dissosiaatiovakio (pK_a), jakaantumiskerroin oktanoli/vesi (K_{ow}), K_d sedimenteissä, jos käytettävissä, höyrynpaine ja biohajoavuus. Vesiliukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää merkittävästi testin aikana. Jos testikemikaalin häviäminen on todennäköistä, häviämä on kvantifioitava ja toimenpiteet häviämisen kontrolloimiseksi on dokumentoitava. Jos testikemikaali(e)n liukoisuutta ja stabiiliutta koskevat tiedot ovat epäluotettavia, nämä ominaisuudet olisi arvioitava testiolosuhteissa, toisin sanoen siinä viljelyaineessa, lämpötilassa ja valaistuksessa, joita testissä käytetään. *Huomautus:* Testattaessa valosta riippuvaisia peroksidoituvia kasvinsuojeluaineita käytettävässä laboratariovalaistuksessa on oltava luonnollista auringonvaloa vastaavaa ultraviolettivaloa.

▼M7

10. Testiviljelyaineen pH-arvo on mitattava ja sitä on tarvittaessa mukautettava. Testiviljelyaineen pH:n tarkistaminen on erityisen tärkeää esimerkiksi testattaessa metalleja tai hydrolyyttisesti epästabiileja kemikaaleja. OECD:n ohjeasiakirjassa (11) annetaan lisäohjeita sellaisten kemikaalien testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

TESTIN VALIDITEETTI

11. Jotta testituloksia voidaan pitää luotettavina, kontrollikasvien versojen kokonaispituuden keskiarvon ja versojen kokonaistuorepainon keskiarvon on vähintään kaksinkertaistuttava testin altistusvaiheen aikana. Lisäksi kontrollikasvit eivät saa osoittaa mitään näkyviä kloroosin oireita eikä kasveissa, sedimentin pinnassa ja testiviljelyaineessa saa näkyä muiden organismien aiheuttamaa kontaminaatiota, kuten leviä ja/tai bakteerikalvoja.

12. Versojen tuorepainon mittauksiin perustuvan tuoton (testin aloittamisesta testin päättämiseen) keskimääräinen variaatiokerroin kontrolliviljelmissä ei saa olla yli 35 prosenttia rinnakkaisnäytteiden välillä.

VERTAILUKEMIKAALI

13. Vertailukemikaali(t), kuten kansainvälisessä yhteistutkimuksessa (9) käytetty 3,5-dikloorifenoli, on testattava säännöllisesti testimenettelyn toimivuuden ajoittaiseksi tarkistamiseksi. Kansainvälisen yhteistutkimuksen tietojen mukaan 3,5-dikloorifenolin keskimääräiset EC_{50}-arvot eri vastemuuttujille ovat 4,7–6,1 mg/l (tarkempia tietoja näiden arvojen ennakoidusta luottamusvälistä on kansainvälisen yhteistutkimuksen raportissa). Vertailukemikaali on suotavaa testata vähintään kahdesti vuodessa tai, jos testausta tehdään harvemmin, rinnakkain varsinaisten toksisuustestien kanssa. Kansainvälisen yhteistutkimuksen (9) tilastoraportissa annetaan ohje 3,5-dikloorifenolin odotetuista EC_{50}-arvoista.

MENETELMÄN KUVAUS

Testauslaitteet

14. Testi on suoritettava kontrolloiduissa ympäristöolosuhteissa, kuten kasvatuskaapissa, kasvatushuoneessa tai laboratoriossa, joissa päivän pituus, valaistus ja lämpötila ovat säädettävissä (ks. jakso ”Testiolosuhteet”, 56–58 kohta). Kantaviljelmiä on ylläpidettävä erillään testiastioista.

15. Testissä on käytettävä lasisia testiastioita, kuten akvaarioita tai dekantterilaseja; yleisesti käytetään 2 litran dekantterilaseja (korkeus noin 24 cm ja halkaisija 11 cm). Muut (suuremmat) astiat voivat kuitenkin olla soveltuvia, mikäli veden syvyys niissä on riittävä mahdollistamaan rajoittamattoman kasvun ja pitämään kasvit upoksissa testin ajan.

16. Muovisia tai lasisia kasviruukkuja (joiden halkaisija on noin 9 cm, korkeus 8 cm ja tilavuus 500 ml) voidaan käyttää säiliöinä kasvien istuttamiseksi sedimenttiin. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää lasisia dekantterilaseja, ja ne ovat suositeltavia joissain tapauksissa (esimerkiksi testattaessa hydrofobisia kemikaaleja tai kemikaaleja, joiden K_{ow}-arvo on suuri).

17. Valittavan ruukun/dekantterilasin kokoa on harkittava valittavien testiastioiden ja paremmin soveltuvan testimenetelmän (ks. jäljempänä) ohella. Jos käytetään testimenetelmää A (yksi verso ruukkua kohti ja kolme ruukkua astiaa kohti), saatetaan tarvita pienempiä ruukkuja tai suurempia astioita. Jos käytetään testimenetelmää B (kolme versoa ruukkua kohti ja yksi ruukku astiaa kohti), edellä mainitut ruukkujen ja astioiden koot lienevät riittävät. Kaikissa tapauksissa sedimentin päällä olevan veden vähimmäissyvyyden on oltava 12 cm, ja sedimentin tilavuuteen suhteutetun pinta-alan suhde veden tilavuuteen suhteutettuun pinta-alaan on kirjattava.

▼M7

Koe-eliö

18. Tässä testimenetelmässä kuvattuja yleisiä menettelyjä voidaan käyttää useiden erilaisten vesikasvilajien testaamiseen. Tässä testimenetelmässä esitetyt olosuhteet on kuitenkin sovitettu nimenomaan *Myriophyllum spicatum* -ärviälajilla tehtäviä testejä varten. Tämä laji kuuluu kaksisirkkaisten ärviäkasvien (Haloragaceae) heimoon.

19. *Myriophyllum spicatum* (tähkä-ärviä) on juurellinen uposkasvi, joka kestää monenlaisia olosuhteita ja jota tavataan sekä seisovissa että virtaavissa vesistöissä. *M. spicatum* on monivuotinen kasvi, joka talvehtii juurissa. Tavallisesti nämä kasvit kukkivat ja siementävät runsaasti, mutta usein ne leviävät ensisijaisesti suvuttoman lisääntymisen avulla hankasilmuista tai luonnollisesti tai veden sekoittumisen seurauksena irtoavista varren osista.

Koe-eliön viljely

20. Kasvit voidaan hankkia luonnollisista populaatioista tai vesikasvien toimittajilta. Molemmissa tapauksissa kasvien alkuperä on dokumentoitava ja lajinmääritys vahvistettava. Kerättäessä *Myriophyllum spicatum* -kasveja luonnosta on varmistettava huolellisesti, että kerätään oikeaa lajia, erityisesti alueilla, jossa se voi risteytyä muiden *Myriophyllum*-lajien kanssa. Epävarmoissa tilanteissa suositellaan tunnetuista lähteistä saatuja varmennettuja laboratorioviljelmiä. Kasveja, jotka ovat altistuneet kemiallisille epäpuhtauksille tai jotka on kerätty kontaminoituneiksi tiedetyiltä paikoilta, ei saa käyttää tässä testissä.

21. Alueilla, joilla *Myriophyllum spicatum* -kasveja ei ole helposti saatavissa talvikuukausina, saattaa olla tarpeen ylläpitää pitkäaikaisia kantaviljelmiä kasvihuoneessa tai laboratorio-olosuhteissa. Kantaviljelmiä on ylläpidettävä testiolosuhteita vastaavissa olosuhteissa, mutta viljelmien ylläpidon helpottamiseksi (esimerkiksi silloin, kun *Myriophyllum*-testejä ei aiota tehdä tiettynä aikana) niitä voidaan säilyttää heikommassa valaistuksessa ja alhaisemmassa lämpötilassa. Testeissä käytettäviä akvaarioita ja kasviruukkuja suurempien akvaarioiden ja ruukkujen käyttö on suositeltavaa, jotta lisääntymiselle on tilaa. Sedimentin ja vesi-viljelyaineen koostumuksen on oltava sama kuin testeissä käytetyn koostumuksen, mutta sedimentin lannoitukseen voidaan käyttää vaihtoehtoisia menetelmiä (esimerkiksi kaupallisia hitaasti vapautuvia lannoitevalmisteita).

22. Kantaviljelmän kasveissa ei saa olla näkyvää muiden organismien aiheuttamaa kontaminaatiota, kuten etanoita, rihmaleviä, sieniä ja hyönteisiä, esimerkiksi *Paraponyx stratiotata* -koiperhosen munia tai toukkia tai *Eubrychius velutus* -kuoriaisen toukkia tai aikuisia. Kasvimateriaalin huuhtominen tuoreessa vedessä saattaa olla tarpeen näkyvän kontaminaation poistamiseksi. Lisäksi on pyrittävä minimoimaan yksisoluisten levien kehittyminen ja bakteerikontaminaatio, mutta kasvimateriaalin ei tarvitse olla täydellisen steriiliä. Kantaviljelmiä on seurattava ja ne on tarvittaessa siirrettävä levä- ja bakteerikontaminaation välttämiseksi. Kantaviljelmien ilmastus saattaa olla hyödyllistä, jos levä- tai bakteerikontaminaatio muodostuu ongelmaksi.

23. Kaikissa tapauksissa kasveja viljellään/akklimatisoidaan testiolosuhteiden kanssa samankaltaisissa, mutta ei välttämättä identtisissä, olosuhteissa riittävän pitkään (yli 2 viikkoa) ennen niiden käyttämistä testissä.

24. Kukkivia kantaviljelmiä ei saa käyttää testissä, koska kasvien kasvunopeus yleensä hidastuu kukinnan aikana ja sen jälkeen.

▼M7

Sedimentti

25. Tätä testiä varten suositellaan seuraavaa synteettistä sedimenttiä, joka perustuu tämän liitteen luvussa C.28 (8) käytettyyn keinosedimenttiin. Sedimentti valmistetaan testimenetelmässä C.28 kuvatun mukaisesti, minkä lisäksi siihen lisätään ravinteita seuraavasti:

a) 4–5 prosenttia (kuivapaino, kun orgaanisen hiilen osuus on 2 ± 0,5 prosenttia) turvetta: pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0; on tärkeää käyttää ainoastaan ilmakuivattua jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm)

b) 20 prosenttia (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 prosenttia)

c) 75–76 prosenttia (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, yli 50 prosenttia 50–200 μm:n hiukkasia)

d) Sedimenttiin lisätään vesiliuoksessa olevaa ravinneviljelyainetta siten, että lopullisessa sedimenttierässä on 200 mg sekä ammoniumkloridia että natriumfosfaattia kuivaa sedimenttikiloa kohti ja lopullisen seoksen kosteuspitoisuus on 30–50 prosenttia.

e) Kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5.

26. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperä on tunnettava ja dokumentoitava. Jos alkuperä on tuntematon tai herättää huolta, kyseisten ainesosien kemiallinen kontaminaatio (esimerkiksi raskasmetallit, orgaanista klooria sisältävät yhdisteet, orgaanista fosforia sisältävät yhdisteet) on tarkistettava.

27. Sedimentin kuivat ainesosat on sekoitettava homogeeniseksi seokseksi, ennen kuin vesiliuoksessa oleva ravinneliuos sekoitetaan perusteellisesti sedimenttiin. Kostea sedimentti on valmistettava vähintään kaksi päivää ennen käyttöä, jotta turve kastuu läpikotaisin ja estetään hydrofobisten turvehiukkasten kelluminen pintaan, kun sedimentti peitetään viljelyaineella; ennen käyttöä kostea sedimentti voidaan varastoida pimeässä.

28. Testiä varten sedimentti siirretään sopivan kokoisin astioihin, kuten kasviruukkuihin, joiden halkaisija on sellainen, että ne sopivat lasiastioihin (sedimentin pinta-alan on katettava noin 70 prosenttia tai enemmän astian pinta-alasta). Jos astian pohjassa on reikiä, astian pohjaan asetettava suodatinpaperin pala auttaa pitämään sedimentin astiassa. Ruukut täytetään sedimentillä siten, että sedimentin pinta on tasainen, minkä jälkeen ne peitetään ohuella kerroksella (~ 2–3 mm) inerttiä materiaalia, kuten hiekkaa tai hienoa puutarhahiekkaa (tai korallimurskaa), sedimentin pitämiseksi paikoillaan.

Testiviljelyaine

29. *Myriophyllum spicatum* -kasvien viljelyyn ja testaamiseen suositellaan Smartin ja Barkon kasvualustaa (12). Tämän viljelyaineen valmistus kuvataan lisäyksessä 1. Viljelyaineen (vesifaasi) pH:n on testin alussa oltava 7,5–8,0, jotta kasvit kasvavat optimaalisesti.

Testijärjestely

30. Testiin on sisällyttävä vähintään kuusi rinnakkaista testiastiaa käsittelemätöntä kontrollia varten ja vähintään neljä rinnakkaista testiastiaa kutakin pitoisuutta varten vähintään viidestä pitoisuustasosta.

31. Jos NOEC-pitoisuutta ei tarvitse määrittää, testimenetelmää voidaan muuttaa lisäämällä pitoisuuksien määrää ja vähentämällä toistojen määrää pitoisuutta kohden.

▼M7

32. Kukin testiastia muodostaa kolme versoa sisältävän toiston. Kolmen verson kasvattamiseksi kussakin testiastiassa on kaksi vaihtoehtoa:

— Testimenetelmä A: yksi verso ruukkua kohti ja kolme ruukkua astiaa kohti.

— Testimenetelmä B: kolme versoa ruukkua kohti ja yksi ruukku astiaa kohti.

— Vaihtoehtoiset testijärjestelyt, joissa on yksi verso ruukkua ja yksi ruukku testiastiaa kohti, ovat hyväksyttäviä, mikäli toisto mukautetaan siten, että validiteettivaatimukset täyttyvät.

33. Yksittäiset testiastiat osoitetaan satunnaisvalinnalla käsittelyryhmiin. Koeastiat on sijoitettava testialueelle satunnaistetusti, jotta valon voimakkuuden ja lämpötilan spatiaalisista eroista johtuvat vaikutukset olisivat mahdollisimman pienet.

Testikemikaalin pitoisuudet ja kontrolliryhmät

34. Testipitoisuuksien olisi tavallisesti oltava geometrisessa sarjassa, eikä niiden välinen kerroin saisi olla suurempi kuin 3,2. Sopivat testipitoisuudet on helpompi valita, jos testikemikaalin toksisuudesta on saatavilla aiempia tietoja alustavasta pitoisuusalueen määrityskokeesta.

35. EC_x-pitoisuuden määrittämiseksi testipitoisuudet on valittava siten, että EC_x-arvo on kyseisellä pitoisuusalueella, jotta saavutettaisiin riittävä luottamustaso. Esimerkiksi EC_{50}-pitoisuutta arvioitaessa suurimman testipitoisuuden on ylitettävä EC_{50}-arvo. Jos EC_{50}-arvo on testin pitoisuusalueen ulkopuolella, vastaavat luottamusvälit ovat suuria, jolloin voi olla mahdotonta arvioida mallin tilastollista sopivuutta. Useampien testipitoisuuksien käyttö parantaa tuloksena saatavan EC_x-arvon luottamusväliä.

36. LOEC/NOEC-pitoisuuden (valinnainen päätepiste) määrittämiseksi pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, että kasvu ei poikkea merkittävästi kontrollikasvien kasvusta. Suurimman testipitoisuuden on myös oltava niin suuri, että kasvu on huomattavasti vähäisempää kuin kontrolliryhmässä. Useampien toistojen käyttö lisää vaikutuksettoman pitoisuuden / ANOVA-menetelmän tilastollista voimaa.

Raja-annostesti

37. Jos alueenmääritykseen osoittaa, että testikemikaalilla ei ole haittavaikutuksia pitoisuusarvoon 100 mg/l saakka tai siihen liukoisuusrajaan asti, joka testikemikaalilla on testiviljelyaineessa, tai jos kyseessä on valmiste, sen dispergoituvuusrajaan asti, voidaan tehdä raja-annostesti, jolla helpotetaan yhden kontrolliryhmän ja yhden käsitellyn ryhmän vasteiden vertailua (pitoisuudessa 100 mg/l tai liukoisuusrajaa vastaavassa pitoisuudessa, tai pitoisuudessa 1 000 mg/kg kuivasta sedimentistä). Tämän testin on noudatettava vakiomuotoisen annos-vastekokeen yleisperiaatteita sillä poikkeuksella, että toistojen vähimmäismäärä suositellaan lisättävän kuuteen testiastiaan kontrollia ja pitoisuutta kohti. Kontrolli- ja käsitellyssä ryhmässä tapahtunutta kasvua voidaan analysoida Studentin t-testin kaltaisella tilastotutkimuksella, jossa verrataan keskiarvoja.

Testiliuokset

38. Testiliuokset valmistetaan tavallisesti laimentamalla kantaliuosta, joka on valmistettu liuottamalla tai dispergoimalla testikemikaali Smartin ja Barkon kasvualustaan, käyttäen demineralisoitua (eli tislattua tai deionisoitua) vettä (ks. lisäys 1).

▼M7

39. Suurin testipitoisuus ei normaalisti saa ylittää testikemikaalin vesiliukoisuusrajaa tai valmisteiden kohdalla dispergoituvuusrajaa testiolosuhteissa.

40. Jos testikemikaali liukenee huonosti veteen, voi olla tarpeen valmistaa kyseisestä kemikaalista väkevä kantaliuos tai dispersio käyttämällä orgaanista liuotinta tai dispergointiainetta, joilla voidaan helpottaa tarkkojen testikemikaalimäärien lisäämistä testiviljelyaineeseen sekä testikemikaalin dispersiota ja liukenemista. Tällaisten liuottimien tai dispergointiaineiden käyttöä on vältettävä mahdollisimman pitkälle. Jos liuottimia tai dispergointiaineita käytetään apuna testiliuosten valmistuksessa, niistä ei saa aiheutua fytotoksisuutta. Asetoni ja dimetyyliformamidi ovat esimerkkejä yleisesti käytetyistä liuottimista, jotka eivät aiheuta fytotoksisuutta pitoisuuden ollessa enintään 100 µl/l. Jos liuotinta tai dispergointiainetta käytetään, sen lopullinen pitoisuus on ilmoitettava ja pidettävä mahdollisimman pienenä (≤ 100 µl/l). Tällaisessa tilanteessa liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuuden on oltava sama kaikissa käsitellyissä näytteissä ja (liuotin-)kontrolleissa. Myös käsittelemättömät kontrollitoistot, jotka eivät sisällä liuotinta tai dispergointiainetta, sisällytetään testijärjestelyyn. Dispergointiaineiden käytöstä annetaan lisäohjeita OECD:n ohjeasiakirjassa (11).

TESTIMENETTELY

41. Testimenettely vaihtelee sen mukaan, mitä testikemikaalin applikointireittiä (vesi- vai sedimenttifaasi) käytetään. Testikemikaalin todennäköinen käyttäytyminen vesisedimenttijärjestelmässä on otettava huomioon valittaessa testissä käytettävää altistusjärjestelmää (staattinen vai staattinen ajoittaisvaihto, testikemikaalin lisääminen veteen vai sedimenttiin). Käsitellyllä sedimentillä tehtävät testit saattavat joissain tapauksissa olla suositeltavia sellaisille kemikaaleille, joiden ennustetaan jakautuvan merkittävästi sedimenttiin.

Perustamisvaihe

42. Viljelmän kasveista leikataan terveitä versojen kärkiä, joissa ei ole sivuversoja, siten, että verson pituus on 6 cm (± 1 cm). Testimenetelmää A (yksi verso ruukkua kohti ja kolme ruukkua astiaa kohti) varten kuhunkin ruukkuun istutetaan yksi verson kärki. Testimenetelmää B (kolme versoa ruukkua kohti ja yksi ruukku astiaa kohti) varten kuhunkin sedimenttiä sisältävään ruukkuun istutetaan neljä tai viisi verson kärkeä.

43. Molemmissa tapauksissa versoja on istutettava ylimääräisiin ruukkuihin, jotta testin alussa voidaan valita yhtenäistä kasvimateriaalia ja saadaan varakasveja, joita käytetään juurien kasvun tarkastamiseen välittömästi ennen käsittelyä ja joita kerätään versojen biomassan ja pituuden mittauksiin päivänä 0.

44. Versot istutetaan siten, että noin 3 cm osuus, jossa on vähintään kaksi niveltä, on sedimentin pinnan alla.

45. Tämän jälkeen ruukut siirretään testiastioihin samoissa ympäristöolosuhteissa kuin joita käytetään altistusvaiheessa ja niitä ylläpidetään seitsemän päivän ajan Smartin ja Barkon kasvualustassa juurien kehittymisen indusoimiseksi.

46. Tämän jälkeen vararuukuista otetaan useita kasveja juurien kasvun tarkastamiseksi. Jos näkyvää juurien kasvua ei ole (eli juurien kärkiä ei näy), perustamisvaihetta jatketaan, kunnes juurien kasvu on näkyvää. Tämä vaihe on suositeltava sen varmistamiseksi, että kasvit kasvavat aktiivisesti, kun testi aloitetaan.

▼M7

Yhtenäisen kasvimateriaalin valinta

47. Testimenetelmää A (yksi verso ruukkua kohti ja kolme ruukkua astiaa kohti) varten ruukut valitaan yhtenäisyyden perusteella ennen testin aloittamista. Testimenetelmää B (kolme versoa ruukkua kohti ja yksi ruukku astiaa kohti) varten ylimääräiset kasvit poistetaan siten, että jäljelle jää kolme kooltaan ja ulkonäöltään yhtenäistä kasvia.

Altistaminen vesifaasin kautta

48. Yhtenäisyyden perusteella valitut ruukut sijoitetaan testiastioihin koejärjestelyn edellyttämällä tavalla. Tämän jälkeen testiastioihin lisätään Smartin ja Barkon kasvualustaa. Varovaisuutta on noudatettava, jotta vältetään sedimentin sekoittumista. Tätä varten viljelyaine voidaan lisätä suppilon avulla tai sedimentti voidaan peittää muovilevyllä kaadettaessa viljelyainetta testiastioihin edellyttäen, että levy poistetaan välittömästi tämän jälkeen. Vaihtoehtoisesti kasviruukut voidaan sijoittaa testiastioihin viljelyaineen lisäämisen jälkeen. Molemmissa tapauksissa altistusvaiheen alussa voidaan tarvittaessa käyttää tuoretta viljelyainetta mahdollisen levien ja bakteerien muodostumisen minimoimiseksi ja yksittäisten testiliuoserien valmistamisen mahdollistamiseksi eri toistoissa.

49. Verson sedimentin yläpuolinen pituus mitataan joko ennen viljelyaineen lisäämistä tai sen jälkeen.

50. Asianmukaiset testikemikaalimäärät voidaan lisätä testiviljelyaineeseen ennen sen lisäämistä testiastioihin. Vaihtoehtoisesti testikemikaali voidaan lisätä viljelyaineeseen sen jälkeen, kun viljelyaine on lisätty testiastioihin. Tässä tapauksessa on huolehdittava siitä, että testikemikaali jakautuu tasaisesti koko testijärjestelmään sekoittamatta sedimenttiä.

51. Kaikissa tapauksissa testiviljelyaineen ulkonäkö (esimerkiksi kirkas tai samea) kirjataan testin alussa.

Altistus sedimentin kautta

52. Sedimentit, joiden pitoisuus on haluttu, valmistetaan yleensä lisäämällä testikemikaaliliuosta suoraan tuoreeseen sedimenttiin. Testiaineen kantaliuos, joka on liuotettu deionisoituun veteen, sekoitetaan synteettiseen sedimenttiin valssauskoneella, sekoittimella tai käsin. Jos testikemikaali liukenee huonosti veteen, se voidaan liuottaa käyttämällä pienintä mahdollista määrää soveltuvaa orgaanista liuotinta (esim. heksaania, asetonia tai kloroformia). Seuraavaksi liuokseen sekoitetaan 10 g hienoa kvartsihiekkaa yhtä testiastiaa kohden. Sen jälkeen liuottimen annetaan haihtua ja hiekka sekoitetaan sopivaan määrään sedimenttiä dekantterilasia kohti. Testikemikaalin liuottamiseen, dispergoimiseen tai emulgointiin saa käyttää vain helposti haihtuvia aineita. On muistettava, että testikemikaalilla käsitellyn hiekan tilavuus/paino on otettava huomioon sedimentin lopullisessa valmistuksessa (eli sedimentin valmistamisessa on käytettävä vähemmän hiekkaa). Varmista huolellisesti, että sedimenttiin lisättävä testikemikaali sekoittuu sedimenttiin hyvin ja tasaisesti.

53. Ruukut täytetään testikemikaalilla käsitellyllä sedimentillä (edellä kuvatun mukaisesti). Yhtenäisyyden ja riittävän juuriston perusteella valitut kasvit poistetaan perustamisvaiheen aikana käytetyistä ruukuista ja istutetaan testikemikaalilla käsiteltyyn sedimenttiin edellä kuvatun mukaisesti.

54. Ruukut sijoitetaan testiastioihin koejärjestelyn edellyttämällä tavalla. Tämän jälkeen lisätään Smartin ja Barkon kasvualustaa varovaisesti (esimerkiksi suppilon avulla), jotta sedimenttiä ei sekoiteta. Verson sedimentin yläpuolinen pituus mitataan joko ennen viljelyaineen lisäämistä tai sen jälkeen.

▼M7

Vedenpinnan tason ylläpito testin aikana

55. Lopullinen veden tilavuus on kirjattava ja vedenpinnan taso on merkittävä jokaiseen testiastiaan. Jos vettä haihtuu testin aikana yli 10 prosenttia, vedenpinnan tasoa on säädettävä tislatulla vedellä. Tarvittaessa dekantterilasit voidaan peittää löyhästi esimerkiksi muovisilla läpinäkyvillä kansilla, haihtumisen ja leväitiökontaminaation minimoimiseksi.

Testiolosuhteet

56. Testissä käytetään lämpimän- tai kylmänvalkoista loistevaloa, jotta valon säteilyvoimakkuudeksi saadaan noin 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, kun se mitataan fotosyynteesille suotuisalla aallonpituusalueella (400–700 nm) veden pinnasta, ja valoisien ja pimeiden jaksojen kestot ovat 16 tuntia valoa ja 8 tuntia pimeää. Valon säteilyvoimakkuus ei saa vaihdella enempää kuin ± 15 prosenttia testialueen yläpuolella.

57. Lämpötilan on oltava testiastioissa 20 ± 2 °C.

58. Yleensä kontrolliviljelyaineen pH-arvo saa kokeen aikana vaihdella enintään 1,5 yksikön verran. Tätä suurempi poikkeama ei kuitenkaan mitätöi testiä, jos edellä määritettyjen validiteettivaatimusten voidaan osoittaa täyttyvän.

Testin kesto

59. Altistuksen kesto on 14 vuorokautta.

Mittaukset ja analyyttiset määritykset

60. Perustamisvaiheen jälkeen ja välittömästi ennen käsittelyä (eli päivänä 0) kerätään varakasveja viidestä satunnaisesti valitusta ruukusta, jos sovelletaan kolmea kasvia ruukkua kohti käyttävää testijärjestelyä, tai 15 ruukusta, jos sovelletaan yhtä kasvia ruukkua kohti käyttävää testijärjestelyä, verson pituuden ja tuore- ja kuivapainon määrittämiseksi jäljempänä kuvaillulla tavalla.

61. Altistusvaiheeseen siirretyistä kasveista tehdään seuraavat määritykset taulukon 1 mukaisesti:

— Pääverson pituuden, sivuversojen määrän ja sivuversojen pituuden määritykset kirjataan vähintään altistusajan lopussa (eli päivänä 14).

— Näönvaraiset arvioinnit kasvien terveydestä kirjataan vähintään kolme kertaa altistusajan aikana (esimerkiksi päivinä 0, 7 ja 14).

— Versojen tuorepaino ja kuivapaino määritetään testin lopussa (eli päivänä 14).

62. Verson pituus määritetään mittaviivaimella. Jos sivuversoja on, niiden määrä ja pituus on myös määritettävä.

63. Näönvaraiset arvioinnit kasvien terveydestä tehdään kirjaamalla kasvien ulkonäkö ja testiviljelyaineen yleistila. Havainnoitavia seikkoja ovat muun muassa

— nekroosi, kloroosi tai muut värimuutokset, kuten kontrollikasveihin verrattuna liiallinen punertuminen

— bakteeri- tai leväkontaminaation muodostuminen

— kasvuhäiriöt, kuten hidastunut kasvu, muutokset nivelvälin pituudessa, epämuodostuneet versot/lehdet, sivuversojen lisääntyminen, lehtien menetys, nestejännityksen häviäminen ja varren fragmentoituminen.

▼M7

— Juurien terveys arvioidaan näönvaraisesti testin lopussa pesemällä varovaisesti sedimentti juurista, jotta juuristoa voidaan havainnoida. Ehdotettu arviointiskaala kontrollikasveihin verrattuna on seuraava:

1) ei juuria

2) vähän juuria

3) juuret kehittyneet kohtalaisesti

4) juuret kehittyneet erittäin hyvin, kontrolleja vastaavasti.

64. Versojen tuorepaino määritetään testin alussa ja lopussa katkaisemalla verso sedimentin tasolta ja imeyttämällä se kuivaksi ennen punnitsemista. Verson tyveen mahdollisesti tarttuneet sedimenttihiukkaset on poistettava huolellisesti. Tämän jälkeen versomateriaali kuivataan kuivausuunissa, jonka lämpötila on noin 60 °C, vakiopainoon, minkä jälkeen se punnitaan uudelleen ja kirjataan kuivapaino.

65. Taulukossa 1 esitetään yhteenveto testin aikana tehtävistä biologisista vähimmäisarvioinneista.

Taulukko 1

Arviointiaikataulu

Käsittelyn jälkeinen päivä nro	*Myriophyllum spicatum*			
	Verson pituus, sivuversojen pituus ja määrä	Versojen näönvarainen arviointi	Versojen tuore- ja kuivapaino Juurien näönvarainen arviointi	pH O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: arvioinnit on tehtävä näinä päivinä.
—: mittauksia ei tarvita.

Mittausten ja analyyttisten määritysten tiheys

66. Viljelyaineen lämpötila ylimääräisessä astiassa, jota säilytetään kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa samoissa olosuhteissa, on mitattava vähintään kerran päivässä (tai jatkuvasti tiedonkeruulaitteen avulla).

67. Testiviljelyaineen pH ja liuenneen hapen pitoisuus on tarkistettava testin alussa, ainakin kerran testin aikana ja testin lopussa kaikissa toistoissa käytetyissä astioissa. Kullakin kerralla mittaukset on tehtävä samaan aikaan päivästä. Jos kaikkien toistojen valmistamiseen kussakin pitoisuudessa käytetään bulkkiliuoksia, on hyväksyttävää tehdä vain yksi mittaus kustakin bulkkiliuoksesta päivänä 0.

68. Valon voimakkuus kasvatuskaapissa, inkubaattorissa tai huoneessa on mitattava pisteistä, jotka ovat samalla etäisyydellä veden pinnasta. Mittaukset on tehtävä ainakin kerran testin alussa tai sen aikana. Valoilmaisin- ja valonmittausmenetelmä ja erityisesti anturityyppi vaikuttavat mittausarvoon. Pallomaiset anturit (jotka reagoivat valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason ylä- ja alapuolelta) ja kosinikorjaimella varustetut anturit (jotka reagoivat

▼M7

valoon mistä tahansa kulmasta mittaustason yläpuolelta) ovat suositeltavampia kuin yksisuuntaiset anturit. Ensin mainitut antavat suurempia lukemia mitattaessa tässä kuvatun kaltaista monipisteistä valonlähdettä.

Testikemikaalin analyyttiset mittaukset

69. Testikemikaalin asianmukaisen applikoinnin tueksi on tehtävä testikemikaalin pitoisuuksien analyyttisia mittauksia.

70. Testikemikaalin analyysiä varten on otettava vesinäytteitä pian testin aloittamisen jälkeen (stabiilien testikemikaalien applikointipäivänä tai tunti epästabiilien kemikaalien applikoinnin jälkeen) ja testin lopussa kaikista testipitoisuuksista.

71. Pitoisuudet sedimentissä ja sedimentin huokosvedessä on määritettävä testin alussa ja lopussa vähintään suurimmassa testipitoisuudessa, ellei testikemikaalien tiedetä olevan stabiileja vedessä (> 80 prosenttia nimellisarvosta). Sedimentin ja huokosveden mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen, jos testikemikaalin jakautuminen veden ja sedimentin välille on määritetty selkeästi vesi/sedimentti-tutkimuksessa vastaavissa olosuhteissa (esim. sedimentin ja veden suhde, applikointimenetelmä, sedimenttityyppi).

72. Näytteenotto sedimentistä testin alussa häiritsee todennäköisesti testijärjestelmää. Näin ollen saatetaan tarvita ylimääräisiä käsiteltyjä testiastioita analyyttisten määritysten helpottamiseksi testin alussa ja lopussa. Vastaavasti jos päivänä 7 tehtävät väliarvioinnit katsotaan tarpeellisiksi ja analyysit edellyttävät suuria sedimenttinäytteitä, joita ei voida helposti poistaa testijärjestelmästä, analyyttiset määritykset on tehtävä käyttämällä ylimääräisiä testiastioita, jotka on käsitelty samalla tavoin kuin biologisiin arviointeihin käytettävät astiat.

73. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esim. 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testikemikaali ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää. Joissain tapauksissa pitoisuuksien analysoiminen huokosvedestä ei ehkä ole mahdollista, jos näytteen koko on liian pieni.

74. Semistaattisissa testeissä (altistus vesifaasin kautta), joissa testikemikaali(e)n pitoisuuksien ei oleteta pysyvän 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta koko testin ajan ilman testiliuosten vaihtamista, on kaikista käytetyistä ja vastavalmistetuista testiliuoksista otettava kunkin vaihdon yhteydessä näyte testikemikaalin pitoisuuden analyysia varten..

75. Tapauksissa, joissa testikemikaalin mitattu alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta, mutta joissa voidaan antaa riittävä näyttö siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavissa ja stabiileja (toisin sanoen 80–120 prosenttia alkupitoisuudesta), kemialliset määritykset voidaan tehdä ainoastaan suurimmista ja pienimmistä testipitoisuuksista.

76. Joka tapauksessa testikemikaalin pitoisuus tarvitsee määrittää vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullekin pitoisuudelle. Vaihtoehtoisesti testiliuokset kaikista kunkin pitoisuuden toistoista voidaan yhdistää analysointia varten.

77. Jos on näyttöä siitä, että testipitoisuus on pysynyt tyydyttävästi 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten analysointi ja sitä seuraava päätepisteiden johtaminen voi perustua nimellispitoisuuksiin tai mitattuihin alkupitoisuuksiin.

▼M7

78. Näissä tapauksissa vaikutuspitoisuuksien on perustuttava nimellispitoisuuksiin tai testin alussa vedestä mitattuihin pitoisuuksiin.

79. Jos kuitenkin on näyttöä siitä, että pitoisuus on laskenut (eli se ei ole pysynyt 20 prosentin rajoissa nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta käsitellyssä osassa) testin aikana, tulosten analysoinnin on perustuttava altistuksen aikaisen pitoisuuden geometriseen keskiarvoon tai malleihin, jotka kuvaavat testikemikaalin pitoisuuden vähenemistä käsitellyssä osassa (11).

TIETOJEN ARVIOINTI

80. Tapauksissa, joissa tarvitaan liuottimen/dispergointiaineen käyttöä, liuotinkontrolleista ja käsittelemättömistä kontrolleista saadut tiedot voidaan yhdistää tilastoanalyysiä varten, mikäli käsittelemättömien ja liuotinkontrollien vasteet eivät poikkea tilastollisesti merkittävästi toisistaan.

Vastemuuttujat

81. Testin tarkoituksena on määrittää testikemikaalin vaikutukset testattavan lajin kasvuun kahden vastemuuttujan, keskimääräisen spesifisen kasvun ja tuotoksen, avulla seuraavasti:

Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus

82. Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä versojen kokonaispituuden, kokonaistuorepainon ja kokonaiskuivapainon logaritmiarvossa tietyn ajan kuluessa tapahtuneen muutoksen perusteella. Tämä muuttuja lasketaan kunkin kontrolli- ja käsitellyn ryhmän jokaisesta toistosta. Kussakin testiastiassa (toisto) olevien kolmen kasvin keskipituus ja -paino ja sen perusteella kunkin toisto kasvunopeus lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

jossa

μ_{i-j} = keskimääräinen spesifinen kasvunopeus aikavälillä i–j

N_i = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä i

N_j = testi- tai kontrolliryhmän astiasta määritetty mittausmuuttujan arvo hetkellä j

t = aikaväli i–j

83. Toistojen vasteista lasketaan kunkin testi- ja kontrolliryhmän kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

84. Keskimääräinen spesifinen kasvunopeus on laskettava koko testijaksolta (edellä olevassa kaavassa hetki ”i” tarkoittaa testin alkua ja hetki ”j” testin päättymistä). Kullekin testipitoisuudelle ja kontrollille lasketaan keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden keskiarvo varianssiestimaatteineen.

▼M7

85. Kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen (I_r) voidaan sen jälkeen laskea kutakin testipitoisuutta varten (käsittelyryhmässä) seuraavan kaavan avulla:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

jossa

% Ir= keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden prosentuaalinen estyminen

μC= μ:n keskiarvo kontrolliryhmässä

μT= μ:n keskiarvo käsittelyryhmässä.

Tuotos

86. Tämä vastemuuttuja lasketaan kontrolleista ja kustakin käsitellystä ryhmästä versojen kokonaispituudessa, kokonaistuorepainossa ja kokonaiskuivapainossa tietyn ajan kuluessa tapahtuneen muutoksen perusteella. Tuotoksen prosentuaalinen estyminen (% Iy) voidaan laskea kutakin käsittelyryhmää varten seuraavasti:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

jossa

% I_y= tuotoksen prosentuaalinen estyminen

b_C= kontrolliryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa

b_T= käsittelyryhmän lopullinen biomassa, josta on vähennetty sen biomassa testin alussa.

Pitoisuus-vastekäyrien piirtäminen

87. Pitoisuus-vastekäyrät piirretään merkitsemällä y-akselille vastemuuttujan keskimääräinen prosentuaalinen estyminen (vastemuuttujana on I_r tai I_y, joka lasketaan edellä esitetyn mukaisesti) ja x-akselille testiaineen pitoisuuden logaritmi.

EC_x-pitoisuuden arviointi

88. EC_x-pitoisuuden (esimerkiksi EC_{50}-pitoisuuden) estimaattien on perustuttava sekä keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen (E_rC_x) että tuotokseen (E_yC_x), joista kummankin on puolestaan perustuttava versojen kokonaistuorepainoon, versojen kokonaiskuivapainoon ja versojen kokonaispituuteen.

89. On syytä huomata, että näiden kahden vastemuuttujan avulla lasketut EC_x-arvot eivät ole vertailukelpoisia, mikä on otettava huomioon käytettäessä testin tuloksia. Jos testiolosuhteet ovat tämän testimenetelmän mukaiset, keskimääräiseen spesifiseen kasvunopeuteen perustuvat EC_x-arvot (E_rC_x) ovat useimmiten suurempia kuin tuotokseen perustuvat arvot (E_yC_x), mikä johtuu niiden matemaattisista perusteista. Tätä ei pidä tulkita siten, että näiden kahden vastemuuttujan herkkyydet olisivat erilaiset, vaan arvojen välinen ero on puhtaasti matemaattinen.

Tilastomenetelmät

90. Tavoitteena on saada kvantitatiivinen pitoisuus-vastesuhde regressioanalyysin avulla. Painotettua lineaarista regressiota voidaan käyttää sen jälkeen, kun vastetiedoille on tehty linearisoiva muunnos – esimerkiksi probitti-, logittitai Weibull-yksiköiksi (13) – mutta suositeltavampaa on käyttää epälineaarisia regressiomenetelmiä, joilla voidaan paremmin käsitellä tiedoissa väistämättä esiintyviä epäsäännöllisyyksiä sekä poikkeamia tasaisista jakaumista. Lähestyttäessä tilaa, jossa kasvu ei esty ollenkaan tai estyminen on täydellistä, linearisoiva muunnos voi suurentaa epäsäännöllisyyksiä ja haitata siten

▼M7

analyysiä (13). On syytä huomata, että standardianalyysimenetelmät, joissa käytetään probitti-, logitti- tai Weibull-muunnoksia, on tarkoitettu dikotomisia tietoja varten (kun vasteita on kaksi, esimerkiksi kuolleisuus tai eloonjääminen), minkä vuoksi niitä on mukautettava, jos niitä aiotaan käyttää kasvu- tai tuotostietojen analysointiin. Kirjallisuusviitteissä (14), (15), (16) ja (17) kuvataan erityismenetelmiä, joilla EC_x-arvot voidaan määrittää jatkuvista tiedoista.

91. Kunkin vastemuuttujan analysoimiseksi käytetään pitoisuus-vastesuhdetta, jonka avulla lasketaan EC_x-arvojen piste-estimaatit. Kunkin estimaatin osalta määritetään 95 prosentin luottamusrajat, ja vastetietojen ja regressiomallin välinen yhteensopivuuden aste on arvioitava joko graafisesti tai tilastollisesti. Regressionanalyysi on tehtävä käyttämällä yksittäisiä toistojen vasteita eikä käsittelyryhmien keskiarvoja.

92. EC_{50}-estimaatit ja luottamusvälit saadaan myös käyttämällä lineaarista interpolointia bootstrap-menetelmän kanssa (18), jos käytettävissä olevat regressiomallit tai -menetelmät eivät sovellu kyseisten tietojen käsittelyyn.

93. LOEC-pitoisuuden ja siten myös NOEC-pitoisuuden arvioimiseksi on verrattava käsiteltyjen liuosten keskiarvoja käyttämällä varianssianalyysitekniikoita (ANOVA). Kunkin pitoisuuden keskiarvoa verrataan tämän jälkeen kontrollin keskiarvoon käyttämällä sopivaa testimenetelmää (esimerkiksi Dunnettin tai Williamsin testiä) (19) (20) (21) (22). Lisäksi on arvioitava, pitääkö ANOVA-oletus varianssin normaalijakaumasta (ND) ja varianssin homogeenisuudesta (VH) paikkansa. Tämä arviointi on tehtävä Shapiro-Wilk-testillä (ND) tai Levenen testillä (VH). Jos oletus varianssien normaalijakaumasta ja homogeenisuudesta ei pidä paikkaansa, tilanne on joskus korjattavissa tietojen logaritmimuunnoksella. Jos varianssin heterogeenisuus ja/tai poikkeama normaalijakaumasta on erittäin suuri eikä se ole korjattavissa muunnoksella, on harkittava analysointia sellaisilla menetelmillä kuin Bonferronin ja Welchin t-testi, alaspäin askeltava Jonckheere-Terpstra-testi ja Bonferronin mediaanitesti. Kirjallisuusviitteessä (16) annetaan lisäohjeita NOEC-arvon määrittämisestä.

RAPORTOINTI

94. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi. rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemikaaliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista ja niin edelleen.

Useista ainesosista koostuvat aineet, koostumukseltaan tuntemattomat tai vaihtelevat aineet ja seokset:

— luonnehditaan mahdollisimman tarkoin ainesosien kemiallinen koostumuksen (ks. edellä), esiintymistiheyden ja fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien avulla.

Testilajit

— tieteellinen nimi ja alkuperä.

Testiolosuhteet

— perustamisvaiheen kesto ja olosuhteet

— testauksessa käytetty menetelmä (staattinen, semistaattinen tai sykäysannosmenetelmä)

▼M7

— testin alkamispäivä ja kesto

— testiviljelyaine eli sedimentti ja ravinneliuos

— kuvaus testijärjestelystä: kasvatuskaappi tai -huone tai laboratorio, testiastiat ja kannet, liuosmäärät, testikasvien pituus ja paino testiastiaa kohti testin alussa, sedimentin pinta-alan suhde veden pinta-alaan, sedimentin ja veden tilavuuden suhde

— testipitoisuudet (nimellis- ja mitatut pitoisuudet tapauksen mukaan) sekä toistojen määrä pitoisuutta kohden

— kanta- ja testiliuosten valmistusmenetelmät, mukaan luettuina tiedot mahdollisesta liuottimen tai dispergointiaineen käytöstä

— lämpötila testin aikana

— valonlähde, säteilyvoimakkuus ($\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$)

— testi- ja kontrolliviljelyaineiden pH-arvot sekä testiviljelyaineiden ulkonäkö testin alussa ja lopussa

— happipitoisuudet

— analyysimenetelmä sekä laadunarviointiin tarvittavat tiedot (validointitutkimukset, analyysien keskihajonnat ja luottamusvälit)

— mittausmuuttujien, kuten pituuden, kuivapainon ja tuorepainon, määritysmenetelmät

— kaikki poikkeamat tästä testimenetelmästä.

Tulokset

— käsittelemättömät tulokset: kussakin ruukussa olevien kasvien versojen pituus ja paino sekä muut mittausmuuttujat kussakin testi- ja kontrolliastiassa kullakin taulukossa 1 esitetyn arviointiaikataulun mukaisella havainnointi- ja analysointikerralla

— kunkin mittausmuuttujan keskiarvot ja keskihajonnat

— kunkin pitoisuuden kasvukäyrät

— kaksinkertaistumisaika/kasvunopeus kontrollissa versojen pituuden ja tuorepainon perusteella, tuorepainon tuotoksen variaatiokerroin mukaan luettuna

— kunkin käsitellyn toiston lasketut vastemuuttujat sekä toistojen keskiarvot ja variaatiokerroin

— pitoisuuden ja vaikutuksen välisen suhteen graafinen esitys

— toksisuusarvioinnin päätepisteiden estimaatit vastemuuttujien osalta, esimerkiksi EC_{50}, ja vastaavat luottamusvälit; LOEC- ja/tai NOEC-pitoisuus, jos ne on laskettu, ja niiden määrityksessä käytetyt tilastomenetelmät

— jos on käytetty ANOVA-analyysiä, havaittavissa olevan vaikutuksen suuruus (esimerkiksi pienin merkitsevä erotus)

— mahdollinen kasvun edistyminen käsittelyissä

▼M7

— näkyvät merkit fytotoksisuudesta ja testiliuoksia koskevat havainnot

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) Tässä liitteessä oleva C.26 luku: Limaskojen (Lemna-lajien) kasvunestymistesti.

(2) Tässä liitteessä oleva C.3 luku: Makean veden levien ja syanobakteerien kasvunestymistesti

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, s. 199–206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, s. 715–722.

(7) Tässä liitteessä oleva C.50 luku: Sedimentitön *Myriophyllum spicatum* -lajilla tehtävä toksisuustesti.

(8) Tässä liitteessä oleva C.28 luku: Toksisuustesti *Chironomid*-eliöllä vesi-sedimenttisysteemissä käyttäen vettä, johon tutkittavaa ainetta on lisätty.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), ”Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using M. aquaticum and M. spicatum grown in a water-sediment system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, s. 231–237.

(11) OECD (2000), ”Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, s. 251–263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, s. 713–718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, s. 157–167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, s. 1485–1494.

(16) OECD (2006), ”Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, s. 93–96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, s. 1096–1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, s. 482–491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, s. 103–117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, s. 519–531.

▼**M7**

Lisäys 1

SMARTIN JA BARKON KASVUALUSTAN KOOSTUMUS

Ainesosa	Veteen (*) lisätty reagenssin määrä (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (ilmatasapaino)	7,9

(*) Demineralisoitua (eli tislattua tai deionisoitua) vettä.

▼M7

Lisäys 2

MÄÄRITELMÄT

Biomassa: Populaatiossa olevan elävän materiaalin tuore- ja/tai kuivapaino. Tässä testissä biomassa on pääverson, kaikkien sivuhaarojen ja kaikkien juurien summa.

EC_x: Testiviljelyaineeseen liuenneen testikemikaalin pitoisuus, jossa *Myriophyllum spicatum* -kasvin kasvu vähenee x prosenttia (esimerkiksi 50 prosenttia) määrätyn altistusajan kuluessa (altistusaika on mainittava erikseen, jos se poikkeaa testin kokonaiskestosta tai normaalista kestosta). Jotta kasvunopeudesta ja tuotoksesta johdetut EC-arvot erottuisivat selvästi toisistaan, edellisestä käytetään symbolia ”E_rC” ja jälkimmäisestä symbolia ”E_yC”, joiden jälkeen mainitaan mittausmuuttuja, esimerkiksi E_rC (pääverson pituus).

Kasvu: mittausmuuttujan, kuten pääverson pituuden, sivuhaarojen kokonaispituuden, versojen kokonaispituuden, juurien kokonaispituuden, tuorepainon, kuivapainon tai kiehkuroiden määrän, kasvaminen testijakson aikana.

Kasvunopeus (keskimääräinen spesifinen kasvunopeus): mitattavan muuttujan logaritminen kasvu altistuksen aikana. *Huomautus*: Kasvunopeuteen liittyvät vastemuuttujat ovat riippumattomia testin kestosta, jos altistamattomien kontrollieliöiden kasvu on eksponentiaalista.

Kemikaali: aine tai seos.

Kloroosi: koe-eliön, erityisesti kiehkuroiden, värin muutos vihreästä kellertäväksi.

Mittausmuuttujat: Kaikentyyppiset muuttujat, jotka mitataan testin päätepisteen ilmaisemiseksi yhden tai useamman erilaisen vastemuuttujan avulla. Tässä testimenetelmässä mittausmuuttujia ovat pääverson pituus, sivuhaarojen kokonaispituus, versojen kokonaispituus, juurien kokonaispituus, tuorepaino, kuivapaino ja kiehkuroiden määrä.

Monokulttuuri: yhtä kasvilajia sisältävä viljelmä.

Nekroosi on testieliön kuollutta (eli valkoista tai tummanruskeaa) kudosta.

Pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC): Pienin testattu pitoisuus, jossa kemikaalilla havaitaan olevan tietyn altistusajan kuluessa tilastollisesti merkittävä kasvua vähentävä vaikutus verrattuna kontrolliin (kun $p < 0,05$). Ehtona on myös, että kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu.

Pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC): lähin LOEC-pitoisuutta pienempi testipitoisuus.

Semistaattinen (ajoittaisvaihtoinen) testi: testi, jossa testiliuos vaihdetaan tietyin väliajoin testin aikana.

Staattinen testi: testi, jossa testiliuosta ei vaihdeta testin aikana.

Testikemikaali on tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Testin päätepiste kuvaa yleistä tekijää, joka testin tavoitteen mukaisesti muuttuu testikemikaalin vaikutuksesta verrattuna kontrolliin. Tässä testimenetelmässä testin päätepisteenä on kasvun estyminen, joka voidaan ilmaista erilaisilla vastemuuttujilla, jotka perustuvat yhteen tai useampaan mittausmuuttujaan.

▼M7

Testiviljelyaine: Täydellinen synteettinen ravinneliuos, jossa testikasvit kasvavat, kun ne altistetaan testikemikaalille. Yleensä testikemikaali liuotetaan testiviljelyaineeseen.

Tuotos: altistusajan lopussa mitattu biomassaa ilmaisevan mittausmuuttujan arvo, josta on vähennetty altistusajan alussa mitattu saman mittausmuuttujan arvo. Huom. Kun altistamattomien eliöiden kasvu on eksponentiaalista, tuotokseen perustuvat vastemuuttujat vähenevät testin keston pidentyessä.

UVCB-aine: koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

Vastemuuttuja: Muuttuja, jonka avulla arvioidaan toksisuutta. Vastemuuttuja johdetaan erilaisia laskentamenetelmiä käyttämällä mistä tahansa mitatusta muuttujasta, joka kuvaa biomassaa. Tässä testimenetelmässä kasvunopeus ja tuotos ovat vastemuuttujia, jotka on johdettu mittausmuuttujista, kuten pääverson pituudesta, versojen kokonaispituudesta, tuorepainosta, kuivapainosta tai kiehkuroiden määrästä.

▼M8

C.52. MEDAKALLA TEHTÄVÄ PIDENNETTY YHDEN SUKUPOLVEN LISÄÄNTYMISTESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta (TG) 240 (2015). Medakalla tehtävässä pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistestissä (MEORG-testi) kuvataan laaja testimenetelmä, joka perustuu kalojen altistamiseen useiden sukupolvien ajan. Testistä saadaan oleellista tietoa kemikaalien aiheuttamien ympäristöriskien ja muiden riskien arviointiin, myös hormonaalisten haitta-aineiden osalta. Medakalla tehtävässä pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistestissä altistusta jatketaan kuoriutumiseen (kaksi viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) saakka toisessa sukupolvessa (F2). Lisää tutkimusta tarvitaan sen hyödyllisyyden perustelemiseksi, että F2-sukupolven tutkimusta jatkettaisiin kuoriutumisen jälkeen; tällä hetkellä tietoa on liian vähän, jotta voitaisiin laatia asianmukaiset ehdot tai perusteet F2-sukupolven tutkimuksen pidentämiselle. Tätä testimenetelmää voidaan kuitenkin päivittää uusien tietojen ja tutkimustulosten myötä. Ohjeet esimerkiksi F2-sukupolven tutkimuksen pidentämisestä lisääntymisen osalta voivat olla hyödyllisiä tietyissä olosuhteissa (esimerkiksi kemikaalit, joiden biokertyvyyspotentiaali on suuri tai jos on merkkejä sukupolvien välisistä vaikutuksista muissa taksoneissa). Tätä testimenetelmää voidaan käyttää kemikaalien ja myös mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden mahdollisten pitkäaikaisten, kaloihin kohdistuvien vaikutusten arvioinnissa. Menetelmässä keskitytään ensisijaisesti mahdollisiin populaation kannalta merkityksellisiin vaikutuksiin (ts. eloonjäämiseen, kehitykseen, kasvuun ja lisääntymiseen kohdistuviin haittavaikutuksiin), jotta voidaan laskea NOEC-arvo (No Observed Effect Concentration, pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta) tai ECx-arvo (Effect Concentration, vaikuttava pitoisuus). On kuitenkin syytä todeta, että ECx-arvoon perustuvat lähestymistavat soveltuvat vain harvoin tämäntyyppisiin laajoihin tutkimuksiin, joissa testipitoisuuksien määrän lisääminen halutun ECx-arvon määrittämiseksi voi olla epäkäytännöllistä, ja se voi aiheuttaa myös merkittäviä huolenaiheita eläinten hyvinvoinnista, koska niissä tarvitaan paljon koe-eläimiä. Muut testimenetelmät voivat olla sopivampia sellaisille kemikaaleille, jotka eivät edellytä usean sukupolven mittaista arviointia tai jotka eivät ole mahdollisia hormonaalisia haitta-aineita (1), Medaka on tarkoituksenmukainen laji käytettäväksi tässä testimenetelmässä, koska sen elinkaari on lyhyt ja koska on mahdollista määrittää sen geneettinen sukupuoli (2), jota pidetään tärkeänä seikkana tässä testimenetelmässä. Tässä menetelmässä kuvatut menettelyt ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään medakaa. Muut pienet kalalajit (esimerkiksi seeprakala) voivat soveltua käytettäväksi samanlaisen testiprotokollan yhteydessä.

2. Tässä testimenetelmässä mitataan useita biologisia päätetapahtumia. Pääpainopiste on mahdollisissa populaation kannalta merkityksellisissä parametreissa, joita ovat esimerkiksi eloonjääminen, kokonaiskehitys, kasvu ja lisääntyminen. Jotta saadaan mekanistista tietoa ja voidaan todeta yhteys muiden kenttä- ja laboratoriotutkimusten tulosten välillä, kun kemikaalin mahdollisesta hormonitoimintaa häiritsevästä vaikutuksesta (kuten androgeenisesta tai estrogeenisesta aktiivisuudesta muissa testeissä ja määrityksissä) on *a posteriori* -näyttöä, hankitaan myös muuta hyödyllistä tietoa mittaamalla *vitellogeniinin* (*vtg)* mRNA (tai vitellogeniiniproteiini, VTG) sekä geneettiseen sukupuoleen liittyvät fenotyyppiset sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja arvioidaan histopatologiaa. Jos testikemikaalin tai sen metaboliittien ei oleteta olevan hormonaalisia haitta-aineita, näitä toissijaisia päätetapahtumia ei välttämättä ole tarpeen mitata, ja sellaiset tutkimukset, joissa tarvitaan vähemmän resursseja ja koe-eläimiä, voivat olla tarkoituksenmukaisempia (1). Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on selostettu lisäyksessä 1.

▼M8

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

3. Tämän melko monimutkaisen testin validoinnissa testattiin vähän kemikaaleja, ja validointiin osallistui vain muutama laboratorio. Sen vuoksi on oletettavaa, että kun saatavilla on riittävä määrä tutkimuksia, joilla voidaan vahvistaa tämän rakenteeltaan uudenlaisen tutkimuksen vaikutus, tämä testimenetelmä arvioidaan ja sitä muutetaan tarvittaessa kertyneen kokemuksen perusteella. Tietoja voidaan käyttää OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasolla 5 (3). Testin alussa sukukypsät kalat (sukupolvi F0) altistetaan testikemikaalille lisääntymisvaiheessa. Altistusta jatketaan F1-sukupolven osalta kehitys- ja lisääntymisvaiheeseen ja F2-sukupolven osalta kuoriutumisvaiheeseen. Näin testissä voidaan arvioida sekä rakenteellisia että aktivaatioon perustuvia endokriinisiä reittejä. Endokriinisten päätetapahtumien tulkinnassa voidaan soveltaa näyttöön perustuvaa lähestymistapaa.

4. Testissä on oltava riittävä määrä yksilöitä, jotta lisääntymisen kannalta merkityksellisten päätetapahtumien arvioinnin voima on riittävä (ks. lisäys 3). Samalla on kuitenkin huolehdittava siitä, että testissä käytetään mahdollisimman vähän koe-eläimiä eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä. Käytettävien koe-eläinten suuren määrän vuoksi on tärkeää arvioida testin tarpeellisuus huolellisesti siihen nähden, että olemassa olevat tutkimustulokset voivat jo sisältää oleellista tietoa monista tämän MEORG-testin päätetapahtumista. Tältä osin OECD:n kaloihin kohdistuvan myrkyllisyyden testausta koskevista toimintaohjeista (1) voi olla apua.

5. Testimenetelmä on suunniteltu ensisijaisesti erottelemaan yhdestä ainesosasta koostuvan aineen vaikutukset. Jos seoksen testaaminen on kuitenkin tarpeen, on arvioitava, saadaanko testistä hyväksyttäviä tuloksia aiottuun sääntelytarkoitukseen.

6. Ennen testin aloittamista tutkimuksen tekijällä on oltava tietoa testikemikaalin fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. Tämä on tärkeää etenkin siksi, että voidaan valmistaa vakaita kemikaaliliuoksia. Lisäksi tarvitaan riittävän herkkä analyysimenetelmä testikemikaalien pitoisuuksien varmentamiseen.

TESTIN PERIAATE

7. Testi aloitetaan altistamalla sukukypsistä koiras- ja naaraskaloista (vähintään 12 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) koostuvat lisääntymisparit testikemikaalille kolmeksi viikoksi, jona aikana sitä annostellaan vanhemman sukupolven (F0) organismiin kemikaalin toksikokineettisen käyttäytymisen mukaisesti. Mahdollisimman lähellä neljännen viikon ensimmäistä päivää kerätään munat, joista syntyy F1-sukupolvi. F1-sukupolven kehittymisen aikana (yhteensä 15 viikkoa) arvioidaan kuoriutumista ja eloonjäämistä. Lisäksi kaloista otetaan näytteet 9–10 viikolla hedelmöittymisen jälkeen kehitykseen liittyvien päätetapahtumien tutkimiseksi, ja kutemista arvioidaan kolmen viikon ajan hedelmöittymisen jälkeisillä viikoilla 12–14. F2-sukupolvi luodaan kolmannen viikon jälkeen lisääntymisen arvioinnista, ja sitä kasvatetaan siihen saakka, kunnes kuoriutuminen on tapahtunut.

TESTIN VALIDITEETTIKRITEERIT

8. Testin validiteettiin sovelletaan seuraavia kriteerejä:

— Liuenneen hapen pitoisuus on oltava ≥ 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.

— Veden keskimääräisen lämpötilan on oltava 24–26 °C koko tutkimuksen ajan. Yksittäisten akvaarioiden lyhytaikaiset poikkeamat tästä keskiarvosta saavat olla enintään 2 °C.

▼M8

— Kummankin sukupolven (F0 ja F1) kontrollien keskimääräisen fekunditeetin on oltava suurempi kuin 20 munaa paria kohti päivässä. Kaikkien arviointijakson aikana tuotettujen munien hedelmällisyyden on oltava enemmän kuin 80 prosenttia. Lisäksi 16 parin suositelluista 24 kontrolliparista (> 65 prosenttia) tulisi tuottaa enemmän kuin 20 munaa paria kohti päivässä.

— Kontrollipareilla munien kuoriutumisasteen on oltava ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) (kummassakin sukupolvessa, F1 ja F2).

— F1-sukupolven osalta kuoriutumisen jälkeisen eloonjääneisyyden kolmannelle hedelmöittymisen jälkeiselle viikolle ja siitä lähtien tutkimuksen päättymiseen saakka (ts. 15. viikko hedelmöittymisen jälkeen) on oltava ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) ja ≥ 90 prosenttia (keskiarvo) vastaavissa kontrolleissa (F1).

— Saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

Veden lämpötilan osalta (vaikka se ei olekaan validiteettikriteeri) käsittelyn rinnakkaisnäytteet eivät saa erota toisistaan tilastollisesti, kuten eivät myöskään testin käsittelyryhmät (päivittäisten lämpötilamittausten perusteella ja hetkellisiä poikkeamia huomioon ottamatta).

9. Vaikka suuremmissa pitoisuusryhmissä voi olla havaittavissa lisääntymiskyvyn heikkenemistä, lisääntymisen on kuitenkin oltava riittävää vähintään kolmanneksi suurimman pitoisuuden ryhmässä ja kaikissa sitä pienemmän pitoisuuden ryhmissä F0-sukupolvessa, jotta kuoriutumisinkubaattorit olisivat tarpeeksi täysiä. Lisäksi F1-sukupolven kolmanneksi suurimman pitoisuuden ryhmässä ja sitä pienemmän pitoisuuden altistusryhmissä on oltava riittävästi eloonjääneitä alkioita, jotta päätetapahtumaa voidaan arvioida poikasvaiheen näytteenotossa (ks. 36 ja 38 kohta ja lisäys 9). F1-sukupolven toiseksi suurimman pitoisuuden ryhmässä kuoriutumisen jälkeisen eloonjääneisyyden on täytettävä vähimmäisvaatimus (~20 %). Nämä eivät ole varsinaisia validiteettikriteerejä, vaan suosituksia, jotta voidaan laskea pitävät NOEC-arvot.

10. Jos havaitaan poikkeama testin validiteettikriteereistä, sen vaikutukset testitulosten luotettavuuteen on otettava huomioon, ja nämä poikkeamat ja niihin liittyvät näkökohdat on sisällytettävä testiraporttiin.

MENETELMÄN KUVAUS

Laitteisto

11. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

a) happi- ja pH-mittarit

b) laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen

c) asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan

d) kemiallisesti inertistä materiaalista valmistetut säiliöt, jotka ovat riittävän suuria suhteessa suositeltuun kalamäärään ja kalatiheyteen (ks. lisäys 3)

e) riittävän tarkka vaaka (tarkkuus ± 0,5 mg).

▼M8

Vesi

12. Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji elää ja kasvaa sopivan kauan. Veden laadun pitäisi pysyä vakiona testin ajan. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testikemikaalia) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, on otettava säännöllisin väliajoin näytteitä määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2}), torjunta-aineet, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava esimerkiksi kuuden kuukauden välein, jos laimennusveden laadun tiedetään olevan suhteellisen vakio. Lisäyksessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia. Veden pH:n on oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin ± 0,5 pH-yksikköä.

Altistusjärjestelmä

13. Altistusjärjestelmän rakennetta ja käytettäviä materiaaleja ei ole määritetty tarkasti. Testijärjestelmän rakentamisessa on käytettävä lasia, ruostumatonta terästä tai muita kemiallisesti inerttejä materiaaleja, eikä järjestelmä ole saanut kontaminoitua edellisissä testeissä. Tähän testiin hyvin sopiva altistusjärjestelmä voi olla esimerkiksi laitteisto, jossa on jatkuva läpivirtaus (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

Testiliuokset

14. Testikemikaalin varastoliuosta on laitettava altistusjärjestelmään asianmukaisella pumpulla. Varastoliuoksen virtausnopeus on kalibroitava testiliuosten analyyttisten vahvistusten perusteella ennen altistumisen aloittamista, ja se on tarkistettava volymetrisesti säännöllisin väliajoin testin aikana. Kunkin kammion testiliuoksen on vaihduttava asianmukaisesti (esim. tilavuuden on vaihduttava vähintään 5 ja enintään 16 kertaa päivässä tai virtauksen on oltava vähintään 20 ml/min) sen mukaan, millainen on testikemikaalin stabiilius ja veden laatu.

15. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksesta laimentamalla. Varastoliuos tulee valmistaa mieluiten vain sekoittamalla tai ravistamalla testikemikaali laimennusveteen mekaanisin menetelmin (ts. sekoittamalla ja/tai ultraäänellä). Saturaatiopylväitä/-järjestelmiä tai passiivisia annostelumenetelmiä (14) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimien tai kantaja-aineiden käyttöä on pyrittävä välttämään kaikin keinoin, koska 1) tietyt liuottimet voivat aiheuttaa toksisuutta ja/tai ei-toivottuja tai odottamattomia vasteita, 2) kemikaalien testaaminen niiden vesiliukoisuuden ylittävänä määränä (kuten voi usein olla liuottimien käytön yhteydessä) voi johtaa vaikuttavien pitoisuuksien epätarkkoihin määrityksiin, 3) liuottimien käyttö pidempiaikaisissa testeissä voi johtaa huomattavaan biokalvon muodostumiseen, joka liittyy mikrobien toimintaan ja voi vaikuttaa ympäristöolosuhteisiin ja altistuspitoisuuksien säilymiseen, ja 4) jollei ole aikaisempia tietoja, jotka osoittavat, ettei liuotin vaikuta tutkimuksen tulokseen, liuottimien käyttö edellyttää liuotinkontrollikäsittelyä, millä on eläinten hyvinvointiin liittyviä seurauksia, koska testin tekemiseen tarvitaan lisää koe-eläimiä. Vaikeasti testattavien kemikaalien yhteydessä liuotinta voidaan käyttää viimesijaisena keinona, ja paras menetelmä on määritettävä OECD:n ohjeasiakirjan nro 23 (Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) perusteella. Liuotin valitaan testikemikaalin kemiallisten ominaisuuksien ja sen perusteella, onko liuottimen käytöstä saatavana aikaisempia tietoja. Jos liuottimia käytetään kantaja-aineena, asianmukaiset liuotinkontrollit on arvioitava muiden (negatiivisten) kontrollien lisäksi, jotka eivät ole liuottimia (pelkkä laimennusvesi). Jos liuottimen käyttö on välttämätöntä ja

▼M8

mikrobitoimintaa (biokalvon muodostumista) ilmenee, on suositeltavaa kirjata/ilmoittaa biokalvon muodostumista koskevat tiedot säiliötä kohti (vähintään viikoittain) koko testin ajan. Ihannetapauksessa liuotinpitoisuus olisi pidettävä vakiona liuotinkontrollissa ja kaikissa testikäsittelyissä. Jos liuottimen pitoisuus ei pysy vakiona, liuotinkontrollissa on käytettävä testikäsittelyn suurinta liuotinpitoisuutta. Jos käytetään liuotinta kantaja-aineena, suurin liuotinpitoisuus saa olla 100 µl/l tai 100 mg/l (15), mutta liuotinpitoisuus on suositeltavaa pitää mahdollisimman pienenä (esim. < 20 µl/l), jotta vältetään liuottimen mahdollinen vaikutus mitattuihin päätetapahtumiin (16).

Koe-eläimet

Kalojen valinta ja hoito

16. Testilajiksi on valittu medaka (*Oryzias latipes*) sen lyhyen elinkaaren ja geneettisen sukupuolen määrittämismahdollisuuden vuoksi. Vaikka muut pienet kalalajit voivat soveltua käytettäväksi samanlaisen testiprotokollan yhteydessä, tässä testimenetelmässä selostetut menetelmät ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään medakaa (ks. 1 kohta). Medakan on jo osoitettu lisääntyvän vankeudessa; sen kasvattamismenetelmiä on julkaistu (17) (18) (19), ja saatavana on tietoja lyhyen aikavälin kuolleisuutta sekä elinkaaren alkuvaihetta ja koko elinkaarta käsittelevistä testeistä (5) (6) (8) (9) (20). Kaloja on pidettävä olosuhteissa, joissa on 16 h valoisaa ja 8 h pimeää. Kaloja ruokitaan elävillä suolalehtijalkaisten (*Artemia* spp.) naupliusasteen toukilla, ja tarvittaessa ruokintaa voidaan täydentää kaupallisesti saatavalla hiutaleruoalla. Kaupallisesti saatava hiutaleruoka on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta.

17. Kunhan noudatetaan asianmukaisia eläintenhoitokäytäntöjä, erityistä kasvatusprotokollaa ei tarvita. Medakaa voidaan kasvattaa esimerkiksi kahden litran säiliöissä siten, että yhdessä säiliössä on 240 kalanpoikasta neljänteen hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon saakka. Sen jälkeen niitä kasvatetaan 10 kalan erissä kahden litran säiliötä kohti kahdeksanteen hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon saakka, jolloin ne siirretään lisääntymispareiksi kahden litran säiliöihin.

Totuttautumisvaihe ja kalojen valinta

18. Testikalat on valittava yhdestä laboratoriokannasta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuisessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä (huom. tämä totuttautumisvaihe ei ole altistusta edeltävä vaihe *in situ*). Testikalat on suositeltavaa hankkia laboratorion omasta kasvattamosta, koska sukukypsien kalojen kuljettaminen on kaloille stressaavaa ja voi vaikuttaa kutemiseen haitallisesti. Kaloja on ruokittava suolalehtijalkaisten nauplisasteen toukilla kahdesti päivässä tarkkailujakson ja altistusjakson ajan. Tarvittaessa ruokintaa voi täydentää kaupallisesti saatavalla hiutaleruoalla. Tämän testin aloittamiseksi tarvitaan vähintään 42 lisääntyvää paria (54 paria, jos testissä tarvitaan liuotinkontrolli osin sen vuoksi, ettei pelkän liuotittoma nkontrollin käyttöä tukevia aikaisempia tietoja ole), jotta rinnakkaisnäytteitä saadaan riittävästi. Lisäksi jokaisen F0-sukupolven lisääntyvästä parista on varmistettava, että ne ovat XX–XY (ts. että kummallakin sukupuolella on normaali määrä sukupuolikromosomeja), jotta testiin ei vahingossa oteta spontaanisti XX-tyypin koiraita (ks. 39 kohta).

▼M8

19. Totuttautumisvaiheessa kuolleiden kalojen määrä on kirjattava ylös, ja 48 tunnin asettautumisajan jälkeen on noudatettava seuraavia kriteerejä:

— Jos kuolleisuus on yli 10 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on 5–10 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: totuttautumista jatketaan vielä seitsemän päivää kahden viikon totuttautumisvaiheen jälkeen. Jos kuolleisuus on yli 5 prosenttia näiden seuraavien seitsemän päivän aikana, koko erä hylätään.

— Jos kuolleisuus on alle 5 prosenttia populaatiosta seitsemän päivää ennen testijärjestelmään siirtämistä: erä hyväksytään.

20. Kaloille ei tule antaa hoitoa sairauteen testiä edeltävän kahden viikon totuttautumisajan eikä altistusjakson aikana, ja sairauden hoitoa tulee välttää kokonaan, mikäli se on mahdollista. Tutkimuksessa ei tule käyttää kaloja, joilla on merkkejä jostakin sairaudesta. Tiedot havainnoista ja mahdollisista profylaktisista käsittelyistä ja sairauden hoidoista testiä edeltävän kasvatusvaiheen aikana on säilytettävä.

21. Altistusjakso on aloitettava sukupuolisesti dimorfisilla täysikasvuisilla kaloilla, joiden geneettinen sukupuoli on määritetty ja jotka ovat peräisin laboratorion sukukypsien eläinten kannasta, joita on kasvatettu 25 ± 2 °C:ssa. Kalojen on oltava sellaisia, joiden on osoitettu tuottaneen (elinkykyisiä) jälkeläisiä altistusta edeltäneellä viikolla. Testissä käytettävien kalojen koko ryhmän osalta yksittäisten kalojen sukupuolen mukaisen painon on oltava testin alussa ± 20 prosentin sisällä saman sukupuolen aritmeettisesta keskiarvopainosta. Osa kaloista on punnittava ennen testiä keskimääräisen painon arvioimiseksi. Valittujen kalojen on oltava iältään vähintään 12 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen, ja niiden painon on oltava ≥ 300 mg (naaraat) ja ≥ 250 mg (koiraat).

TESTISUUNNITELMA

Testipitoisuudet

22. Testissä on suositeltavaa käyttää viittä kemikaalipitoisuutta ja kontrollia (kontrolleja). Testipitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon kaikki tiedonlähteet, kuten kvantitatiiviset rakenne-aktiivisuussuhteet (QSAR-mallit), vertailutiedot analogeista, tulokset esimerkiksi kalatesteistä akuutti myrkyllisyys kalalle (tämän liitteen luku C.1), kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus (tämän liitteen luku C.48) tai muut testimenetelmät esimerkiksi tämän liitteen luvuissa C.15, C.37, C.41, C.47 tai C.49 (21) (22) (23) (24) (25) (26), mikäli ne ovat saatavilla, tai tarvittaessa tulokset annoksenmääritystestissä, joka sisältää mahdollisesti myös lisääntymisvaiheen. Tarvittaessa voidaan tehdä annoksenmääritystesti samanlaisissa olosuhteissa kuin lopullinen testi (veden laatu, testijärjestelmä, eläinten lukumäärä). Jos liuottimen käyttö on tarpeen ja jos aikaisempia tietoja ei ole saatavilla, annoksenmääritystesti voidaan tehdä liuottimen sopivuuden selvittämiseksi. Suurin testipitoisuus ei saa ylittää 96h-LC50:een liittyvää vesiliukoisuutta 10 mg/l tai 1/10 (27). Pienimmän pitoisuuden on oltava 10–100 kertaa pienempi kuin

▼M8

suurimman pitoisuuden. Viiden pitoisuuden käyttäminen tässä testissä mahdollistaa annos-vastesuhteiden mittaamisen mutta myös LOEC- ja NOEC-arvojen määrittämisen; niitä tarvitaan tietyissä sääntelyohjelmissa tai tietyillä lainkäyttöalueilla riskinarviointiin. Yleensä testikemikaalin nimellispitoisuuksien välinen porrastuskerroin vierekkäisten käsittelytasojen välillä on ≤ 3,2.

Rinnakkaisnäytteet käsittelyryhmissä ja kontrolleissa

23. Yhtä testipitoisuutta kohti on käytettävä vähintään kuusi rinnakkaistestauskammiota (ks. lisäys 7). Lisääntymisvaiheen aikana (F0-sukupolvea lukuun ottamatta) rinnakkaisnäyterakenne kaksinkertaistetaan fekunditeetin arviointia varten, ja jokaisessa rinnakkaisnäytteessä on vain yksi lisääntyvä pari (ks. 42 kohta).

24. Testipitoisuuksien lisäksi on tehtävä laimennusvesikontrolli ja tarvittaessa liuotinkontrolli. Kontrolleissa on käytettävä kaksinkertaista määrää rinnakkaisnäytekammioita, jotta varmistetaan riittävä tilastollinen voima (ts. kontrolleissa on oltava vähintään 12 rinnakkaisnäytettä). Lisääntymisvaiheessa kontrollien rinnakkaisnäytteiden määrä kaksinkertaistetaan (ts. vähintään 24 rinnakkaisnäytettä, ja jokaisessa rinnakkaisnäytteessä on vain yksi kuteva pari). Lisääntymisen jälkeen kontrollirinnakkaisnäytteissä saa olla enintään 20 alkiota (kalaa).

MENETTELY

Testin aloittaminen

25. Ne lisääntymisaktiiviset aikuiset kalat, joita käytetään testin F0-sukupolven luomisessa, valitaan kahdella kriteerillä, jotka ovat ikä (yleensä yli 12 viikkoa mutta ei mielellään yli 16:ta viikkoa hedelmöittymisen jälkeen) ja paino (pitää olla naarailla ≥ 300 mg ja koirailla ≥ 250 mg).

26. Nämä spesifikaatiot täyttävät naaras-koirasparit siirretään yksittäisinä pareina kuhunkin rinnakkaisnäytteenä toimivaan säiliöön. Testin alkaessa kontrolleissa on oltava 12 rinnakkaisnäytettä ja kemikaalikäsittelyissä kuusi. Nämä säiliöt jaetaan satunnaisesti käsittelyyn (ts. T1–T5 ja kontrolli) ja rinnakkaisnäytteisiin (ts. kontrollit A–L ja altistukset A–F), ja ne liitetään altistusjärjestelmään, jossa on asianmukainen virtaus jokaiseen säiliöön.

Altistumisolosuhteet

27. Perusteellinen yhteenveto testiparametreista ja -olosuhteista on lisäyksessä 3. Kun näitä spesifikaatioita noudatetaan, kontrollikalojen osalta päätetapahtumien arvojen tulisi olla lisäyksessä 4 lueteltujen mukaiset.

28. Testin aikana on mitattava liuennut happi, pH ja lämpötila vähintään yhdestä testiastiasta jokaisessa käsittelyryhmässä ja kontrollissa. Lämpötilaa lukuun ottamatta nämä mittaukset on tehtävä vähintään kerran viikossa altistusjakson ajan. Keskimääräinen veden lämpötila on oltava 24–26 °C testin ajan ja koko tutkimuksen keston ajan. Altistusjaksolla lämpötila on mitattava joka päivä. Veden pH:n on oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin ± 0,5 pH-yksikköä. Käsittelyn rinnakkaisnäytteet eivät saa erota toisistaan tilastollisesti, kuten eivät myöskään testin käsittelyryhmät (päivittäisten lämpötilamittausten perusteella ja hetkellisiä poikkeamia huomioon ottamatta).

▼M8

Altistusaika

29. Testissä altistetaan sukukypsät kalat F0-sukupolvesta kolmen viikon ajaksi. Viikolla 4, suurin piirtein testipäivänä 24, luodaan sukupolvi F1 ja F0-sukupolven lisääntymisparit lopetetaan humaanisti ja niiden paino ja pituus merkitään muistiin (ks. 34 kohta). Tämän jälkeen F1-sukupolvi altistetaan vielä 14 viikon ajaksi (F1-sukupolven altistusaika on siis yhteensä 15 viikkoa) ja F2-sukupolvi kahdeksi viikoksi kuoriutumiseen saakka. Testin kokonaiskesto on yleensä 19 viikkoa (ts. F2-sukupolven kuoriutumiseen saakka). Testin aikajanat ovat taulukossa 2, ja niitä on selostettu tarkemmin lisäyksessä 9.

Ruokinta

30. Kaloja voidaan ruokkia suolalehtijalkaisilla (*Artemia* spp.) (24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla) *ad libitum*, ja lisäksi niille voidaan antaa kaupallisesti saatavilla olevaa hiutaleruokaa tarvittaessa. Kaupallisesti saatava hiutaleruoka on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta (esimerkiksi orgaanisia klooriyhdisteitä sisältävät torjunta-aineet, polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH-yhdisteet), polyklorinoidut bifenyylit (PCB-yhdisteet)). Sellaista ruokaa, joka sisältää tavallista enemmän endokriinisesti aktiivisia aineita (kuten fytoestrogeeneja), on vältettävä, koska ne voivat vaarantaa testin vasteen. Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet on poistettava testiastioista tarvittaessa; kunkin säiliön pohja on puhdistettava huolellisesti esimerkiksi käyttämällä lappoa. Myös kunkin säiliön seinät ja pohja on puhdistettava kerran tai kahdesti viikossa (esimerkiksi lastalla pyyhkimällä). Lisäyksessä 5 on esimerkki ruokinta-aikataulusta. Ruokintatiheys määräytyy sen mukaan, montako kalaa kussakin rinnakkaisnäytteessä on. Näin ollen ruokintatiheyttä harvennetaan, jos rinnakkaisnäytteestä kuolee kaloja.

Analyyttiset määritykset ja mittaukset

31. Ennen altistusjakson aloittamista on varmistettava, että kemikaalin annostelujärjestelmä toimii asianmukaisesti. Kaikki analyysimenetelmät on määritettävä, ja kemikaalin stabiiliudesta testijärjestelmässä on oltava riittävästi tietoa. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin, mieluiten vähintään joka viikko jokaisen käsittelyryhmän yhdestä rinnakkaisnäytteestä siten, että saman käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteissä vuorotellaan joka viikko.

32. Lisäksi testin aikana on seurattava laimennus- ja varastoliuoksen virtausnopeutta sopivin väliajoin (kuitenkin vähintään kolme kertaa viikossa). Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testikemikaalin pitoisuus liuoksessa on kuitenkin hyväksyttävästi ±20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia. Jos kemikaalit ovat sellaisia, että ne kertyvät kaloihin selvästi, testipitoisuuksia voidaan pienentää kalojen kasvaessa. Tällöin on myös suositeltavaa mukauttaa testiliuoksen vaihtumisnopeutta jokaisessa kammiossa, jotta testipitoisuudet pysyvät mahdollisimman vakaina.

Havainnot ja mitattavat päätetapahtumat

33. Mitattavia päätetapahtumia ovat fekunditeetti, hedelmällisyys, kuoriutuminen, kasvu ja eloonjääneisyys, ja niiden avulla arvioidaan mahdollisia populaatiotason vaikutuksia. Myös käyttäytymistä tulee havainnoida päivittäin, ja poikkeava käyttäytyminen on merkittävä muistiin. Muita mekanistisia päätetapahtumia ovat maksan vitellogeniinin mRNA:n tai vitellogeniiniproteiinin arvot, jotka mitataan immunomäärityksellä (28), fenotyyppisen sukupuolen tunnusmerkit, kuten koiraille tunnusomaiset peräevän papillit, sukurauhasten histologinen arviointi sekä munuaisten, maksan ja sukurauhasten histopatologinen arviointi (ks. päätetapahtumaluettelo taulukosta 1). Kaikki nämä päätetapahtumat arvioidaan kalayksilön geneettisen sukupuolen määrittämisen valossa sen perusteella, onko kalalla medakan koirassukupuolen määrittävä

▼M8

geeni *dmy* vai ei (ks. 41 kohta). Myös kutemisaika arvioidaan. Lisäksi voidaan johtaa yksinkertaiset fenotyyppisen sukupuolen osuudet peräeväpapillien määrää koskevien tietojen perusteella: näin yksittäinen medaka voidaan määrittää fenotyypiltään joko koiraaksi tai naaraaksi. Tällä testimenetelmällä ei havaita vähäisiä poikkeamia odotuksenmukaisesta sukupuolten suhteesta: kalojen määrä rinnakkaisnäytteissä on melko pieni, eikä siitä saada riittävästi tilastollista voimaa. Histopatologisen arvioinnin aikana tutkitaan myös sukurauhaset ja tehdään tavallista paljon todistusvoimaisempia analyyseja sukurauhasten fenotyypin arviointia varten geneettisen sukupuolen valossa.

34. Tämän testimenetelmän ensisijainen tarkoitus on arvioida, onko testikemikaalilla mahdollisia populaation kannalta merkityksellisiä vaikutuksia. Mekanistisista päätetapahtumista (VTG, sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja tietyt sukurauhasiin kohdistuvat histopatologiset vaikutukset) voi olla apua sen määrittämisessä, välittyykö jokin vaikutus mahdollisesti hormonitoiminnan kautta. Systeemiset ja muunlaiset toksisuudet voivat kuitenkin vaikuttaa mekanistisiin päätetapahtumiin. Siksi maksan ja munuaisten histopatologiaa voidaan arvioida tavallista tarkemmin, jotta mekanistisiin päätetapahtumiin liittyviä vasteita ymmärrettäisiin paremmin. Jos näitä tarkkoja arviointeja ei tehdä, histopatologisen tutkimuksen aikana sattumalta havaitut selvät poikkeavuudet on kuitenkin merkittävä muistiin ja raportoitava.

Kalojen humaani lopettaminen

35. Kun F0- ja F1-sukupolvien altistus on päättynyt ja kun poikasista on otettu näytteet, kalat on lopetettava riittävällä määrällä nukutusliuosta (esimerkiksi trikaiinimetaanisulfonaatilla (MS-222, CAS-nro 886-86-2), 100–500 mg/l), joka on puskuroitu $NaHCO_3$:lla (300 mg/l) (natriumbikarbonaatti, CAS-nro 144-55-8) limakalvoärsytyksen vähentämiseksi. Jos kaloissa on merkkejä huomattavasta kärsimyksestä (hyvin vakavasta ja kuolemaa selvästi ennakoivasta) ja jos ne ovat kuolemaisillaan, ne on nukutettava ja lopetettava. Aineiston analyysissa niitä on käsiteltävänä kuolemantapauksina. Jos kala lopetetaan sairauden vuoksi, se on merkittävä muistiin ja raportoitava. Sen mukaan, missä vaiheessa tutkimusta kala lopetetaan, se voidaan säilyttää histopatologista analyysia varten (jolloin se käsitellään kiinnitysaineella mahdollista histopatologista tutkimusta varten).

Mätimunien ja kalanpoikasten käsittely

Mätimunien kerääminen lisääntyviltä pareilta seuraavan sukupolven luomista varten

36. Munat kerätään testiviikon 4 ensimmäisenä päivänä (tai tarvittaessa kahtena ensimmäisenä päivänä), jolloin F0-sukupolvi vaihtuu F1-sukupolveksi, ja testiviikon 18 ensimmäisenä päivänä, jolloin F1-sukupolvi vaihtuu F2-sukupolveksi. Testiviikko 18 vastaa F1-sukupolvella aikuista kalaa, jonka ikä on 15 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen. On tärkeää, että kaikki munat poistetaan kaikista säiliöistä päivää ennen kuin munat kerätään, jotta varmistetaan, että kaikki lisääntyvältä parilta kerättävät munat ovat peräisin yhdestä kudusta. Kutemisen jälkeen naarasmedaka kantaa muniaan joskus sukupuoliaukon lähellä, kunnes se voi laskea munat substraattiin. Jos säiliössä ei ole substraattia, munat ovat joko naaraaseen kiinnittyneinä tai säiliön pohjalla. Munien sijainnin mukaan ne joko irrotetaan naaraasta varovasti tai kerätään säiliön pohjalta lapolla F0-sukupolven osalta testiviikolla 4 ja F1-sukupolven osalta testiviikolla 18. Kaikki käsittelysäiliöistä kerätyt munat yhdistetään, ennen kuin ne jaetaan inkubaatiokammioihin.

▼M8

37. Mätimunia yhdistävät rihmat on poistettava. Jokaiselta lisääntyvältä parilta (1 pari rinnakkaisnäytettä kohti) kerätään hedelmöittyneitä munia (enintään 20), jotka yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti sopiviin inkubaatiokammioihin (lisäys 6, 7). Laadukkaalla dissektiomikroskoopilla voidaan nähdä merkkejä varhaisesta hedelmöittymisestä/kehityksestä. Niitä ovat esimerkiksi korionin muodostuminen, meneillään oleva solun jakautuminen tai rakkulan muodostuminen. Inkubaatiokammiot voidaan laittaa kullekin käsittelylle tarkoitettuihin erillisiin inkubaattoriakvaarioihin (jolloin veden laadun parametrit ja testikemikaalien pitoisuudet on mitattava niissä) tai rinnakkaisakvaarioon, jossa säilytetään kuoriutuneita kalanpoikasia (ns. vapaasti liikkuvia alkioita). Jos tarvitaan toinen keräyspäivä (testipäivä 23), kaikki mätimunat kummaltakin päivältä on yhdistettävä ja jaettava sen jälkeen järjestelmällisesti kuhunkin käsittelyrinnakkaisnäytteeseen.

Mätimunien kasvatus kuoriutumiseen saakka

38. Hedelmöittyneitä munia ravistellaan munainkubaattorissa koko ajan esimerkiksi ilmakuplilla tai keinuttamalla inkubaattoria pystysuunnassa. Kuolleet hedelmöittyneet munat (alkiot) tarkistetaan ja kirjataan päivittäin. Kuolleet munat poistetaan inkubaattoreista (lisäys 9). Ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään seitsemäntenä päivänä hedelmöittymisen jälkeen, jotta hedelmöittyneet munat pääsevät laskeutumaan inkubaattorin pohjalle. Tämä edistää kuoriutumista, joka tapahtuu yleensä parin seuraavan päivän aikana. Jokaisesta käsittely- ja kontrollisäiliöstä lasketaan kuoriutuneet (nuoret kalanpoikaset; vapaasti liikkuvat alkiot) (yhdistetyt rinnakkaisnäytteet). Hedelmöittyneet munat, jotka eivät ole kuoriutuneet, kun kontrollin kuoriutumisen mediaanipäivästä on kulunut kaksi kertaa niin pitkä aika (yleensä 16 tai 18 päivää hedelmöittymisen jälkeen), katsotaan elinkyvyttömiksi ja hävitetään.

39. Jokaiseen rinnakkaisnäytesäiliöön siirretään 12 kalanpoikasta. Inkubaatiokammioiden kalanpoikaset yhdistetään ja jaetaan järjestelmällisesti rinnakkaisnäytesäiliöihin (lisäys 7). Tämä voidaan tehdä valitsemalla käsittelyryhmästä kalanpoikanen satunnaisesti ja lisäämällä sen jälkeen rinnakkaisakvaarioon kalanpoikanen sattumanvaraisesti. Jokaisessa säiliössä on oltava yhtä monta (n=12) kuoriutunutta kalanpoikasta (enintään 20 poikasta / säiliö). Jos kalanpoikasia ei ole tarpeeksi täyttämään kaikki käsittelyrinnakkaisnäytteet, kalanpoikaset kannattaa jakaa niin, että mahdollisimman monessa näytteessä on 12 poikasta. Kalanpoikasia voidaan käsitellä turvallisesti isoilla lasipipeteillä. Mahdolliset ylimääräiset kalanpoikaset lopetetaan humaanisti nukutusaineella. Lisääntyvien parien muodostamista edeltävän muutaman viikon aikana päivä, jona ensimmäinen kututapahtuma huomataan kussakin rinnakkaisnäytteessä, on merkittävä muistiin.

Lisääntyvien parien lajitteleminen

Evien leikkaaminen ja genotyyppisen sukupuolen määrittäminen

40. Genotyyppinen sukupuoli määritetään eväleikkeistä viikolla 9–10 hedelmöittymisen jälkeen (ts. F1-sukupolven osalta testiviikoilla 12–13). Kaikki säiliössä olevat kalat nukutetaan (käyttämällä hyväksyttyjä menetelmiä, kuten IACUCia), ja jokaiselta kalalta otetaan pyrstöevän selän- tai vatsanpuoleisesta kärjestä pieni kudosnäyte kyseisen yksilön genotyyppisen sukupuolen määrittämistä varten (29). Rinnakkaisnäytteen kalat voidaan laittaa pieniin häkkeihin (jos mahdollista, yksi kala yhteen häkkiin) rinnakkaisnäytesäiliöön. Kuhunkin häkkiin voidaan laittaa myös kaksi kalaa, jos ne ovat selvästi erotettavissa toisistaan. Yksi keino siihen on leikata pyrstöevä (ts. selän- tai vatsanpuoleinen kärki) eri tavalla kudosnäytettä otettaessa.

▼M8

41. Medakan genotyyppinen sukupuoli määritetään tunnistetun ja sekvensoidun, Y-kromosomissa sijaitsevan geenin (*dmy*) perusteella. Jos kalalla on *dmy*-geeni, kyseessä on XY-yksilö, fenotyypistä riippumatta, ja jos *dmy*-geeniä ei ole, kyseessä on XX-yksilö, fenotyypistä riippumatta (30); (31). Jokaisesta eväleikkeestä uutetaan deoksiribonukleiinihappo (DNA), ja dmy-geenin olemassaolo tai sen puuttuminen voidaan määrittää polymeraasiketjureaktiomenetelmillä (PCR) (ks. tämän liitteen C.41 luvussa oleva lisäys 9 tai lisäykset 3 ja 4 lähdeviitteessä (29)).

Lisääntyvien parien muodostaminen

42. Genotyyppistä sukupuolta koskevia tietoja käytetään lisääntyvien XX-XY-parien muodostamiseen riippumatta niiden ulkoisesta fenotyypistä, jota testikemikaalille altistuminen voi muuttaa. Sinä päivänä, jona kunkin kalan genotyyppinen sukupuoli määritetään, jokaisesta rinnakkaisnäytteestä valitaan kaksi XX-kalaa ja kaksi XY-kalaa satunnaisesti, ja niistä muodostetaan kaksi lisääntyvää XX-XY-paria. Jos rinnakkaisnäytteessä ei ole kahta XX-kalaa tai kahta XY-kalaa, tarvittava kala on otettava muista kemikaalikäsittelyn rinnakkaisnäytteistä. Tärkeintä on, että kaikissa käsittelynäytteissä ja kontrolleissa on suositeltu määrä (12 kpl) lisääntyviä pareja (24). Kaloja, joilla on selviä poikkeavuuksia (uimarakkoon liittyviä ongelmia, epämuodostunut selkäranka, suuria koonvaihteluita jne.), ei tule valita lisääntyviin pareihin. F1-sukupolven lisääntymisvaiheessa kussakin rinnakkaissäiliössä tulee olla vain yksi lisääntyvä pari.

Poikasvaiheen näytteenotto ja päätetapahtumien arviointi

Näytteenotto kaloilta, joita ei käytetä lisääntyvissä pareissa

43. Kun lisääntyvät parit on lajiteltu, kalat, joita ei käytetä lisääntymiseen, lopetetaan humaanisti, ja niiltä mitataan poikasvaiheen päätetapahtumat testiviikoilla 12–13 (F1). On hyvin tärkeää, että kaloja käsitellään siten, että lisääntyvien parien valinnassa määritetty kunkin kalayksilön genotyyppinen sukupuoli voidaan aina jäljittää. Kaikki kerättävät tiedot analysoidaan tietyn kalan genotyyppisen sukupuolen perusteella. Jokaiselta kalalta mitataan useita päätetapahtumia: kalanpoikasten eloonjäämisen määritys (testiviikot 7–12/13 (F1)), pituuskasvu (vakiopituusvoidaan mitata, jos pyrstöevää on lyhennetty geneettisen sukupuolen analysointiin liittyvässä näytteenotossa). Kokonaispituus voidaan mitata, jos pyrstöevästä on otettu *dmy*-geenin määrittämistä varten näytteeksi vain osa selkä- tai vatsapuolelta. Lisäksi punnitaan paino (märkäpaino ja taputtelemalla kuivatun kalan paino) ja määritetään maksan *vtg*:n mRNA (tai VTG) ja peräevän papillit (ks. taulukot 1 ja 2). Lisääntyvien parien paino- ja pituustietoja tarvitaan myös käsittelyryhmän keskimääräisen kasvun laskemisessa.

Kudosnäytteet ja vitellogeniinin mittaus

44. Maksa dissekoidaan, ja se on säilytettävä ≤ –70 °C:ssa *vtg* mRNA- (tai VTG) -mittauksiin saakka. Kalan pyrstö, myös peräevä, säilötään asianmukaiseen kiinnitysaineeseen (esim. Davidsonin kiinnitysaine) tai valokuvataan siten, että peräevän papillit voidaan laskea myöhemmin. Haluttaessa näytteitä voidaan ottaa myös muista kudoksista (esim. sukurauhasista) ja säilöä samalla. Maksan VTG-pitoisuus on kvantifioitava homologisella ELISA-tekniikalla (ks. medakan osalta suositellut menettelyt tämän liitteen C.48 luvun lisäyksestä 6). Vaihtoehtoisesti vtg:n mRNA:n kvantifioinnissa (ts. *vtg 1* -geenin mRNA:n uuttaminen maksanäytteestä ja sen kopioiden lukumäärän laskeminen (yksikössä ng kokonais-mRNA:sta) kvantitatiivisella

▼M8

PCR:llä) voidaan käyttää Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston EPA:n kehittämiä menetelmiä (29). Siihen nähden, että määritetään *vtg*-geenin kopioiden lukumäärä kontrolli- ja käsittelyryhmistä, vähemmän resursseja vievä ja teknisesti helpompi menetelmä on määrittää vtg I:n suhteellinen muutos (kerroin) kontrolli- ja käsittelyryhmissä.

Sekundaariset sukupuoliominaisuudet

45. Normaaleissa olosuhteissa vain sukukypsillä koirasmedakoilla on papilleja, jotka kehittyvät peräevän tiettyjen ruotojen liitoslevyihin sekundaarisina sukupuoliominaisuuksina, ja ne ovat mahdollinen biomarkkeri hormonaalisille haittavaikutuksille. Peräeväpapillien (papillien lukumäärä liitoslevyineen) laskentamenetelmä esitetään lisäyksessä 8. Peräeväpapillien lukumäärää käytetään myös luokiteltaessa kyseinen yksilö ulkoisesti fenotyyppiseksi koiraaksi tai naaraaksi, kun lasketaan yksinkertainen sukupuolten välinen suhde yhtä rinnakkaisnäytettä kohti. Medaka, jolla on yksikin papilli (enemmän kuin 0), määritetään koiraaksi, kun taas medaka, jolla ei ole yhtään (0) peräeväpapillia, määritetään naaraaksi.

Fekunditeetin ja hedelmällisyyden arviointi

46. Fekunditeettia ja hedelmällisyyttä arvioidaan F0-sukupolven osalta testiviikoilla 1–3 ja F1-sukupolven osalta testiviikoilla 15–17. Kultakin lisääntyvältä parilta kerätään munat 21 peräkkäisenä päivänä. Munat otetaan haavissa olevilta naarailta varovasti ja/tai lapolla akvaarion pohjalta joka aamu. Tiedot jokaisen rinnakkaisnäytteen lisääntyvän parin fekunditeetista ja hedelmällisyydestä kirjataan päivittäin. Fekunditeetti määritellään kutuvaiheessa laskettujen mätimunien määräksi, ja hedelmällisyys määritellään toiminnallisesti hedelmöittyneiden ja elinkykyisten munien määräksi laskentahetkellä. Määrät on laskettava mahdollisimman pian munien keräämisen jälkeen.

47. Rinnakkaisnäytteen fekunditeetti kirjataan päivittäin yhden lisääntyvän parin munien määränä, ja se analysoidaan suositelluilla tilastomenetelmillä rinnakkaisnäytteiden keskiarvoja käyttäen. Rinnakkaisnäytteen hedelmällisyys on lisääntyvän parin tuottamien hedelmöittyneiden munien määrän summa jaettuna kyseisen parin tuottaminen munien määrän summalla. Tilastollisesti hedelmällisyys analysoidaan rinnakkaisnäytteiden välisenä suhteena. Rinnakkaisnäytteiden kuoriutuvuus on kalanpoikasten lukumäärä jaettuna testiin otettujen alkioiden lukumäärällä (yleensä 20). Tilastollisesti kuoriutuvuutta analysoidaan rinnakkaisnäytteiden välisenä suhteena.

Näytteenotto täysikasvuisilta kaloilta ja päätetapahtumien arviointi

Näytteenotto lisääntyvien parien kaloilta

48. Testiviikon 17 jälkeen (kun F2-sukupolvi on saatu luotua onnistuneesti) F1-sukupolven täysikasvuiset kalat lopetetaan humaanisti, ja niiltä mitataan eri päätetapahtumat (ks. taulukot 1 ja 2). Peräevä kuvataan peräeväpapillien arviointia varten (ks. lisäys 8), ja/tai pyrstö poistetaan heti sukupuoliaukon takaa ja kiinnitetään kiinnitysaineella, jotta papillit voidaan laskea myöhemmin. Pyrstöevästä voidaan ottaa osa näytteeksi ja laittaa se talteen geneettisen sukupuolen (*dmy*) vahvistamista varten, jos se on tarpeen. Tarvittaessa voidaan ottaa kudosnäyte *dmy*-analyysin toistamista varten tietyn kalan geneettisen sukupuolen vahvistamiseksi. Kalan ruumiin ontelo avataan, jotta asianmukaiset kiinnitysaineet (esim. Davidsonin aine) pääsevät tunkeutumaan kudoksiin, ennen kuin koko kala upotetaan kiinnitysaineeseen. Jos ennen kiinnittämistä tehdään asianmukainen permeabilisointivaihe, ruumiin onteloa ei tarvitse avata.

▼**M8**

Histopatologia

49. Jokaisesta kalasta tutkitaan histologisesti sukurauhaskudoksen patologia (30); (29). Kuten 33 kohdassa on todettu, systeemiset tai muunlaiset toksisuudet voivat vaikuttaa muihin tässä testissä arvioitaviin mekanistisiin päätetapahtumiin (ts. VTG, sekundaariset sukupuoliominaisuudet ja tietyt sukurauhasten histopatologiset vaikutukset). Siksi maksan ja munuaisten histopatologiaa voidaan arvioida tavallista tarkemmin, jotta mekanistisiin päätetapahtumiin liittyviä vasteita ymmärrettäisiin paremmin. Jos näitä tarkkoja arviointeja ei tehdä, histopatologisen tutkimuksen aikana sattumalta havaitut selvät poikkeavuudet on kuitenkin merkittävä muistiin ja raportoitava. Suurimman pitoisuuden käsittelyryhmän (kontrolliin verrattuna) ja sen ryhmän välinen vertailu, jossa vaikutuksia ei havaittu, voidaan tehdä, mutta sen osalta suositellaan tutustumaan histopatologisia tutkimuksia koskeviin ohjeisiin (29). Yleensä kaikki näytteet käsitellään/valmistellaan ensin, minkä jälkeen patologi tutkii ne. Jos käytetään vertailuun perustuvaa lähestymistapaa, on muistettava, että Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) -menettelyssä oletetaan, että kun annoksen suuruus kasvaa, myös biologinen vaikutus (patologia) voimistuu. Testin selitysvoima siis heikkenee, jos siinä tarkastellaan vain yhtä suurta annosta eikä ollenkaan keskisuuria annoksia. Jos tilastoanalyysia ei tarvita sen määrittämiseksi, ettei suurella annoksella ole vaikutusta, tämä lähestymistapa voi olla hyväksyttävä. Sukurauhasten fenotyyppi johdetaan myös tämän arvioinnin perusteella.

Muut havainnot

50. Tästä tutkimuksesta saadaan tietoja, joita voidaan käyttää (esimerkiksi näyttöön perustuvassa lähestymistavassa) vähintään näiden kahden, lisääntymiskyvyn heikentymiseen johtavan yleisen haittavaikutusreitin samanaikaisessa arvioinnissa: a) hormonivälitteiset reitit, joihin liittyy hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakselin häiriintyminen, ja b) reitit, jotka lyhentävät elinaikaa ja vähentävät kasvua (pituus ja paino). Lisäksi voidaan arvioida muun kuin hormonivälitteisen toksisuuden vaikutuksia lisääntymiseen. Tähän testiin sisältyy myös päätetapahtumia, joita yleensä arvioidaan pitkäaikaisissa toksisuustesteissä (täyden elinkaaren testi ja varhaisen elinvaiheen testi), ja niiden avulla voidaan arvioida vaaroja, joita aiheuttavat sekä muut kuin hormonivälitteiset toksiset vaikutustavat että hormonivälitteisen toksisuuden reitit. Testin aikana myös käyttäytymistä tulee havainnoida päivittäin, ja poikkeava käyttäytyminen on merkittävä muistiin. Lisäksi on kirjattava kaikki kuolleet ja eloonjääneet kalat niiden karsintaan saakka (testiviikko 6/7), elossa olevat kalat karsinnan jälkeen poikasvaiheen näytteenottoon saakka (hedelmöittymisen jälkeinen viikko 9–10) ja elossa olevat kalat kutemisesta täysikasvuisten kalojen näytteenottoon saakka on laskettava.

Taulukko 1

Yhteenveto MEOGRT-testin päätetapahtumista (*)

Elinkaaren vaihe	Päätetapahtuma	Sukupolvi
Alkio (hjv 2)	Kuoriutuminen (% ja kuoriutumisaika)	F1, F2
Juveniili (hjv 4)	Eloonjääneisyys	F1
Poikanen (hjv 9 tai 10)	Eloonjääneisyys	F1
	Kasvu (pituus ja paino)	

▼**M8**

Elinkaaren vaihe	Päätetapahtuma	Sukupolvi
	Vitellogeniini (mRNA tai proteiini)	
	Sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit)	
	Ulkoisen sukupuolen suhde	
	Aika ensimmäiseen kutuun	
Aikuinen (hjv 12–14)	Lisääntyminen (fekunditeetti ja hedelmällisyys)	F0, F1
Aikuinen (hjv 15)	Eloonjääneisyys	F1
	Kasvu (pituus ja paino)	
	Sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit)	
	Histopatologia (sukurauhaset, maksa, munuaiset)	

(*) Nämä päätetapahtumat on analysoitavat tilastollisesti.

AIKAJANA

51. Taulukossa 2 on MEORGT-testin aikajana. MEOGRT-testissä F0-sukupolven aikuisten altistus kestää neljä viikkoa. F1-sukupolven altistus kestää 15 viikkoa, ja F2-sukupolven altistusaika kestää kuoriutumiseen saakka (hjv 2). Lisäyksessä 9 on yhteenveto MEORGT-testin aikana tehtävistä toimista.

Taulukko 2

MEORGT-testin altistusajat ja päätetapahtumien mittaamisen aikajana

MEORGT-testin altistusajat ja päätetapahtumien aikajana

F0	1	2	3	4																
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
F2																		1	2	
Testiviikko	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Elinkaaren tunniste					**Alkio**					**Ruskuaispussipoikaset**					**Juveniili**			**Poikanen**		**Aikuinen**
Päätetapahtumat																				
Fekunditeetti	F_0														F_1					
Hedelmällisyys	F_0														F_1					
Kuoriutuminen					F_1														F_2	
Eloonjääneisyys						F_1						F_1						F_1		
Kasvu				F_0								F_1						F_1		
Vitellogeniini												F_1								
Sekundaarinen sukupuoli												F_1						F_1		
Histopatologia																		F_1		
Testiviikko	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	

- Testissä on 7 rinnakkaisnäyteryhmää
  - 5 ryhmää testikemikaalikäsittelyille
  - 2 ryhmää kontrollikäsittelyille (4, jos käytetään liuotinta)
- Ryhmän rakenne
  - 12 rinnakkaisnäytettä lisääntymisen, aikuisten patologian ja SSO:n tutkimiseen (vkt 10–18)
  - 6 rinnakkaisnäytettä kuoriutumisen, eloonjäämisen, vtg:n ja poikasten SSO:n ja kasvun tutkimiseen (vkt 1–9)

SSO: sekundaariset sukupuoliominaisuudet; vkt: viikot; vtg: vitellogeniini

▼M8

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tilastoanalyysi

52. Koska genotyyppinen sukupuoli määritetään kaikilta testikaloilta, tiedot on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen (ts. XY: koiraat ja XX: naaraat). Jos näin ei tehdä, kaikkien analyysien tilastollinen voima heikkenee tuntuvasti. Aineiston tilastollisissa analyyseissa on noudatettava mieluiten menettelyjä, jotka on kuvattu OECD:n julkaisussa Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (32). Lisäyksessä 10 on muita ohjeita tilastollisista analyyseista.

53. Testin rakenteen ja tilastollisten testien valinnan tulisi mahdollistaa riittävä voima, jotta havaitaan biologisesti tärkeät muutokset sellaisissa päätetapahtumissa, joista on ilmoitettava NOEC-arvo (32). Se, miten oleelliset vaikuttavat pitoisuudet ja parametrit pitää ilmoittaa, voi vaihdella sovellettavan lainsäädännön mukaan. Jokaisesta päätetapahtumasta on määritettävä prosentuaalinen muutos, joka on tärkeää havaita tai arvioida. Koesuunnitelma on mukautettava siten, että se on mahdollista. Ei ole todennäköistä, että sama prosentuaalinen muutos koskisi kaikkia päätetapahtumia. Ei ole myöskään todennäköistä, että voitaisiin suunnitella toteutuskelpoinen testi, joka täyttäisi nämä kriteerit kaikkien päätetapahtumien osalta, joten on tärkeää keskittyä niihin päätetapahtumiin, jotka ovat kussakin kokeessa tärkeitä, jotta se voidaan suunnitella asianmukaisesti. Lisäyksessä 10 on malli tilastollisesta vuokaaviosta ja ohjeet, jotka on tarkoitettu avuksi aineiston käsittelyyn ja sopivimman tilastollisen testin tai mallin valintaan. Muitakin tilastomenetelmiä saa käyttää, jos ne ovat tieteellisesti perusteltavissa.

54. Variaatiot on analysoitava kussakin rinnakkaisnäytesarjassa varianssianalyysillä tai kontingenssitaulukkomenetelmillä, ja analyysiin perustuvia riittävän asianmukaisia tilastollisia analyysimenetelmiä on käytettävä. Jotta voidaan tehdä useita vertailuja yksittäisten pitoisuuksien ja kontrollien tulosten välillä, jatkuvien vasteiden osalta on suositeltavaa käyttää askeltavaa menetelmää (esimerkiksi Jonckheere-Terpstran testiä). Jos tiedot eivät ole yhdenmukaiset monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa, tulee käyttää Dunnettin testiä tai Dunnin testiä (tarvittaessa tietojen asianmukaisen muuntamisen jälkeen).

55. Fekunditeetin osalta mätimunien määrä lasketaan päivittäin, mutta ne voidaan analysoida kokonaismäärinä tai toistuvana mittauksena. Lisäyksessä 10 on tarkempia tietoja siitä, miten tämä päätetapahtuma analysoidaan. Sellaisia histopatologisia tietoja varten, jotka esitetään vakavuuspisteinä, on kehitetty uusi tilastollinen testi, Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (33).

56. Kaikki kemikaalikäsittelyissä havaitut päätetapahtumat, jotka poikkeavat asianmukaisista kontrolleista huomattavasti, on ilmoitettava.

Tietojen analysointiin liittyviä näkökohtia

Vaarantuneiden käsittelytasojen käyttö

57. Useita tekijöitä otetaan huomioon, kun määritetään, esiintyykö rinnakkaisnäytteessä tai koko käsittelyssä selvää toksisuutta, jolloin ne tulisi poistaa analyysista. Selväksi toksisuudeksi määritellään > 4 kuolemantapausta missä tahansa näytteessä kolmannen ja yhdeksännen hjv:n välillä, kun niitä ei voida selittää teknisellä virheellä. Muita selvän toksisuuden merkkejä ovat verenvuoto, epänormaali käyttäytyminen, epänormaalit uintikuviot, ruokahaluttomuus ja muut sairaudesta kertovat kliiniset merkit. Subletaalin toksisuuden merkkien osalta

▼M8

laadulliset arvioinnit voivat olla tarpeen, ja niissä on otettava aina huomioon laimennusveden kontrolliryhmä (pelkkä puhdas vesi). Jos suurimman pitoisuuden käsittelyssä (käsittelyissä) esiintyy selvää toksisuutta, on suositeltavaa jättää nämä käsittelyt pois analyysista.

Liuotinkontrollit

58. Liuottimen käyttöä on harkittava vasta viimesijaisena keinona, kun kaikki muut kemikaalin annosteluvaihtoehdot on kokeiltu. Jos liuotinta käytetään, sen kanssa on käytettävä laimennusvesikontrollia. Testin lopuksi on arvioitava liuottimen mahdolliset vaikutukset. Tämä tehdään vertailemalla liuotinkontrolliryhmää ja laimennusvesikontrolliryhmää tilastollisesti. Tärkeimmät tässä analyysissa huomioon otettavat päätetapahtumat ovat kasvuparametrit (paino), koska yleistyneet toksisuusvaikutukset saattavat vaikuttaa niihin. Jos laimennusvesikontrollin ja liuotinkontrollin ryhmien välillä havaitaan tilastollisesti merkitseviä eroja näissä päätetapahtumissa, sen määrittämisessä, onko testin validiteetti vaarantunut, on käytettävä parasta tieteellistä asiantuntemusta. Jos kahden kontrollin välillä on eroja, kemikaalille altistettuja käsittelyjä on verrattava liuotinkontrolliin, ellei tiedetä, että laimennusvesikontrolliin vertaaminen on parempi vaihtoehto. Jos näiden kahden kontrolliryhmän välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, suositellaan, että testikemikaalille altistettuja käsittelyjä verrataan yhdistettyihin (liuotin- ja laimennusvesi-)kontrolliryhmiin, ellei tiedetä, että vain jompaankumpaan vertaaminen on parempi vaihtoehto.

Testiraportti

59. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali: fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— kemialliset tunnistetiedot.

Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

— ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne. (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

— mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi ainesosien kemiallinen koostumus (ks. edellä), esiintymistiheys ja olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet.

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta (jos se tiedetään), hedelmöittyneiden munien lähde ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

Testiolosuhteet:

— valoisa aikajakso (valoisat aikajaksot)

— testin rakenne (esimerkiksi kammion koko, materiaali ja veden määrä, testikammioiden ja rinnakkaisnäytteiden lukumäärä, kuoriutuneiden munien määrä rinnakkaisnäytettä kohti)

▼**M8**

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtoväli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)

— testikemikaalin annostelumenetelmä (esim. pumput, laimennusjärjestelmät)

— menetelmän saantoteho ja nimelliset testipitoisuudet, kvantifiointiraja, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuuksia aidossa liuoksessa

— laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä (jos se on mitattu), suspendoituneet kiinteät aineet (jos ne on mitattu), testimediumin suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja mahdolliset muut mittaukset

— nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat

— testiastioissa olevan veden laatu, pH, lämpötila (päivittäin) ja liuenneen hapen pitoisuus

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. ruoan tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotiheys).

Tulokset:

— todisteet siitä, että kontrollit täyttävät yleiset validiteettikriteerit

— seuraavat tiedot kontrolliryhmistä (myös liuotinkontrollista, jos se oli käytössä) ja käsittelyryhmistä: F1- ja F2-sukupolven kuoriutuminen (kuoriutuvuus ja kuoriutumisaika); F1-sukupolvelta kuoriutumisen jälkeinen eloonjääneisyys, kasvu (pituus ja paino), genotyyppinen sukupuoli ja sukupuolten erottelu (esim. sekundaariset sukupuoliominaisuudet peräeväpapillien ja sukurauhasten histologian perusteella), fenotyyppinen sukupuoli, sekundaariset sukupuoliominaisuudet (peräeväpapillit), vtg:n mRNA (tai VTG-proteiini), histopatologinen tutkimus (sukurauhaset, maksa ja munuaiset); F0- ja F1-sukupolvelta lisääntymistiedot (fekunditeetti ja hedelmällisyys); (ks. taulukot 1 ja 2).

— tilastollinen analyysimenetelmä (regressio- tai varianssianalyysi) ja tietojen käsittelymenetelmä (käytetyt tilastolliset testit tai mallit)

— pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä

— pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä ($p = 0{,}05$) tarvittaessa EC_x kullekin arvioidulle vasteelle ja luottamusvälit (esim. 90 tai 95 prosenttia) sekä kaavio sen laskentaan käytetystä sovitetusta mallista, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuus, regressiomallin kaava, estimoidut malliparametrit ja niiden vakiovirheet

— mahdolliset poikkeamat tästä testimenetelmästä ja hyväksymisperusteista sekä pohdinta niiden mahdollisista vaikutuksista testin tulokseen.

▼M8

60. Päätetapahtumien mittaustuloksista on esitettävä keskiarvot ja keskihajonnat (sekä rinnakkaisnäytteiden että pitoisuuksien perusteella, mikäli mahdollista).

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1–36.

(3) OECD (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457–464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925–1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552–2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71–80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692–1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487–1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288–295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78–86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes).* Journal of Applied Toxicology 35:11–23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Saatavana osoitteessa http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593–599.

▼**M8**

(15) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 23.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287–1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330–338.

(21) Tämän liitteen C.15 luku Kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen poikasilla tehtävä lyhytaikainen myrkyllisyystesti

(22) Tämän liitteen luku C.37, 21 päivän mittainen seulontatutkimus kaloilla: Lyhytaikainen estrogeeni- ja androgeeniaktiivisuuteen sekä aromataasin estoon kohdistuva seulonta

(23) Tämän liitteen luku C.41, Kalojen sukupuolikehitystä tutkiva testi

(24) Tämän liitteen luku C.48, Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus

(25) Tämän liitteen C.47 luku, Toksisuustesti kaloilla niiden varhaiskehitysvaiheessa

(26) Tämän liitteen luku C.49, Kalojen alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskeva testi (fet-testi)

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067–1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301–308.

(29) OECD (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245–251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613–619.

(32) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108–1116.

▼**M8**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Kemikaali: Aine tai seos.

ELISA: Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys

Fekunditeetti = mätimunien lukumäärä

Hedelmällisyys = elinkykyisten mätimunien lukumäärä / fekunditeetti

Lovipituus tarkoittaa kalan pituutta leuan kärjestä pyrstöevän keskimmäisten ruotojen kärkeen, ja sitä käytetään kaloilla, joilta on vaikea määrittää selkärangan päättymiskohtaa (www.fishbase.org)

Kuoriutuvuus = kuoriutuneet kalanpoikaset / inkubaattoriin laitettujen alkioiden määrä

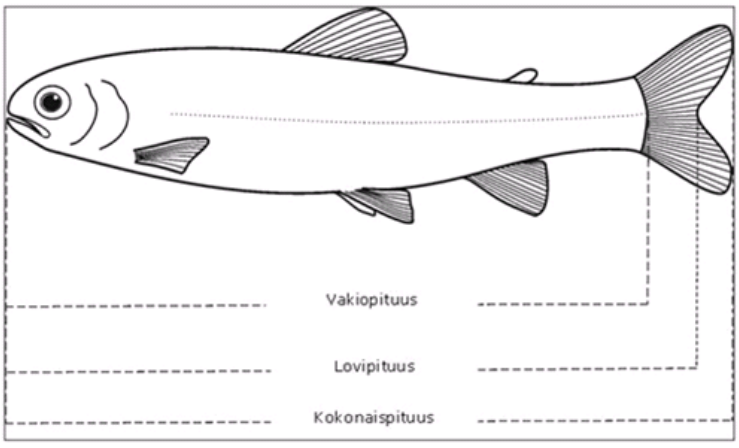
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee, eläinten hoitoa ja käyttöä käsittelevä komitea

Vakiopituus tarkoittaa kalan pituutta mitattuna leuan kärjestä viimeisen nikaman takareunaan tai pyrstönikamien keskiosan takareunaan. Yksinkertaistettuna tästä mittauksesta jätetään pyrstöevän pituus pois. (www.fishbase.org)

Kokonaispituus tarkoittaa pituutta leuan kärjestä pyrstöevän pitemmän lohkon kärkeen; mitataan yleensä siten, että lohkot on puristettu keskilinjaa vasten. Kyseessä on suoran viivan mittaus, ruumiin kaarevuutta ei oteta mukaan (www.fishbase.org).

Kuva 1

Kuvaus käytetyistä eri pituuksista



ECx: (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia) on pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC50 on pitoisuus, jolla estimoidaan olevan 50 prosentin vaikutus testissä tutkittavaan päätetapahtumaan altistuksen kohteeksi joutuneessa populaatiossa määritellyn altistusajan kuluessa.

Läpivirtauskoe on testi, jossa testiliuokset virtaavat jatkuvasti testijärjestelmän läpi altistuksen keston ajan.

HPG-akseli: Hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli.

▼**M8**

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto

Kalatiheys: Kalojen märkäpaino suhteessa vesimäärään.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalilla havaitaan olevan tilastollisesti merkitsevä vaikutus (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on kuitenkin oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu. Lisäyksissä 5 ja 6 on ohjeita tästä.

Mediaani tappava pitoisuus (LC50): Testikemikaalin pitoisuus, jonka arvioidaan aiheuttavan 50 prosentin kuolleisuuden testiorganismeissa testin aikana.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$).

SMILES: SMILES-järjestelmä (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Lastaustiheys: Kalojen lukumäärä tilavuusyksikköä kohti.

Testikemikaali: Tällä testimenetelmällä testattu aine tai seos.

UVCB: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

VTG: Vitellogeniini on fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisproteiinin esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

VHJ: Viikkoa hedelmöittymisen jälkeen

▼**M8**

Lisäys 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
Alumiini	1 µg/l
Arseeni	1 µg/l
Kromi	1 µg/l
Koboltti	1 µg/l
Kupari	1 µg/l
Rauta	1 µg/l
Lyijy	1 µg/l
Nikkeli	1 µg/l
Sinkki	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Elohopea	100 ng/l
Hopea	100 ng/l

▼**M8**

Lisäys 3

MEOGRT-TESTIN TESTIOLOSUHTEET

1.	Suositeltu laji	Medaka (*Oryzias latipes*)
2.	Testityyppi	Jatkuva läpivirtaus
3.	Veden lämpötila	Testin nimellislämpötila on 25°C. Keskimääräisen lämpötilan on oltava jokaisessa säiliössä 24–26°C koko testin ajan.
4.	Valaistus	Loisteputket (laajakirjoiset ja ~150 luumenia / m^2) (~150 luksia).
5.	Valojakso	16 h valoisaa: 8 h pimeää
6.	Lastaustiheys	F0: 2 aikuista / rinnakkaisnäyte; F1: aloitus enintään 20 munalla (alkiolla) / rinnakkaisnäyte; vähennetään 12 alkioon / rinnakkaisnäyte kuoriutumisen yhteydessä ja sen jälkeen kahteen aikuiseen (lisääntyvä XX–XY-pari) hedelmöittymisen jälkeisillä viikoilla 9–10 lisääntymisvaihetta varten
7.	Testikammion käytettävissä oleva vähimmäistilavuus	1,8 l (testikammion koko esimerkiksi: 18 x 9 x 15 cm)
8.	Testiliuosten vaihto	Vähintään 5 ja enintään 16 vaihtoa päivässä (tai virtaus 20 ml/min)
9.	Testiorganismien ikä testin alkaessa	F0: > 12 vhj, ei kuitenkaan yli 16 vhj
10.	Organismien lukumäärä kussakin rinnakkaisnäytteessä	F0: 2 kalaa (1 pari, koiras ja naaras) F1: Enintään 20 kalaa (munaa) / rinnakkaisnäyte (F0- ja F1-sukupolven lisääntyvien parien tuottamia)
11.	Käsittelyjen lukumäärä	5 testikemikaalikäsittelyä + tarvittava(t) kontrolli(t)
12.	Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä	Vähintään 6 rinnakkaisnäytettä kussakin testikemikaalikäsittelyssä ja vähintään 12 rinnakkaisnäytettä kontrollissa ja liuotinkontrollissa, jos sitä käytetään (rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kaksinkertaistetaan F1-sukupolven lisääntymisvaiheessa)
13.	Organismien lukumäärä kussakin testissä	F0: vähintään 84 kalaa, F1: 504 kalaa (Jos liuotinkontrollia käytetään: F0:ssa 108 kalaa ja F1:ssä 648 kalaa.) Laskettava yksikkö on vapaasti liikkumisvaiheen jälkeinen alkio.
14.	Ruokinta	Kaloja ruokitaan suolalehtijalkaisten (*Artemia* spp.) 24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla *ad libitum*. Tarvittaessa kaloille voidaan antaa lisäksi kaupallisesti saatavaa hiutaleruokaa. (Lisäyksessä 5 on esimerkki ruokinta-aikataulusta, jolla taataan varmaa lisääntymistä tukeva riittävä kasvu ja kehitys.)

▼**M8**

15. Ilmastus	Ei tarvita, ellei liuennen hapen pitoisuus ilman kyllästysarvosta ole < 60 %
16. Laimennusvesi	Puhdas pinta-, kaivo- tai synteettinen vesi tai dekloorattu hanavesi.
17. Altistusaika	Ensisijaisesti 19 viikkoa (F0:sta F2:n kuoriutumiseen)
18. Biologiset päätetapahtumat(ensisijaiset)	Kuoriutuvuus (F1 ja F2); eloonjääneisyys (F1, kuoriutumisesta hjv 4 (ruskuaispussipoikasvaiheen loppu/juveniilivaiheen alku), 4–9 (tai 10) hjv (juveniilivaiheen ja poikasvaiheen alku) ja 9–15 hjv (poikasesta aikuisen lopettamiseen asti)); kasvu (F1, pituus ja paino hjv:lla 9 ja 15); sekundaariset sukupuoliominaisuudet (FI, peräeväpapillit hjv:lla 9 ja 15); vitellogeniini (F1, *vtg* mRNA tai VTG-proteiini hjv:lla 15); fenotyyppinen sukupuoli (F1, sukurauhasten histologian perusteella hjv:lla 15) lisääntyminen (F0 ja F1, fekunditeetti ja hedelmällisyys 21 päivän ajan); kutemisaika (F1); ja histopatologia (F1, sukurauhaset, maksa ja munuaiset hjv:lla 15).
19. Testin validiteettikriteerit	Liuenneen hapen pitoisuus ≥ 60 % ilman kyllästysarvosta; keskimääräinen veden lämpötila 24–26°C koko testin ajan; onnistunut lisääntyminen ≥ 65 %:lla naaraista kontrollissa (kontrolleissa); päivittäinen fekunditeetti keskimäärin ≥ 20 munaa kontrollissa (kontrolleissa); kuoriutuvuus ≥ 80 prosenttia (keskiarvo) kontrolleissa (kummassakin sukupolvessa, F1 ja F2); eloonjääneisyys kuoriutumisen jälkeen hjv:lle 3 ≥ 80 % (keskiarvo) ja siitä eteenpäin sukupolven lopettamiseen saakka hjv:lle 3 ≥ 90 % (keskiarvo) kontrolleissa (F1); testikemikaalin pitoisuuksien liuoksessa olisi oltava hyväksyttävästi ± 20 % keskimääräisistä mitatuista arvoista.

▼**M8**

Lisäys 4

KONTROLLIEN TYYPILLISIÄ ARVOJA KOSKEVIA OHJEITA

On syytä todeta, että nämä kontrolliarvot perustuvat vain muutamaan validointitutkimukseen, ja niitä mahdollisesti muutetaan myöhemmin kokemuksen karttuessa.

Kasvu

Kaikilta kaloilta, joilta otetaan näytteet 9 (tai 10) ja 15 viikkoa hedelmöittymisen jälkeen (hjv), mitataan paino ja pituus. Tämän protokollan mukaan odotuksenmukaiset märkäpainot hjv:lla 9 ovat koirailla 85–145 mg ja naarailla 95–150 mg. Odotuksenmukaiset märkäpainot hjv:lla 15 ovat koirailla 250–330 mg ja naarailla 280–350 mg. Vaikka yksittäisen kalan paino voi poiketa näistä viitearvoista huomattavasti, kontrollikalojen keskimääräiset painot, jotka ovat selvästi näiden arvojen ulkopuolella ja etenkin alarajaa pienempiä, viittaavat kuitenkin ruokintaan, lämpötilan hallintaan, vedenlaatuun tai sairauksiin liittyviin ongelmiin tai näiden seikkojen yhdistelmään.

Kuoriutuminen

Kontrolleissa normaali kuoriutuvuus on yleensä noin 90 prosenttia, mutta niinkään pieni arvo kuin 80 prosenttia ei ole epätavallinen. Jos kuoriutuvuus on alle 75 prosenttia, se voi olla merkki siitä, että kehittyvien munien ravistelu on ollut riittämätöntä tai että munien käsittely on ollut huolimatonta (esimerkiksi kuolleet munat on voitu poistaa liian myöhään, mikä on aiheuttanut sieni-infektion).

Eloonjääneisyys

Eloonjääneisyys kuoriutumisesta hjv:lle 3 ja sen jälkeen on kontrolleissa yleensä vähintään 90 prosenttia, mutta edes 80 prosentin eloonjääneisyys elinkaaren varhaisvaiheessa ei ole vielä hälyttävää kontrolleissa. Sen sijaan on huolestuttavaa, jos eloonjääneisyys on kontrolleissa alle 80 prosenttia. Se voi viitata akvaarioiden riittämättömään puhdistukseen, jolloin ruskuaispussipoikaset ovat menehtyneet sairauteen tai ne ovat tukehtuneet, koska liuenneen hapen pitoisuus on ollut liian pieni. Kuolleisuus voi johtua myös säiliön puhdistuksen aikana tapahtuneen vaurioitumisen takia, ja ruskuaispussipoikaset ovat voineet myös joutua sen aikana säiliön vedenpoistojärjestelmään.

Vitellogeniinigeeni

Vaikka *vitellogeniini* (*vtg*) -geenin absoluuttiset pitoisuudet, jotka ilmaistaan yksikössä kopiota/ng mRNA:n kokonaismäärästä, voivat vaihdella laboratorioiden välillä paljonkin käytettyjen menettelyjen tai laitteiden vuoksi, *vtg*-pitoisuuden on oltava noin 200 kertaa suurempi kontrolliryhmän naarailla kuin kontrolliryhmän koirailla. Ei ole epätavallista, jos tämä suhde on 1 000–2 000, mutta alle 200:n oleva suhdeluku on epäilyttävä ja voi viitata näytteen kontaminoitumiseen tai menettelyihin ja/tai käytettyihin reagensseihin liittyviin ongelmiin.

Sekundaariset sukupuoliominaisuudet

Koirailla sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien normaalialue, joka määritellään peräeväpapillien eväruotojen segmenttien kokonaismääränä, on 40–80 segmenttiä hjv:lla 9–10. Hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 15 mennessä normaalialue kontrolliryhmän koirailla tulisi olla noin 80–120 ja kontrolliryhmän naarailla 0. Selittämättömistä syistä joskus harvoin on koiraita, joilla ei ole yhtään papillia hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 9 mennessä, mutta koska papillit kehittyvät kaikille kontrolliryhmän koiraille hedelmöittymisen jälkeiseen viikkoon 15 mennessä, tämä johtuu mitä todennäköisimmin kehityksen viivästymisestä. Jos kontrolliryhmän naarailla havaitaan papilleja, se osoittaa, että populaatiossa on XX-koiraita.

▼**M8**

XX-koiraat

XX-koiraiden normaali taustaesiintyvyys viljelmässä on noin 4 prosenttia tai vähemmän 25 °C:n lämpötilassa. Esiintyvyys kuitenkin kasvaa lämpötilan noustessa. On syytä huolehtia siitä, että XX-koiraiden osuus populaatiossa pysyy mahdollisimman pienenä. Koska XX-koiraiden esiintyvyydessä vaikuttaa olevan geneettinen komponentti, jonka takia se on periytyvää, kantaviljelmän valvonta ja sen varmistaminen, ettei XX-koiraita käytetä kantaviljelmän kasvattamiseen, ovat tehokkaita keinoja vähentää XX-koiraiden esiintyvyyttä populaatiossa.

Kuteminen

Kontrollirinnakkaisnäytteistä on seurattava kutemista päivittäin ennen fekunditeetin arvioimista. Kontrollipareista voidaan arvioida laadullisesti, onko kutemisesta merkkejä. Arviointi voidaan tehdä silmämääräisesti. Useimpien kontrolliparien pitäisi kutea hjv:lle 12–14 mennessä. Jos kutevia pareja on noina viikkoina vähän, kaloilla voi olla mahdollisia terveyteen, kypsyyteen tai hyvinvointiin liittyviä ongelmia.

Fekunditeetti

Terveet ja hyvin ruokitut 12–14 hjv:n ikäiset medakat kutevat yleensä päivittäin ja tuottavat 15–50 mätimunaa päivässä. Lisääntyvien kontrolliparien suositeltu määrä on 24, ja tästä määrästä 16 parin (> 65 %) pitäisi tuottaa yli 20 munaa päivässä paria kohti (mutta ne voivat kuitenkin tuottaa jopa 40 munaa päivässä). Jos munien määrä on tätä pienempi, kutevat parit saattavat olla epäkypsiä, aliravittuja tai sairaita.

Hedelmällisyys

Kutevien kontrolliparien hedelmöittyneiden munien prosentuaalinen osuus on yleensä 90 prosentin luokkaa, eivätkä myöskään 95 prosentin paikkeilla olevat tai sitä suuremmat arvot ole epätavallisia. Jos kontrolliparien hedelmöittyneiden munien osuus on alle 80 prosenttia, on aihetta epäillä, että kalayksilöt eivät ole terveitä tai että kasvatusolosuhteet eivät ole ihanteelliset.

▼**M8**

Lisäys 5

ESIMERKKI RUOKINTA-AIKATAULUSTA

Taulukossa 1 on esimerkki ruokinta-aikataulusta, jolla taataan varmaa lisääntymistä tukeva riittävä kasvu ja kehitys. Tästä aikataulusta saa tarvittaessa poiketa, mutta on suositeltavaa, että poikkeavien aikataulujen yhteydessä varmistetaan, että hyväksyttävää kasvua ja lisääntymistä on havaittavissa. Jotta ehdotettua ruokinta-aikataulua voidaan noudattaa, suolalehtijalkaisten kuivapaino niiden liemen tilavuuteen nähden on määritettävä ennen testin aloittamista. Se voidaan tehdä punnitsemalla tietty määrä suolalehtijalkaisten lientä, jota on kuivattu 24 tunnin ajan 60 °C:ssa ennalta punnituissa astioissa. Jotta voidaan ottaa huomioon liemessä olevien suolojen paino, on kuivattava ja punnittava sama määrä suolaliuosta kuin liemessä on käytetty, ja paino on vähennettävä kuivatun suolalehtijalkaisliemen painosta. Vaihtoehtoisesti suolalehtijalkaisliemi voidaan suodattaa ja huuhdella tislatulla vedellä ennen kuivaamista, jolloin ei tarvitse punnita ”pelkän suolan” painoa. Näitä tietoja käytetään taulukon tietojen muuntamisessa suolalehtijalkaisliemen kuivapainosta siihen suolalehtijalkaisliemen määrään, joka kullekin kalalle on annettava. Lisäksi suositellaan, että suolalehtijalkaisliemestä punnitaan alikvootit viikoittain, jotta varmistetaan, että kaloille annetaan kuivapainoltaan oikea määrä suolalehtijalkaisia.

Taulukko 1

Esimerkki ruokinta-aikataulusta

Aika (kuoriutumisen jälkeen)	Suolalehtijalkaisia (mg kuivapainoa / kala / päivä)
Päivä 1	0,5
Päivä 2	0,5
Päivä 3	0,6
Päivä 4	0,7
Päivä 5	0,8
Päivä 6	1,0
Päivä 7	1,3
Päivä 8	1,7
Päivä 9	2,2
Päivä 10	2,8
Päivä 11	3,5
Päivä 12	4,2
Päivä 13	4,5
Päivä 14	4,8
Päivä 15	5,2
Päivät 16–21	5,6

▼**M8**

Aika (kuoriutumisen jälkeen)	Suolalehtijalkaisia (mg kuivapainoa / kala / päivä)
Viikko 4	7,7
Viikko 5	9,0
Viikko 6	11,0
Viikko 7	13,5
Viikko 8 – lopetus	22,5

▼**M8**

Lisäys 6

ESIMERKKEJÄ MUNIEN INKUBOINTIKAMMIOSTA

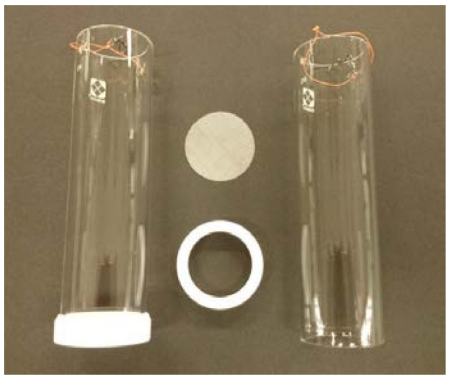
Esimerkki A





Tämä inkubaattori koostuu katkaistusta lasisesta sentrifugiputkesta, jossa on ruostumatonta terästä oleva holkki ja joka pysyy paikallaan sentrifugin ruuvitulpalla. Tulpan läpi menee ohut lasinen tai ruostumatonta terästä oleva putki, joka ulottuu melkein pyöristettyyn pohjaan asti. Putki puhaltaa varovasti ilmakuplia, joiden tarkoituksena on suspendoida munat, vähentää saprotrofisten sieni-infektioiden kulkeutumista munien välillä ja mahdollistaa kemikaalin virtaus inkubaattorin ja varastosäiliön välillä.

Esimerkki B



▼**M8**



Tämä inkubaattori koostuu lasisesta lieriöstä (halkaisija 5 cm ja korkeus 10 cm) ja ruostumatonta terästä olevasta verkosta (φ 0,25, silmäkoko 32), joka on kiinnitetty lieriön pohjaan PFTE-renkaalla. Inkubaattorit ripustetaan säiliöihin nostorivasta, ja niitä ravistellaan pystysuunnassa (heilahdustaajuus noin 5 cm) medakan munille sopivassa syklissä (yleensä neljän sekunnin välein).

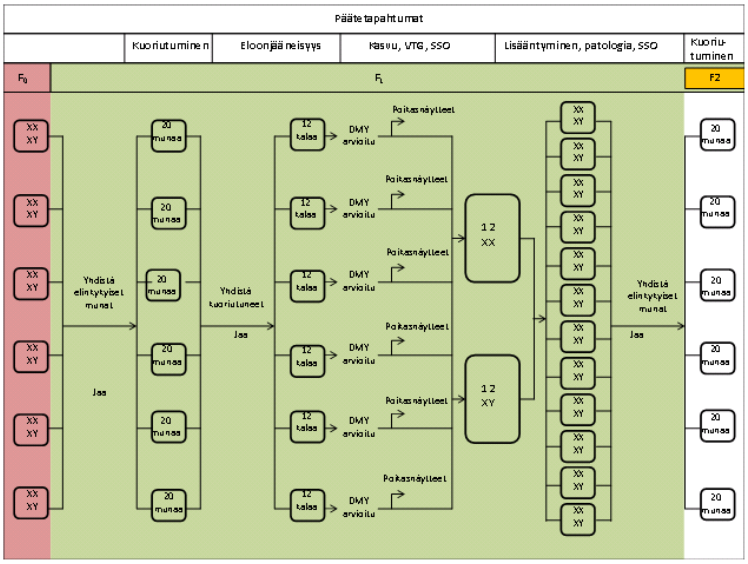
▼M8

Lisäys 7

KAAVIO RINNAKKAISNÄYTTEIDEN YHDISTÄMISESTÄ JA TÄYTTÄMISESTÄ MEORGT-TESTIMENETELMÄN YHTEYDESSÄ

Kuva 1

Rinnakkaisnäytteiden yhdistäminen ja täyttäminen MEOGRT-testissä Kuvassa esitetään yksi käsittely tai puolikas kontrollista. Yhdistämisen takia rinnakkaisnäytteen identiteetti ei ole sama koko testin ajan. Ilmauksella ”munat” tarkoitetaan elinkykyisiä hedelmöittyneitä munia (eli alkioita).



Käsittelyt ja rinnakkaisnäytteet

Testimenetelmässä suositellaan viittä testikemikaalikäsittelyä, joissa käytetään teknisen laadun kriteerit täyttävää materiaalia, ja negatiivista kontrollia. Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä ei pysy samana koko MEOGRT-testin ajan, ja kontrollikäsittelyssä on kaksinkertainen määrä rinnakkaisnäytteitä yhteen testikemikaalikäsittelyyn verrattuna. F0-sukupolvessa jokaisessa testikemikaalikäsittelyssä on kuusi rinnakkaisnäytettä, ja negatiivisessa kontrollikäsittelyssä on 12 rinnakkaisnäytettä. Liuottimien käyttöä ei suositella, mutta jos niitä käytetään, MEORGT-testiraportissa on esitettävä perustelut sekä liuottimen käytölle että tietyn liuottimen valinnalle. Lisäksi tarvitaan kahdenlaisia kontrolleja, jos liuotinta käytetään: a) liuotinkontrolli ja b) negatiivinen kontrolli. Kummankin näistä kahdesta kontrolliryhmästä on koostuttava täydestä määrästä rinnakkaisnäytteitä kaikissa tämän testin aikajanan pisteissä. Tämä rinnakkaisnäyterakenne pysyy samana testiorganismin kehittyessä F1-sukupolvessa (ja F2-sukupolvessa kuoriutumiseen saakka). Aikuisvaiheessa, kun F1-sukupolven lisääntyvät parit on muodostettu, lisääntymisparien rinnakkaisnäytteiden määrä käsittelyä kohti tulisi mieluiten kaksinkertaistaa. Tällöin jokaisessa testikemikaalikäsittelyssä on enintään 12 rinnakkaisnäyteparia ja kontrolliryhmässä 24 paria (ja tarvittaessa toiset 24 rinnakkaisnäyteparia liuotinkontrollissa). F1-parien kudusta peräisin olevien alkioiden kuoriutuminen määritetään samalla rinnakkaisnäyterakenteella kuin F0-parien kudusta peräisin olevien alkioiden yhteydessä, eli testikemikaalikäsittelyä kohti on aluksi kuusi rinnakkaisnäytettä ja kontrolliryhmässä (-ryhmissä) 12.

▼**M8**

Lisäys 8

PERÄEVÄPAPILLIEN LASKEMINEN

Tärkeimmät materiaalit ja reagenssit

— Dissektiomikroskooppi (jossa voi olla kamera liitettynä)

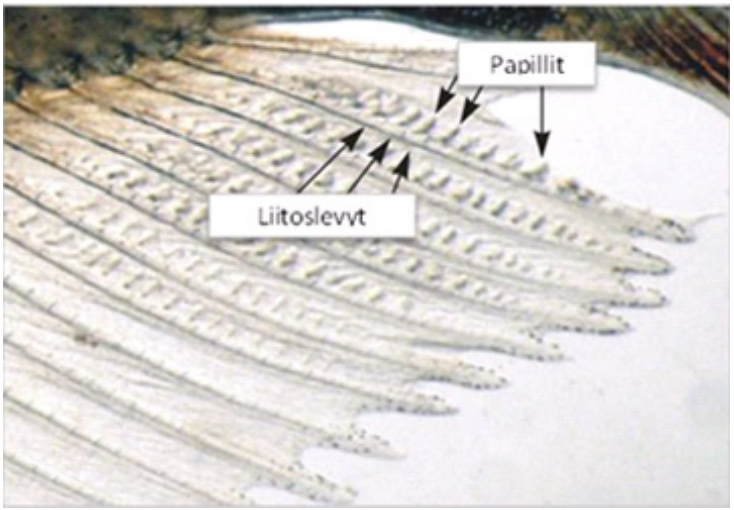
— Kiinnitysaine (esimerkiksi Davidsonin aine, Bouinin ainetta ei suositella), jos laskentaa ei tehdä kuvasta

Menettelyt

Ruumiinavauksen jälkeen peräevä on kuvattava, jotta peräeväpapillit voidaan laskea helposti. Kuvantaminen on suositeltu menetelmä, mutta peräevä voidaan myös kiinnittää Davidsonin kiinnitysaineella tai muulla sopivalla kiinnitysaineella (noin minuutin ajan). Kiinnityksen ajan peräevä on tärkeä pitää litteänä, jotta papillien laskeminen on helpompaa. Ruumis ja peräevä voidaan säilöä Davidsonin kiinnitysaineeseen tai muuhun sopivaan aineeseen siihen asti, kun ne analysoidaan. Laske niiden liitoslevyjen lukumäärä (ks. **kuva 1**), joissa on levyn takareunasta esiin työntyviä papilleja.

Kuva 1

Peräeväpapillit



▼M8

Lisäys 9

MEORGT-TESTIN TARKKA AIKAJANA

Testiviikot 1–3 (F0)

F0-sukupolven kutevat kalat, jotka täyttävät valintaperusteet (ks. 16–20 kohta), altistetaan kolmen viikon ajaksi, jotta kehittyvät gameetit ja sukurauhaskudokset altistuvat testikemikaalille. Jokaisessa rinnakkaisnäytesäiliössä on yksi lisääntyvä kalapari (XX-naaraasta ja XY-koiraasta muodostuva pari). Mätimunat kerätään ja lasketaan, ja niistä arvioidaan hedelmällisyys 21 peräkkäisen päivän ajan testipäivästä 1 aloittaen.

Testiviikko 4 (F0 ja F1)

Hedelmöittyneet ja elinkykyiset munat (alkiot) kerätään mieluiten yhtenä päivänä. Jos alkioita ei kuitenkaan ole tarpeeksi, niitä voidaan kerätä kahtena päivänä. Jos niitä kerätään kahtena päivänä, kaikki käsittelyistä ensimmäisenä päivänä kerätyt alkiot yhdistetään niihin, jotka kerätään toisena päivänä. Kaikki kustakin käsittelystä yhdistetyt alkiot jaetaan satunnaisesti rinnakkaisnäyteinkubaattoreihin (20 alkiota yhteen inkubaattoriin). Kuolleet hedelmöittyneet munat (alkiot) tarkistetaan ja kirjataan päivittäin. Kuolleet munat poistetaan inkubaattoreista (hedelmöittyneiden munien kuoleman voi havaita erityisesti varhaisvaiheissa: läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkymättömyys, OECD 2010).

Huom. Jos yhdestä käsittelystä on kerättävä munia toisena päivänä, kaikkiin käsittelyihin (ja kontrolleihin) on sovellettava tätä menettelyä. Jos toisen keruupäivän jälkeen yhdessä käsittelyssä on edelleen liian vähän alkioita siihen nähden, että yhteen inkubaattoriin pitää saada 20 alkiota, kyseisen käsittelyn alkioiden määrää vähennetään 15 alkioon yhtä inkubaattoria kohti. Jos alkioita ei ole edelleenkään tarpeeksi, jotta yhteen inkubaattoriin saataisiin 15 alkiota, rinnakkaisnäyteinkubaattorien määrää vähennetään siten, että jokaiseen inkubaattoriin saadaan 15 alkiota. Lisäksi F0-sukupolveen voidaan lisätä lisääntyviä pareja jokaiseen käsittelyyn ja kontrolliin, jotta munien tuotanto lisääntyisi siten, että suositus 20 munasta rinnakkaisnäytettä kohti täyttyisi.

Testipäivänä 24 F0-sukupolven lisääntymisparit lopetetaan humaanisti ja niiden paino ja pituus merkitään muistiin. Tarvittaessa F0-sukupolven lisääntyviä pareja voidaan pitää elossa vielä yksi tai kaksi päivää, jotta F1-sukupolven luonti voidaan aloittaa uudelleen.

Testiviikot 5–6 (F1)

Yksi tai kaksi päivää ennen kuoriutumisen oletettua alkamista inkuboitavien munien ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään kuoriutumisen jouduttamiseksi. Koska alkioita kuoriutuu joka päivä, kuoriutuneet kalanpoikaset yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti kuhunkin poikasten rinnakkaisnäytesäiliöön tietyn käsittelyn mukaisesti. Yhdessä säiliössä saa olla enintään 12 kuoriutunutta kalanpoikasta. Tämä tehdään valitsemalla kalanpoikaset satunnaisesti ja laittamalla yksi kalanpoikanen peräkkäisiin rinnakkaisnäytteisiin sattumanvaraisesti siirtymällä järjestyksessä tietyn käsittelyn rinnakkaisnäytteestä toiseen, kunnes kaikissa käsittelyn näytteissä on 12 kalanpoikasta. Jos kalanpoikasia ei ole tarpeeksi, jotta niitä riittäisi kaikkiin rinnakkaisnäytteisiin, on varmistettava, että mahdollisimman monessa näytteessä on 12 kalanpoikasta, jotta F1-vaihe voidaan aloittaa.

Munat, jotka eivät ole kuoriutuneet, kun kontrollin kuoriutumisen mediaanipäivästä on kulunut kaksi kertaa niin pitkä aika, katsotaan elinkyvyttömiksi ja hävitetään. Kalanpoikasten lukumäärä kirjataan, ja kuoriutuvuus lasketaan jokaisesta rinnakkaisnäytteestä.

▼M8

Testiviikot 7–11 (F1)

Ruskuaispussipoikasten eloonjääminen tarkastetaan ja kirjataan päivittäin kaikista rinnakkaisnäytteistä. Testipäivänä 43 elossa olevien kalojen lukumäärä jokaisesta rinnakkaisnäytteestä kirjataan, kuten myös rinnakkaisnäytteeseen alun perin laitettujen kuoriutuneiden kalanpoikasten määrä (nimellislukumäärä 12). Tämän avulla voidaan laskea eloonjäämisen prosentuaalinen osuus kuoriutumisesta poikasvaiheeseen.

Testiviikko 12 (F1)

Testipäivänä 78–82 jokaisen kalan pyrstöevästä otetaan pieni näyte yksilön genotyyppisen sukupuolen määrittämiseksi (ts. eväleike) kaikkien kalojen osalta. Tämän tiedon perusteella muodostetaan lisääntyvät parit.

Kolmen päivän kuluessa siitä, kun jokaisen kalan genotyyppinen sukupuoli on määritetty, muodostetaan 12 lisääntyvää paria jokaiseen käsittelyyn ja 24 paria jokaiseen kontrolliin sattumanvaraisesti. Jokaisesta rinnakkaisnäytteestä valitaan satunnaisesti kaksi XX- ja XY-kalaa, jotka yhdistetään sukupuolittain, ja sen jälkeen niistä valitaan satunnaisesti kaksi kalaa lisääntyvän parin (eli XX–XY-parin) muodostamiseksi. Kuhunkin kemikaalikäsittelyyn tehdään vähintään 12 rinnakkaisnäytettä ja kuhunkin kontrolliin vähintään 24 näytettä, ja jokaiseen näytteeseen laitetaan yksi lisääntyvä pari. Jos rinnakkaisnäytteessä ei ole kahta XX-kalaa tai kahta XY-kalaa yhdistämistä varten, tarvittavan sukupuoligenotyypin mukainen kala on otettava muista käsittelyn rinnakkaisnäytteistä.

Loput kalat (enintään 8 kussakin rinnakkaisnäytteessä) lopetetaan humaanisti, ja niistä otetaan poikasvaiheen eri päätetapahtumien mukaiset näytteet. Kaikista poikasvaihenäytteistä säilytetään *dmy*-tiedot (XX vai XY), jotta voidaan varmistaa, että kaikki päätetapahtumatiedot voidaan liittää jokaisen yksittäisen kalan geneettiseen sukupuoleen.

Testiviikot 13–14 (F1)

Altistusta jatketaan, kun poikasvaiheen lisääntyvät parit kehittyvät aikuisiksi. Testipäivänä 98 (eli munien keräämistä edeltävänä päivänä) munat otetaan pois sekä akvaarioista että naaraista.

Testiviikot 15–17 (F1)

Kutemisen aikana lasketut mätimunat kerätään päivittäin 21 peräkkäisen päivän ajan kaikista rinnakkaisnäytteistä, ja niiden fekunditeetti ja hedelmällisyys arvioidaan.

Testiviikko 18 (testiviikon 4 toisto) (F1 ja F2)

Testipäivän 120 aamuna munat kerätään jokaisesta rinnakkaisnäytesäiliöstä. Kerätyt munat arvioidaan, ja jokaisen lisääntyvän parin hedelmöittyneet munat (joista on poistettu rihmat) yhdistetään käsittelyittäin ja jaetaan järjestelmällisesti munien inkubointikammioihin (20 munaa yhteen inkubaattoriin). Inkubaattorit voidaan laittaa erillisiin ”inkubaattorisäiliöihin”, jotka on valmisteltu kutakin käsittelyä varten, tai rinnakkaisnäytesäiliöön, jotka sisältävät kuoriutumisen yhteydessä kuoriutuneet ruskuaispussipoikaset. Alkiot kerätään mieluiten yhtenä päivänä. Jos alkioita ei kuitenkaan ole tarpeeksi, niitä voidaan kerätä kahtena päivänä. Jos niitä kerätään kahtena päivänä, kaikki käsittelyistä ensimmäisenä päivänä kerätyt alkiot yhdistetään niihin, jotka kerätään toisena päivänä. Kaikki kustakin käsittelystä yhdistetyt alkiot jaetaan satunnaisesti rinnakkaisnäyteinkubaattoreihin (20 alkiota yhteen inkubaattoriin). Huom. Jos yhdestä käsittelystä on kerättävä munia toisena päivänä, kaikkiin käsittelyihin (ja kontrolleihin) on sovellettava tätä menettelyä. Jos toisen keruupäivän jälkeen yhdessä käsittelyssä on

▼M8

edelleen liian vähän alkioita siihen nähden, että yhteen inkubaattoriin pitää saada 20 alkiota, kyseisen käsittelyn alkioiden määrää vähennetään 15 alkioon yhtä inkubaattoria kohti. Jos alkioita ei ole edelleenkään tarpeeksi, jotta yhteen inkubaattoriin saataisiin 15 alkiota, rinnakkaisnäyteinkubaattorien määrää vähennetään siten, että jokaiseen inkubaattoriin saadaan 15 alkiota.

Testipäivänä 121 (tai testipäivänä 122, jotta varmistetaan, että F2-sukupolven luominen on alkanut hyvin) F1-sukupolven lisääntyvät parit lopetetaan humaanisti ja niistä analysoidaan aikuisten kalojen päätetapahtumat. Tarvittaessa F1-sukupolven lisääntyviä pareja voidaan pitää elossa vielä yksi tai kaksi päivää, jotta F2-sukupolven luonti voidaan aloittaa uudestaan.

Testiviikot 19–20 (F2)

Yksi tai kaksi päivää ennen kuoriutumisen oletettua alkamista inkuboitavien munien ravistelu lopetetaan tai sitä vähennetään kuoriutumisen jouduttamiseksi. Jos testi päättyy F2-sukupolven kuoriutumiseen, kuoriutuneet kalanpoikaset lasketaan joka päivä ja hävitetään sen jälkeen. (Alkiot, jotka eivät ole kuoriutuneet pidennetyn inkubointiajan (kaksi kertaa kontrollin kuoriutumispäivän mediaani) jälkeen, katsotaan elinkyvyttömiksi.)

▼**M8**

Lisäys 10

TILASTOANALYYSI

MEORGT-testistä saadut biologisten tietojen tyypit eivät ole vain sille ominaisia. Patologisia tietoja lukuun ottamatta on kehitetty monia sopivia tilastomenetelmiä, joilla voidaan analysoida samanlaisia tietoja asianmukaisesti sen mukaan, millaisia piirteitä tiedoissa on (esimerkiksi normaalisuus, varianssin yhtenäisyys, se, sopiiko tutkimus rakenteeltaan hypoteesin testaamiseen tai regressioanalyysiin, parametriset vs. ei-parametriset testit jne.). Yleisperiaate on se, että ehdotetuissa tilastoanalyyseissa noudatetaan ekotoksisuustietoja koskevia OECD:n suosituksia (OECD 2006) ja MEORGT-testin aineistoanalyysia koskevaa päätöksenteon vuokaaviota (kuva 2).

Oletuksena on, että useimmiten tietueet kuvastavat monotonisia vasteita. Lisäksi on otettava huomioon kysymys yksisuuntaisen tilastollisen testin käyttämisestä verrattuna kaksisuuntaiseen tilastolliseen testiin. Ellei ole biologisia perusteita, joiden nojalla yksisuuntainen testi on epätarkoituksenmukainen, suositellaan käytettävän yksisuuntaisia testejä. Jäljempänä suositellaan tiettyjä tilastollisia testejä, mutta jos kehitetään tarkoituksenmukaisempia ja/tai selitysvoimaltaan parempia tilastomenetelmiä sovellettavaksi tiettyihin MEORGT-testissä saatuihin tietoihin, näitä tilastollisia testejä on syytä käyttää, jotta niistä koituvia etuja voidaan hyödyntää.

MEORGT-testistä saadut tiedot on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen. On kaksi strategiaa analysoida niiden kalojen tiedot, joiden sukupuoli on vaihtunut (joko XX-koiraat tai XY-naaraat): 1) sensuroidaan koko testistä kaikki tiedot kaloista, joiden sukupuoli on vaihtunut, lukuun ottamatta sukupuolen vaihtumisen esiintyvyyttä kussakin rinnakkaisnäytteessä; 2) säilytetään aineistossa tiedot kaikista kaloista, joiden sukupuoli on vaihtunut, ja analysoidaan ne genotyypin perusteella.

Histopatologiset tiedot

Histopatologiset tiedot raportoidaan vakavuuspisteinä, jotka arvioidaan hiljattain kehitetyllä tilastomenetelmällä nimeltä Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS), (Green ja muut, 2014). *Rao-Scottin* mukautus säilyttää testin toistamista koskevat tiedot; *by Slices* -menettely sisältää biologisen odotuksen, jonka mukaan vakavuuspisteillä on taipumus lisääntyä käsittelypitoisuuksien suurentuessa. RSCABS-menetelmällä saatu tulos määrittää jokaisen diagnoosin osalta, missä käsittelyissä patologisia löydöksiä esiintyy enemmän kuin kontrolleissa, ja näihin liittyvän vakavuusasteen.

Fekunditeettitiedot

Fekunditeettitietojen analyysi koostuu askeltavasta Jonckheere-Terpstran tai Williamsin testistä, jolla määritetään käsittelyn vaikutukset, jos tiedot ovat yhdenmukaiset monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa. Askeltavassa testissä kaikki vertailut tehdään 0,05:n merkitsevyystasolla, eikä siinä tehdä mukautusta vertailujen lukumäärään nähden. Tietojen oletetaan olevan yhdenmukaisia monotonisen pitoisuus-vasteen kanssa, mutta tämä voidaan varmentaa joko tarkastamalla tiedot silmämääräisesti tai tekemällä lineaariset ja kvadraattiset kontrastit käsittelyjen keskiarvoista tietojen arvojärjestysmuunnoksen jälkeen. Jos kvadraattinen kontrasti on merkitsevä ja lineaarinen kontrasti ei ole, tehdään trenditesti. Muussa tapauksessa käsittelyn vaikutusten määrittämiseen käytetään Dunnettin testiä, jos tiedot jakautuvat normaalisti ja jos varianssit ovat homogeenisia. Jos nämä vaatimukset eivät täyty, tehdään Dunnin testi Bonferonni-Holmin mukautuksella. Kaikki mainitut testit tehdään riippumatta mahdollisesta yleisestä F- tai Kruskal-Wallisin testistä. Tarkempia tietoja on julkaisussa OECD 2006.

▼M8

Muitakin menetelmiä (munien määrän osalta vaikkapa yleistettyä lineaarista mallia Poissonin virheineen ilman muunnosta) voidaan käyttää, jos se on tilastollisesti perusteltua (Cameron ja Trividi, 2013). Tilastotieteellinen neuvonta on suositeltavaa, jos muita menetelmiä käytetään.

Päivittäinen munamäärä yhdessä sukupolvessa

ANOVA-mallissa käytetään kaavaa Y=Time*Time+Treatment + *Treatment + Time*Treatment + *Time*Treatment, satunnaisvaikutusten osalta Replicate(Generation*Treatment) ja Time*Replicate(Treatment). Näin saadaan kummankin tyypin erisuuren varianssin komponentit sukupolvista. Kaavassa ajalla (time) tarkoitetaan munienkeruun tiheyttä (päivä tai viikko). Tämä on toistettujen toimenpiteiden analyysi, jossa on myös korrelaatioita samoja rinnakkaisnäytteitä koskevien havaintojen välillä, koska tiedot siis liittyvät toistettuihin toimenpiteisiin.

Käsittelyn tärkeimmät vaikutukset testataan Dunnettin (tai Dunnett-Hsun) testillä, jossa käytetään vertailujen lukumäärän mukautusta. Mukautukset ovat tarpeen tarkasteltaessa sukupolvea tai aikaa tärkeimpänä vaikutuksena, koska näille kahdelle tekijälle ei ole kontrollitasoa ja jokaisella tasoparilla voi olla vertailun kannalta mahdollista merkitystä. Jos näiden kahden tärkeimmän vaikutuksen yhteydessä tärkeimmän vaikutuksen F-testi on merkitsevä 0,05:n tasolla, parittaiset vertailut tämän tekijän tasoilla voidaan testata 0,05:n tasolla ilman muuta mukautusta.

Malli sisältää kahden ja kolmen tekijän yhteisvaikutuksia, jolloin esimerkiksi aika tärkeimpänä vaikutuksena ei välttämättä ole merkitsevä, vaikka aika vaikuttaa tuloksiin merkittävästi. Jos siis kahden tai kolmen tekijän yhteisvaikutus, johon sisältyy aika, on merkitsevä 0,05:n tasolla, ajan tasojen vertailut 0,05:n merkitsevyystasolla voidaan hyväksyä ilman muuta mukautusta.

Seuraavaksi tehdään F-testit käsittelyn merkitsevyydestä ajassa (eli ns. osat ANOVA-taulukossa). Jos esimerkiksi käsittelyä koskeva osa F1-sukupolven ja ajan 12 suhteen on merkitsevä 0,05:n tasolla, käsittelyn parittaiset vertailut F1-sukupolven ja ajan 12 osalta voidaan hyväksyä 0,05:n tasolla ilman muuta mukautusta. Samanlaisia lausekkeita sovelletaan testeihin, jotka koskevat aikaa F1:n ja sukupolven sisällä ja sukupolvea ajan ja käsittelyn sisällä.

Ne vertailut, jotka eivät kuulu mihinkään edellisiin luokkiin, on mukautettava käyttämällä Bonferroni-Holmin mukautusta p-arvoihin. Lisätietoja tällaisten mallien analyyseista on julkaisuissa Hocking (1985) sekä Hochberg ja Tamhane (1987).

Vaihtoehtoisesti voidaan tallentaa raakatiedot ja esittää ne tutkimusraportissa fekunditeettina (munien lukumäärä) rinnakkaisnäytettä kohti joka päivältä. Rinnakkaisnäytteiden raakatietojen keskiarvo on laskettava ja sen jälkeen siihen on sovellettava neliöjuurimuunnosta. Muunnettujen rinnakkaisnäytekeskiarvojen yksisuuntainen ANOVA on laskettava Dunnettin kontrastien avulla. Kunkin käsittelyn ja/tai rinnakkaisnäytteen fekunditeettitiedot kannattaa myös tarkastaa silmämääräisesti pistekaaviolla, joka näyttää tiedot ajan suhteen. Näin mahdollisia aikaan liittyviä vaikutuksia voidaan arvioida epävirallisesti.

Kaikki muut biologiset tiedot

Tilastolliset analyysit perustuvat oletukseen, että jos annos on valittu asianmukaisesti, aineisto on monotoninen. Aineiston oletetaan siis olevan monotoninen, ja sen monotonisuus arvioidaan virallisesti käyttämällä lineaarisia ja kvadraattisia kontrasteja. Jos aineisto on monotoninen, suositellaan Jonckheere-Terpstran trenditestiä rinnakkaisnäytteiden mediaaneille (julkaisussa OECD 2006 suositellun mukaisesti). Jos kvadraattinen kontrasti on merkitsevä ja lineaarinen kontrasti taas ei ole, aineiston katsotaan olevan ei-monotoninen.

▼**M8**

Jos aineisto on ei-monotoninen etenkin siksi, että suurimman pitoisuuden tai kahden suurimman pitoisuuden osalta vaste on ollut pienempi, on syytä harkita näiden tietojen sensurointia, jolloin analyysi siis tehdään ilman näitä käsittelyitä. Päätös on tehtävä asiantuntijan harkinnan perusteella, ja siinä on otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot, etenkin ne, joissa toksisuus on ollut selvää näillä pitoisuuksilla.

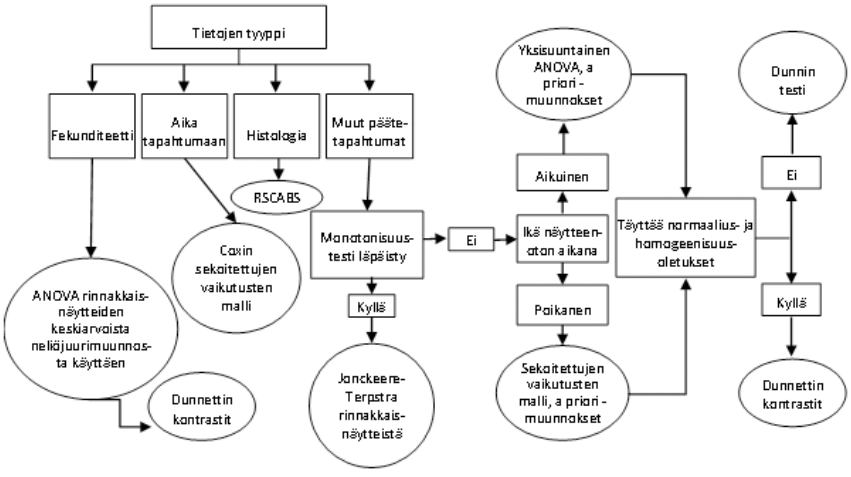
Paino- ja pituustietojen osalta muuntamista ei suositella, vaikka se voi toisinaan olla tarpeen. Vitellogeniinitiedoille suositellaan kuitenkin logaritmimuunnosta; sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia (peräeväpapillit) koskeville tiedoille suositellaan neliöjuurimuunnosta, ja arkussini-neliöjuurimuunnosta suositellaan kuoriutumisasteen, prosentuaalisen eloonjääneisyyden, sukupuolten suhteen ja hedelmöittyneiden munien prosenttiosuuden tiedoille. Kuoriutumisaikaa ja ensimmäisen kudun ajankohtaa on käsiteltävä tapahtumisaikatietoina, ja yksittäisiä alkioita, jotka eivät kuoriutuneet määritettynä aikana, tai rinnakkaisnäytteiden kaloja, jotka eivät kuteneet koskaan, on käsiteltävä oikealta sensuroituina tietoina. Kuoriutumisaika on laskettava kunkin rinnakkaisnäytteen kuoriutumispäivän mediaanista. Nämä päätetapahtumat on analysoitava käyttämällä sekoitettuja vaikutuksia koskevaa Coxin suhteellisen vaaran mallia.

Aikuisnäytteiden biologisten tietojen osalta tehdään yksi mittaus rinnakkaisnäytettä kohti eli yhdestä XX-kalasta ja yhdestä XY-kalasta rinnakkaisakvaariossa. Tämän vuoksi suositellaan, että rinnakkaisnäytteiden keskiarvoista tehdään yksisuuntainen ANOVA-testi. Jos ANOVAn oletukset (normaalisuus ja varianssin homogeenisuus arvioituina ANOVAN jäännöksillä Shapiro-Wilksin testillä ja Levenen testillä) toteutuvat, ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista, on määritettävä Dunnettin kontrasteilla. Jos taas ANOVAn oletukset eivät toteutuneet, on tehtävä Dunnin testi, jotta voidaan määrittää ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista. Samanlaista menettelyä suositellaan prosenttiosuutena ilmoitettaville tiedoille (hedelmällisyys, kuoriutuminen ja eloonjääneisyys).

Poikasnäytteiden biologisten tietojen osalta tehdään 1–8 mittausta rinnakkaisnäytettä kohti. Niiden yksilöiden määrä voi siis vaihdella, jotka vaikuttavat rinnakkaisnäytteiden keskiarvoon kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta. Sen vuoksi on suositeltavaa käyttää sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallia ja sen jälkeen Dunnettin kontrasteja, jos normaalisuutta ja varianssin homogeenisuutta koskevat oletukset toteutuivat (sekoitettujen vaikutusten ANOVA-testin jäännöksillä). Jos oletukset eivät toteutuneet, on tehtävä Dunnin testi, jotta voidaan määrittää ne käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista.

Kuva 2

Vuokaavio MEORGT-testin aineiston analyysille suositelluista tilastomenettelyistä



▼**M8**

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) OECD (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Publishing, Paris.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

C.53. SAMMAKKOELÄINTEN TOUKKIEN KASVUA JA KEHITYSTÄ MITTAAVA TESTI

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 241 (2015). Tarve kehittää ja validoida tutkimus, jolla pystytään havaitsemaan ja luonnehtimaan myrkyllisille kemikaaleille altistumisesta johtuvia haittavaikutuksia sammakkoeläimille, perustuu huolenaiheisiin, joiden mukaan kemikaalien ympäristöpitoisuuksista saattaa aiheutua haittavaikutuksia sekä ihmisille että eläimille. Tässä sammakkoeläinten toukkien kasvua ja kehitystä mittaavaa testiä (Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)) koskevassa OECD:n testiohjeessa kuvataan sammakkoeläimillä tehtävä toksisuustesti, jossa tarkastellaan kasvua ja kehitystä hedelmöittymisestä varhaisen juveniilivaiheen ajan. Tässä testissä, joka kestää yleensä 16 viikkoa, arvioidaan varhaisvaiheen kehitystä, muodonvaihdosta, eloonjäämistä, kasvua ja osittain myös lisääntymiskypsyyttä. Testin avulla voidaan mitata myös joukko muita päätetapahtumia, joiden perusteella voidaan tehdä diagnostinen arviointi oletetuista hormonaalisista haitta-aineista tai muista kehitykseen ja lisääntymiseen vaikuttavista myrkyllisistä aineista. Tässä testimenetelmässä selostettu menetelmä perustuu afrikankynsisammakolla (*Xenopus laevis*) tehtyyn validointitutkimukseen, jonka on toteuttanut Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluvirasto EPA. Täydentäviä tutkimuksia on tehty Japanissa (1). Vaikka kasvua ja kehitystä arvioivaan testiprotokollaan voivat soveltua myös muut sammakkoeläinlajit, varsinkin sellaiset, joiden geneettinen sukupuoli voidaan määrittää, koska se on tärkeä osa testiä, tässä testimenetelmässä selostetut menetelmät ja tarkkailtavat päätetapahtumat koskevat pelkästään *Xenopus laevista*.

2. LAGDA on korkeamman tason testi, jossa sammakkoeläimistä voidaan kerätä haittavaikutuksista tavallista kattavampia pitoisuus-vastetietoja, joita voidaan käyttää vaarojen tunnistamisessa ja luonnehtimisessa sekä ympäristöriskien arvioinnissa. Testiä voidaan käyttää OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasolla 4, jolla *in vivo* -testeistä saadaan myös tietoa haittavaikutuksista hormonijärjestelmän kannalta oleellisten päätetapahtumien osalta (2). Pääpiirteissään testi koostuu Nieuwkoopin ja Faberin (NF) vaiheessa 8–10 olevien *X. laevis* -alkioiden altistamisesta vähintään neljälle pitoisuudelle testikemikaalia (porrastus yleensä enintään puolilogaritmisin välein) ja kontrolliainetta (-aineita). Altistus kestää 10 viikkoa kontrollieläinten NF-vaiheen 62 mediaaniajan jälkeen, ja NF-vaiheessa 62 otetaan yksi osaotos (≤ 45 päivää hedelmöittymisen jälkeen; yleensä noin 45 päivää (päivää hedelmöittymisen jälkeen, phj). Kustakin testipitoisuudesta on neljä rinnakkaisnäytettä, ja kontrollista niitä on kahdeksan. Altistumisen aikana arvioitavat päätetapahtumat (väliaikaisesta osaotoksesta ja lopullisesta otoksesta testin päättyessä) ovat sellaisia, jotka viittaavat yleistyneeseen toksisuuteen (kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen ja kasvuparametrit (pituus ja paino)), sekä sellaisia, joilla luonnehditaan tiettyjä endokriiniseen toksisuuteen viittaavia vaikutustapoja, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin fysiologisiin prosesseihin. Menetelmässä painotetaan ensisijaisesti mahdollisia populaation kannalta oleellisia vaikutuksia (eli eloonjääneisyyteen, kehitykseen, kasvuun ja lisääntymiskehitykseen kohdistuvia haittavaikutuksia), kun lasketaan pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC-arvo), tai vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa × % muutoksia (ECx) mitattavassa päätetapahtumassa. On kuitenkin muistettava, etteivät ECx-arvoon perustuvat lähestymistavat useinkaan sovellu tämäntyyppisiin laajoihin tutkimuksiin, joissa testipitoisuuksien lukumäärän kasvattaminen halutun ECx-arvon määrittämiseksi saattaa olla epäkäytännöllistä. Lisäksi on muistettava, ettei menetelmä kata varsinaista lisääntymisvaihetta. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on selostettu lisäyksessä 1.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

3. Tämän melko monimutkaisen testin validoinnissa testattiin vähän kemikaaleja, validointiin osallistui vain muutama laboratorio, eikä etenkään laboratorioiden välistä toistettavuutta ole vahvistettu kokeellisin tiedoin. Sen vuoksi

▼M8

on oletettavaa, että kun saatavilla on riittävä määrä tutkimuksia, joilla voidaan vahvistaa tämän rakenteeltaan uudenlaisen tutkimuksen vaikutus, OECD:n testiohjetta 241 tarkistetaan ja muutetaan tarvittaessa kertyneen kokemuksen perusteella. LAGDA on tärkeä tutkimus, jolla voidaan tarkastella sammakkoeläinpopulaation heikkenemiseen mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä. Siinä arvioidaan kemikaalialtistuksen vaikutuksia herkän toukkavaiheen aikana, kun eloonjäämiseen ja kehitykseen, myös lisääntymiselinten normaaliin kehitykseen, kohdistuvat vaikutukset voivat vaikuttaa populaatioihin haitallisesti.

4. Testi on suunniteltu havaitsemaan sekä endokriinisista että muista kuin endokriinisista mekanismeista johtuva apikaalinen vaikutus (johtuvat vaikutukset), ja siihen sisältyy diagnostisia päätetapahtumia, jotka ovat osittain spesifejä keskeisille endokriinisille vaikutustavoille. Ennen kuin LAGDA-testi kehitettiin, ei ollut sellaista validoitua testiä, joka olisi täyttänyt tämän tehtävän sammakkoeläinten osalta.

5. Ennen testin aloittamista tutkimuksen tekijällä on oltava tietoa testikemikaalin fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista. Tämä on tärkeää etenkin siksi, että voidaan valmistaa vakaita kemikaaliliuoksia. Lisäksi tarvitaan riittävän herkkä analyysimenetelmä testikemikaalien pitoisuuksien varmentamiseen. Testi kestää noin 16 viikkoa, ja sinä aikana tarvitaan yhteensä 480 koe-eläintä eli *X. laeviksen* alkiota (tai 640 alkiota, jos käytetään liuotinkontrollia), jotta voidaan varmistaa, että testin todistusvoima on riittävä populaation kannalta oleellisten päätetapahtumien, kuten kasvun, kehityksen ja lisääntymiskypsyyden, arvioinnissa.

6. Ennen kuin testimenetelmää käytetään sääntelyn edellyttämään seosten testaukseen, on harkittava, antaako se hyväksyttävät tulokset sääntelyn tavoitteen kannalta. Tässä testissä ei myöskään arvioida fekunditeettia suoraan, joten se ei välttämättä ole sovellettavissa OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testaamista ja arviointia koskevan toimintamallin tasoa 4 ylemmällä tasolla.

TESTIMENETELMÄN TIETEELLINEN PERUSTA

7. Siitä, mitä nykyään tiedämme sammakkoeläinten biologiasta, suuri osa on hankittu käyttämällä koe-eläinlajina *X. laevista.* Tätä lajia voidaan kasvattaa laboratoriossa helposti, ja sen ovulaatio voidaan saada aikaan käyttämällä ihmisen koriongonadotropiinia (hCG). Lisäksi eläinkantoja saadaan nopeasti kaupallisilta kasvattajilta.

8. Kaikkien selkärankaisten tavoin sammakkoeläinten lisääntymistä säätelee hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli (HPG-akseli) (4). Tämä endokriinisen järjestelmän välittäjiä ovat estrogeenit ja androgeenit, jotka ohjaavat sukupuolisesti dimorfisten kudosten kehittymistä ja fysiologiaa. Sammakkoeläinten elinkaaressa on kolme erillistä vaihetta, joissa tämä akseli on erityisen aktiivinen: 1) sukurauhasten erilaistuminen toukkavaiheen aikana, 2) sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehittyminen ja sukurauhasten kypsyminen juveniilivaiheessa ja 3) aikuisten sammakkoeläinten toiminnallinen lisääntyminen. Kukin näistä kolmesta kehitysikkunasta on todennäköisesti altis tiettyjen kemikaalien, kuten estrogeenien ja androgeenien, aiheuttamalle hormonijärjestelmän häiriöille, mikä lopulta johtaa organismien lisääntymiskyvyn häviämiseen.

9. Sukurauhaset alkavat kehittyä NF-vaiheessa 43, kun bipotentiaalinen sukupuoliharjanne muodostuu. Sukurauhasten erilaistuminen alkaa NF-vaiheessa 52, kun varhaisvaiheen itusolut joko kulkeutuvat kehittyvien sukurauhasten medullaariseen kudokseen (koiraat) tai jäävät kortikaaliselle alueelle (naaraat)

▼M8

(3). *Xenopus*-lajilla tämän sukurauhasten sukupuolisen erilaistumisen prosessin raportoitiin jo 1950-luvulla olevan altis kemikaalien aiheuttamalle muutokselle (5) (6). Sammakonpoikasten altistaminen estradiolille tämän sukurauhasten erilaistumisen vaiheen aikana aiheutti sukupuolen vaihtumisen koirailla, jotka olivat täysikasvuisina täysin toimintakykyisiä naaraita (7) (8). Toiminnallinen sukupuolen vaihtuminen naaraasta koiraaksi on myös mahdollista, ja sitä on raportoitututkimuksista, joissa sammakonpoikasiin on istutettu kiveskudosta (9). Vaikka myös aromataasin estäjälle altistuminen aiheuttaa toiminnallisen sukupuolen vaihtumisen *X. tropicalis* -lajilla (10), tämän ei ole osoitettu tapahtuvan *X. laeviksella*. Aikaisemmin myrkyllisten aineiden vaikutusta sukurauhasten erilaistumiseen on arvioitu sukurauhasten histologisilla tutkimuksilla muodonvaihdosvaiheessa, ja sukupuolen vaihtuminen on voitu määrittää vain sukupuolten suhteita määrittämällä. Viime aikoihin saakka ei ole ollut keinoja määrittää *Xenopus*-lajin sammakoiden geneettistä sukupuolta suoraan. Hiljattain X. laevikselta on kuitenkin löydetty sukupuoleen liittyviä markkereita, joiden avulla geneettisen sukupuolen määrittäminen ja niiden eläinten tunnistaminen, joiden sukupuoli on vaihtunut, ovat tulleet mahdollisiksi (11).

10. Koirailla juveniilivaiheen kehittyminen etenee, kun testosteronin pitoisuus veressä kasvaa sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien ja kivesten kehittymistä vastaavasti. Naarailla munasarjat alkavat tuottaa estradiolia, jolloin plasmassa on havaittavissa vitellogeniiniä (VTG), munasarjoissa vitellogeenioosyyttejä, ja munanjohtimet alkavat kehittyä (12). Munanjohtimet ovat sekundaarisia sukupuoliominaisuuksia, joilla on tehtävä oosyyttien kypsymisessä lisääntymisen aikana. Oosyyttien pintaan muodostuu hyytelömäinen kuori, kun ne kulkevat munanjohtimen läpi ja kerääntyvät munapussiin valmiina hedelmöittymistä varten. Estrogeenit vaikuttavat säätelevän munanjohtimien kehittymistä, koska *X. laevuksella* (13) ja *X. tropicaliksella* (12) se korreloi veren estradiolipitoisuuden kanssa. Koirailla on raportoitu munanjohtimien kehittymistä polyklooratuille bifenyyliyhdisteille (14) ja 4-*tert*-oktyylifenolille (15) altistumisen jälkeen.

TESTIN PERIAATE

11. Testissä NF-vaiheessa 8–10 olevat *X. laevis* -alkiot altistetaan vesireittiä neljälle pitoisuudelle testikemikaalia ja kontrolliainetta (-aineita). Altistus kestää 10 viikkoa kontrollin NF-vaiheen 62 mediaaniajan jälkeen, ja NF-vaiheessa 62 otetaan yksi osaotos. Vaikka voi olla mahdollista annostella erittäin hydrofobisia kemikaaleja ruoan seassa, tämän altistusreitin käyttämisestä on tähän mennessä niukalti kokemusta. Kustakin testipitoisuudesta on neljä rinnakkaisnäytettä, ja kustakin käytettävästä kontrollista niitä on kahdeksan. Altistumisen aikana arvioitavat päätetapahtumat ovat sellaisia, jotka viittaavat yleistyneeseen toksisuuteen (ts. kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen ja kasvuparametrit (pituus ja paino)), sekä sellaisia, joilla luonnehditaan tiettyjä endokriiniseen toksisuuteen viittaavia vaikutustapoja, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin fysiologisiin prosesseihin (ts. kilpirauhasen histopatologia, sukurauhasten ja sukujohtimien histopatologia, epänormaali kehittyminen, plasman vitellogeniinipitoisuus (valinnainen) ja genotyyppisen/fenotyyppisen sukupuolen suhteet).

TESTIN VALIDITEETTIKRITEERIT

12. Testin validiteettiin sovelletaan seuraavia kriteerejä:

— Liuenneen hapen pitoisuus on oltava ≥ 40 prosenttia ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.

▼**M8**

— Veden lämpötilan on oltava alueella 21 ± 1 °C, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 1,0 °C.

— Testiliuoksen pH-arvon on pysyttävä välillä 6,5–8,5, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 0,5.

— Saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

— Altistusaikana kuolleisuuden tulee olla ≤ 20 prosenttia jokaisessa kontrollirinnakkaisnäytteessä.

— Elinkyvyn on oltava ≥ 70 prosenttia tutkimuksen aloittamiseen valitussa kudussa.

— Kontrolleissa NF-vaiheen 62 alkamisajan mediaanin on oltava ≤ 45 päivää.

— Testiorganismien keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulee olla kontrolleissa ja liuotinkontrolleissa (jos käytössä) 1,0 ± 0,2 g ja testin lopettamisvaiheessa 11,5 ± 3 g.

13. Lisäksi suositellaan, että analyysiin on käytettävissä vähintään kolme käsittelypitoisuutta ja kolme vaarantumatonta rinnakkaisnäytettä, vaikka tämä ei olekaan validiteettiperuste. Liiallinen kuolleisuus, joka vaarantaa tietyn käsittelyn, määritellään näin: > 4 kuollutta eläintä (> 20 %) kahdessa tai useammassa rinnakkaisnäytteessä, kun niitä ei voida selittää teknisellä virheellä. Analyysia varten saatavilla on oltava vähintään kolme käsittelypitoisuutta, joissa ei ole merkkejä selvästä toksisuudesta. Selvän toksisuuden merkkejä ovat esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjalla makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen, ärsykkeisiin reagoimattomuus, morfologiset poikkeavuudet (esimerkiksi raajojen epämuodostumat), verta vuotavat leesiot ja vatsan turvotus.

14. Jos havaitaan poikkeama testin validiteettikriteereistä, sen vaikutukset testitulosten luotettavuuteen on otettava huomioon, ja nämä poikkeamat ja niihin liittyvät näkökohdat on sisällytettävä testiraporttiin.

MENETELMIEN KUVAUS

Laitteisto

15. Tavalliset laboratoriolaitteet ja erityisesti seuraavat:

a) lämpötilan valvontalaitteet (ts. lämmittimet tai jäähdyttimet, säädettävä lämpötila 21 ± 1 °C)

▼M8

b) lämpömittari

c) kaksiokulaarinen dissektiomikroskooppi ja dissektiovälineet

d) digitaalikamera, jonka tarkkuus on vähintään neljä megapikseliä ja jossa on mikrotoiminto (tarvittaessa)

e) analyysivaaka, jonka tarkkuus on 0,001 mg tai 1 μg

f) liuenneen hapen mittari ja pH-mittari

g) valotehon mittari, jossa mittayksikkönä luksi.

Vesi

Lähde ja laatu

16. Mitä tahansa paikallisesti saatavilla olevaa laimennusvettä (esim. lähdevettä tai aktiivihiilisuodatettua hanavettä), jossa *X. laevis* voi kasvaa ja kehittyä normaalisti, voidaan käyttää. Todisteet normaalista kasvusta tässä vedessä on esitettävä. Koska paikallisen veden laatu voi vaihdella huomattavasti alueelta toiselle, veden laatu on analysoitava etenkin silloin, jos saatavilla ei ole aiempia tietoja veden käyttökelpoisuudesta sammakkoeläinten toukkien kasvattamisessa. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), torjunta-aineet, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet on mitattava ennen testin aloittamista ja/tai esimerkiksi kuuden kuukauden välein, jos laimennusveden laadun tiedetään olevan suhteellisen vakio. Lisäyksessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia.

Testiveden jodipitoisuus

17. Jotta kilpirauhanen voi syntetisoida tyroksiinihormonia normaalin muodonvaihdoksen tukemiseksi, toukkien on saatava vedestä ja ravinnosta riittävästi jodia. Tällä hetkellä empiirisesti johdettuja ohjeita asianmukaisen kehityksen varmistavista vähimmäisjodipitoisuuksista ravinnossa tai vedessä ei ole. Jodin saatavuus voi kuitenkin vaikuttaa siihen, miten kilpirauhasjärjestelmä reagoi kilpirauhaseen vaikuttaviin aineisiin, ja sen tiedetään muokkaavan kilpirauhasen perustoimintaa. Tämä seikka on syytä ottaa huomioon kilpirauhasen histopatologisia tuloksia tulkittaessa. Aiempien tutkimusten perusteella testin on osoitettu toimivan hyvin, kun laimennusveden jodin (I^-) pitoisuus vaihteli välillä 0,5–10 μg/l. Ihannetapauksessa laimennusveden vähimmäisjodipitoisuuden tulisi olla 0,5 μg/l koko testin ajan (lisättynä natrium- tai kaliumsuolana). Jos testivesi valmistetaan deionisoidusta vedestä, jodia on lisättävä sen verran, että vähimmäispitoisuudeksi tulee 0,5 μg/l. Testivedestä (ts. laimennusvedestä) mitatut jodipitoisuudet ja testiveden täydentäminen jodilla tai muilla suoloilla (jos käytetty) on raportoitava. Jodipitoisuus voidaan mitata myös ravinnosta testiveden lisäksi.

Altistusjärjestelmä

18. Testin kehittämisessä käytettiin läpivirtauslaimenninjärjestelmää. Järjestelmän veden kanssa kosketuksiin joutuvien osien tulee olla lasia, ruostumatonta terästä ja/tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Altistussäiliöiden on oltava lasista tai ruostumattomasta teräksestä valmistettuja akvaarioita, ja säiliön käyttötilavuuden tulee olla 4,0–10,0 litraa (veden vähimmäissyvyys 10–15 cm). Järjestelmässä on voitava käyttää kaikkia altistuspitoisuuksia, kontrollia ja tarvittaessa liuotinkontrollia sekä neljää rinnakkaisnäytettä käsittelyä kohti ja kahdeksaa rinnakkaisnäytettä kontrolleja kohti. Jokaisen säiliön virtausnopeuden on oltava tasainen, kun otetaan huomioon sekä biologisten olosuhteiden ylläpitäminen että kemikaalialtistus. Virtausnopeuden on

▼M8

oltava riittävä (säiliön tilavuuden on vaihduttava vähintään 5 kertaa päivässä). Näin vältetään kemikaalipitoisuuden pienentyminen sekä testiorganismien että akvaarioissa olevien vesieliöiden metabolian tai abioottisten hajoamisreittien (hydrolyysi, fotolyysi) tai häviämisen (haihtuminen, sorptio) takia. Käsittelysäiliöt on laitettava altistusjärjestelmään sattumanvaraisiin paikkoihin, jotta mahdolliset sijainnista johtuvat vaikutukset sekä pienet lämpötilan, valotehon jne. vaihtelut voidaan minimoida. Lisätietoja läpivirtaukseen perustuvan altistusjärjestelmän rakentamisesta on ASTM:n oppaassa ”Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians” (16).

Kemikaalin annostelu: testiliuosten valmistaminen

19. Altistusjärjestelmän testiliuokset valmistetaan annostelemalla testikemikaalin varastoliuosta altistusjärjestelmään asianmukaisella pumpulla tai muulla laitteella. Varastoliuoksen virtausnopeus on kalibroitava testiliuosten analyyttisten vahvistusten perusteella ennen altistumisen aloittamista, ja se on tarkistettava volymetrisesti säännöllisin väliajoin testin aikana. Jokaisen kammion testiliuoksen on vaihduttava vähintään viisi kertaa päivässä.

20. Menetelmä, jolla testikemikaali annostellaan järjestelmään, voi vaihdella kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Ennen testiä on siksi hankittava kemikaalista perustiedot, joilla on merkitystä sen testattavuuden kannalta. Hyödyllisiä tietoja testikemikaalin ominaisuuksista ovat rakennekaava, molekyylipaino, puhtaus, stabiilius vedessä ja valossa, pK_a ja K_{ow}, vesiliukoisuus (mieluiten testimediumissa) ja höyrynpaine sekä tulokset nopean biohajoavuuden testistä (testimenetelmä C.4 (17) tai C.29 (18)). Liukoisuutta ja höyrynpainetta voidaan käyttää laskettaessa Henryn vakiota, josta voidaan päätellä, onko todennäköistä, että testikemikaalia häviää haihtumisen vuoksi testin aikana. Tämän testin tekemistä ilman edellä lueteltuja tietoja on syytä harkita tarkkaan, koska testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikuttavat tutkimuksen rakenteeseen ja ilman näitä tietoja testin tuloksia voi olla vaikea tulkita tai ne voivat olla merkityksettömiä. Käytettävissä pitäisi olla myös tarkkuudeltaan ja havaitsemisrajaltaan tunnettu luotettava analyysimenetelmä, jolla testikemikaali voidaan määrittää kvantitatiivisesti testiliuoksissa. Vesiliukoiset testikemikaalit voidaan liuottaa laimennusveden alikvootteihin sellaisena pitoisuutena, jolla saadaan aikaiseksi testin tavoitepitoisuus läpivirtausjärjestelmässä. Huoneenlämmössä nestemäisten tai kiinteiden tai veteen kohtalaisesti liukenevien kemikaalien yhteydessä voidaan tarvita neste:neste- tai neste:kiinteä aine (esim. lasivillakolonni) -saturaattoreita (19). Vaikka voi olla mahdollista annostella erittäin hydrofobisia kemikaaleja ruoan seassa, tämän altistusreitin käyttämisestä tässä testissä on tähän mennessä niukalti kokemusta.

21. Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla. Varastoliuos tulee valmistaa mieluiten vain sekoittamalla tai ravistamalla testikemikaali laimennusveteen mekaanisin menetelmin (ts. sekoittamalla ja/tai ultraäänellä). Saturaatiopylväitä/-järjestelmiä tai passiivisia annostelumenetelmiä (20) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Ensisijaisesti tulee käyttää liuotinvapaata testijärjestelmää. Koska eri testikemikaaleilla on erilaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kemikaalialtistusveden valmistamisessa on ehkä käytettävä erilaisia lähestymistapoja. Liuottimien tai kantaja-aineiden käyttöä on pyrittävä välttämään kaikin keinoin, koska 1) tietyt liuottimet voivat aiheuttaa toksisuutta ja/tai ei-toivottuja tai

▼M8

odottamattomia vasteita, 2) kemikaalien testaaminen niiden vesiliukoisuuden ylittävänä määränä (kuten voi usein olla liuottimien käytön yhteydessä) voi johtaa vaikuttavien pitoisuuksien epätarkkoihin määrityksiin, 3) liuottimien käyttö pidempiaikaisissa testeissä voi johtaa huomattavaan biokalvon muodostumiseen, joka liittyy mikrobien toimintaan ja voi vaikuttaa ympäristöolosuhteisiin ja altistuspitoisuuksien säilymiseen, ja 4) jollei ole aikaisempia tietoja, jotka osoittavat, ettei liuotin vaikuta tutkimuksen tulokseen, liuottimien käyttö edellyttää liuotinkontrollikäsittelyä, millä on merkittäviä vaikutuksia eläinten hyvinvointiin, koska testin tekemiseen tarvitaan lisää koe-eläimiä. Vaikeasti testattavien kemikaalien yhteydessä liuotinta voidaan käyttää viimesijaisena keinona, ja paras menetelmä on määritettävä OECD:n ohjeasiakirjan Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (21) perusteella. Liuotin valitaan testikemikaalin kemiallisten ominaisuuksien ja sen perusteella, onko liuottimen käytöstä saatavana aikaisempia tietoja. Jollei aikaisempia tietoja ole, liuottimen sopivuus on määritettävä ennen lopullisen tutkimuksen tekemistä. Jos liuottimen käyttö on välttämätöntä ja mikrobitoimintaa (biokalvon muodostumista) ilmenee, on suositeltavaa kirjata/ilmoittaa biokalvon muodostumista koskevat tiedot säiliötä kohti (vähintään viikoittain) koko testin ajan. Ihannetapauksessa liuotinpitoisuus olisi pidettävä vakiona liuotinkontrollissa ja kaikissa testikäsittelyissä. Jos liuottimen pitoisuus ei pysy vakiona, liuotinkontrollissa on käytettävä testikäsittelyn suurinta liuotinpitoisuutta. Jos käytetään liuotinta kantaja-aineena, suurin liuotinpitoisuus saa olla 100 µl/l tai 100 mg/l (21), mutta liuotinpitoisuus on suositeltavaa pitää mahdollisimman pienenä (esim. < 20 µl/l), jotta vältetään liuottimen mahdolliset vaikutukset mitattaviin päätetapahtumiin (22).

Koe-eläimet

Testilajit

22. Testilaji on *X. laevis*, koska sitä 1) kasvatetaan yleisesti laboratorioissa kautta maailman, 3) on saatavana helposti kaupallisilta toimittajilta ja 3) sen geneettinen sukupuoli voidaan määrittää.

Aikuisten eläinten hoito ja lisääntyminen

23. *X. laeviksen* asianmukaista hoitoa ja lisääntymistä kuvataan vakio-ohjeissa (23). Myös Read (24) on kuvannut sen elinolosuhteita ja hoitoa. Lisääntymisprosessi käynnistetään injektoimalla 3–5 parille aikuisia naaraita ja koiraita ihmisen koriongonadotropiinia (hCG:tä) intraperitoneaalisesti. Naaraille injektoidaan 800–1 000 IU ja koiraille 500–800 IU 0,6–0,9-prosenttiseen suolaliuokseen liuotettua hCG:tä (joka voidaan liuottaa myös sammakoiden Ringerin liuokseen eli sammakkoeläimille käytettävään isotoniseen suolaliuokseen). Injektiotilavuuden tulee olla noin 10 µl painogrammaa kohti (~1 000 µl). Parit, joiden on määrä lisääntyä, pidetään suurissa säiliöissä häiriöittä ja staattisissa olosuhteissa, jotta eläimet hakeutuvat paritteluasentoon helpommin. Jokaisessalisääntymissäiliössä tulee olla ruostumattomasta teräsverkosta valmistettu valepohja (silmäkoko 1,25 cm), jotta munat laskeutuvat säiliön pohjalle. Sammakot, joille hCG-injektio annetaan myöhään iltapäivällä, laskevat valtaosan munistaan yleensä seuraavan aamupäivän puolivälissä. Kun munia on laskettu riittävästi ja kun ne on hedelmöitetty, aikuiset eläimet on otettava pois lisääntymissäiliöistä. Sen jälkeen munat kerätään ja hyytelömäiset kuoret poistetaan L-kysteiinikäsittelyllä (23). Sitä varten on valmistettava 2-prosenttinen L-kysteiiniliuos, ja sen pH-arvoksi on säädettävä 8,1, mikä tehdään 1 M:lla NaOH:ta. Tämä liuos, jonka lämpötila on 21 °C, lisätään 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joka sisältää yhden

▼M8

kudun munat. Pulloa sekoitetaan varovasti 1–2 minuuttia ja sen jälkeen se huuhdellaan perusteellisesti 6–8 kertaa 21-asteisella kasvatusvedellä. Tämän jälkeen munat siirretään kiteytysmaljaan ja tutkitaan, onko niistä > 70 prosenttia elinkykyisiä; alkioissa, joiden solujen todetaan jakautuvan, voi olla pieniä poikkeavuuksia.

TESTIN RAKENNE

Testipitoisuudet

24. On suositeltavaa käyttää vähintään neljää kemikaalipitoisuutta ja asianmukaisia kontrolleja (myös liuotinkontrolleja tarvittaessa). Pitoisuuksien porrastuskerroin voi olla 3,2; sitä suurempia kertoimia ei yleensä suositella.

25. Mikäli mahdollista, tässä testissä tulisi käyttää olemassa olevien sammakkoeläintutkimusten tuloksia suurimman testipitoisuuden määrittämisessä, jotta selvästi toksiset pitoisuudet voidaan välttää. Tämän pitoisuuden määrittämisessä apua voi olla esimerkiksi kvantitatiivisiin rakenne-aktiivisuussuhteisiin ja vertailuun perustuvista tiedoista sekä muiden sammakkoeläintutkimusten tuloksista. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi sammakkoeläinten muodonvaihdostutkimus, testimenetelmä C.38 (25) ja sammakon alkion teratogeneesitesti – *Xenopus* (23) ja/tai esimerkiksi testimenetelmien C.48, C.41 ja C.49 kaltaiset kalatestit (26) (27) (28). Ennen LAGDA-testin tekemistä voidaan tehdä pitoisuusalueen määritystesti. Pitoisuusalueen määrittämistä koskeva altistus suositellaan aloitettavaksi 24 tunnin kuluessa hedelmöittymisestä, ja sitä pitää jatkaa 7–14 päivää (tarvittaessa kauemminkin). Testipitoisuudet pitää asettaa niin, että testipitoisuuksien välinen kerroin on enintään 10. Pitoisuusalueen määritystestin tarkoituksena on määrittää suurin LADGA-testissä käytettävä pitoisuus. Jos on käytettävä liuotinta, liuottimen sopivuus (eli se, voiko se vaikuttaa tutkimuksen tulokseen) voidaan selvittää osana pitoisuusalueen määritystestiä.

Rinnakkaisnäytteet käsittelyryhmissä ja kontrolleissa

26. Testissä on käytettävä vähintään neljää rinnakkaisnäytesäiliötä testipitoisuutta kohti ja vähintään kahdeksaa rinnakkaisnäytettä kontrolleja (ja tarvittaessa liuotinkontrollia) kohti (ts. kontrollien ja mahdollisen liuotinkontrollin rinnakkaisnäytteiden määrä tulee olla kaksi kertaa niin suuri kuin kunkin käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteiden lukumäärän. Näin varmistetaan riittävä tilastollinen voima). Kussakin rinnakkaisnäytteessä saa olla enintään 20 eläintä. Käsiteltävien eläinten vähimmäismäärä on 15 (5 eläintä NF-vaiheen 62 osaotokseen ja 10 juveniilia). Jokaisen rinnakkaisnäytteen mahdolliset kuolleet eläimet kuitenkin korvataan lisäämällä näytteeseen eläimiä, jotta säilytetään kriittinen määrä eli 15.

MENETTELY

Testin yleiskuvaus

27. Testi aloitetaan hiljattain muodostuneilla alkioilla (NF-vaihe 8–10), ja sitä jatketaan siihen saakka, kunnes alkiot ovat kehittyneet juveniileiksi. Eläimet tutkitaan päivittäin kuolleisuuden ja mahdollisten epänormaalin käyttäytymisen merkkien varalta. NF-vaiheessa 62 otetaan osaotos toukista (enintään 5 eläintä / rinnakkaisnäyte), ja niistä tutkitaan eri päätetapahtumia (taulukko 1). Kun kaikki eläimet ovat kehittyneet NF-vaiheeseen 66 eli kun muodonvaihdos on tapahtunut (tai 70 päivän kuluttua testin aloittamisesta sen mukaan, kumpi tapahtuu ensin), tehdään satunnainen karsinta (ilman osaotosta) eläinten määrän

▼M8

vähentämiseksi (10 eläintä / säiliö) (ks. 43 kohta). Muiden eläinten altistusta jatketaan siihen asti, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaanista kontrollissa. Testin päättyessä (näytteenotto juveniileista) tehdään lisää mittauksia (taulukko 1).

Altistusolosuhteet

28. Perusteellinen yhteenveto testiparametreista on lisäyksessä 3. Altistusjakson aikana liuennut happi, lämpötila ja testiliuosten pH-arvo on mitattava päivittäin. Johtavuus, emäksisyys ja kovuus mitataan kerran kuukaudessa. Testiliuosten lämpötilan osalta rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen väliset erot (yhtenä päivänä) saavat olla enintään 1,0 °C, ja testiliuosten pH-arvon ero rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välillä saa olla enintään 0,5.

29. Syömättä jäänyt ruoka ja ulosteet voidaan poistaa säiliöistä lapolla päivittäin. Siinä on kuitenkin oltava huolellinen säiliöiden ristikontaminaation välttämiseksi. Myös stressin ja traumojen aiheuttaminen eläimille on pidettävä minimissään varsinkin niiden liikuttelun, akvaarioiden puhdistamisen ja käsittelyn aikana. Stressiä aiheuttavia olosuhteita/toimia (esimerkiksi kova ja/tai jatkuva melu, akvaarioihin koputtelu, säiliöön kohdistuva tärinä) on vältettävä.

Altistumisaika testikemikaalille

30. Altistuminen aloitetaan hiljattain muodostuneilla alkioilla (NF-vaihe 8–10), ja sitä jatketaan 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta (≤ 45 päivää testin aloittamisesta) kontrolliryhmässä. Yleensä LAGDA-testi kestää 16 viikkoa (ja enintään 17 viikkoa).

Testin aloittaminen

31. Testin aloittamisessa käytettyjen, poikasia saaneiden eläimien on täytynyt osoittaa aikaisemmin, että ne tuottavat jälkeläisiä, joiden geneettinen sukupuoli voidaan määrittää (lisäys 5). Aikuisten sammakoiden kutemisen jälkeen kerätään alkiot, joista poistetaan hyytelömäinen kuori kysteiinikäsittelyllä, ja ne seulotaan elinkyvyn perusteella (23). Kysteiinikäsittelyn ansiosta alkioita voidaan käsitellä seulonnan aikana ilman, että ne tarttuvat pintoihin. Seulonta tehdään dissektiomikroskoopilla, ja elinkyvyttömät alkiot poistetaan käyttämällä sopivankokoista tiputuspipettiä. Testissä suositellaan käytettävän yhdestä kutukerrasta peräisin olevia alkioita, joiden elinkyky on yli 70 prosenttia. NF-vaiheessa 8–10 olevat alkiot jaetaan satunnaisesti altistuskäsittelysäiliöihin, joissa on riittävästi laimennusvettä, kunnes jokaisessa säiliössä on 20 alkiota. Alkioita on käsiteltävä tämän siirron aikana varovasti, jotta käsittelystä aiheutuu mahdollisimman vähän stressiä ja jotta vältetään mahdolliset vammat. Kun hedelmöittymisestä on kulunut 96 tuntia, sammakonpoikasten olisi täytynyt siirtyä vesikolonnista ja alkaa tarttua säiliöiden seiniin.

Ruokinta

32. Ravinto ja ruokintatiheyden muutos *X. laeviksen* elinkaaren eri vaiheissa on hyvin tärkeä osa LAGDA-testin protokollaa. Liiallinen ruokinta toukkavaiheen aikana johtaa yleensä siihen, että skolioosin ilmaantuvuus ja sen vakavuus (lisäys 8) kasvaa, ja tätä pitäisi välttää. Vastaavasti liian vähäinen ruokinta toukkavaiheessa johtaa suuresti vaihtelevaan kehitysnopeuteen kontrolleissa, mikä voi vaarantaa testin tilastollisen voiman tai aiheuttaa virheellisiä testituloksia.

▼M8

Lisäyksessä 4 on kerrottu *X. laevikselle* suositeltu toukka- ja juveniilivaiheen ruokavalio ja ruokinta-aikataulu läpivirtausolosuhteissa, mutta vaihtoehtoja saa käyttää, kunhan testiorganismit kasvavat ja kehittyvät asianmukaisesti. On tärkeää muistaa, että jos mitataan endokriinisiä päätetapahtumia, ravinnossa ei saa olla endokriinisesti vaikuttavia aineita, kuten soijarehua.

Toukkien ruokinta

33. Toukille suositeltu ruokavalio koostuu lohien kasvatusravinnosta, *Spirulina*-levätableteista ja kultakalan ruoasta (esim. TetraFin®-hiutaleet, Tetra, Saksa), jotka sekoitetaan kasvatus- (tai laimennus)veteen. Tätä sekoitusta annetaan kolme kertaa päivässä arkipäivisin ja kerran päivässä viikonloppuisin. Sammakonpoikasia ruokitaan myös elävillä suolalehtijalkaisten (*Artemia* spp.) 24 tunnin ikäisillä nauplisasteen toukilla kahdesti päivässä arkipäivisin ja kerran päivässä viikonloppuisin alkaen päivästä 8 hedelmöittymisen jälkeen. Toukkien ruokinnan on oltava yhdenmukaista jokaisessa testiastiassa, ja sen on mahdollistettava testieläinten asianmukainen kasvu ja kehitys. Näin varmistetaan testintulosten toistettavuus ja siirrettävyys: 1) kontrolleissa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajan on oltava ≤ 45 päivää ja 2) ja kontrolleissa suositeltavan keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulisi olla 1,0 ± 0,2 g.

Juveniilien ruokinta

34. Kun muodonvaihdos on tapahtunut, ruokavalio koostuu laadukkaasta uppoavasta sammakonruoasta (esim. Sinking Frog Food -3/32, Xenopus Express, FL, Yhdysvallat) (lisäys 4). Sammakonpoikasille (varhaisvaiheen juveniileille) pelletit jauhetaan nopeasti kahvimyllyssä tai tehosekoittimessa tai murskataan huhmareessa survimella niiden koon pienentämiseksi. Kun juveniilit ovat tarpeeksi isoja voidakseen syödä kokonaisia pellettejä, jauhaminen tai murskaaminen ei ole enää tarpeen. Eläimiä tulee ruokkia kerran päivässä. Juveniilien ruokinnan on mahdollistettava eläinten asianmukainen kasvu ja kehitys: testin päättyessä kontrollien juveniilien suositeltava keskimääräinen paino on 11,5 ± 3 g.

Analyyttinen kemia

35. Ennen testin aloittamista testikemikaalin stabiilisuus (ts. liukoisuus, hajoavuus ja haihtuvuus) ja kaikki analyysimenetelmät on määritettävä esimerkiksi saatavilla olevien tietojen tai tietämyksen perusteella. Laimennusvettä annosteltaessa on suositeltavaa analysoida jokaisen rinnakkaisnäytesäiliön testiliuos ennen testin aloittamista järjestelmän toimintakyvyn varmistamiseksi. Altistusjaksolla testikemikaalin pitoisuudet määritetään säännöllisin väliajoin, mieluiten joka viikko vähintään yhdestä jokaisen käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteestä siten, että saman käsittelyryhmän rinnakkaisnäytteissä vuorotellaan joka viikko. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos testikemikaalin pitoisuus liuoksessa on kuitenkin hyväksyttävästi ± 20 prosenttia nimellispitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää joko nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia. Myös mitattujen testipitoisuuksien variaatiokertoimen (CV) on oltava 20 prosenttia tai vähemmän koko testin ajan tietyn käsittelyn jokaisen pitoisuuden osalta. Jos mitatut pitoisuudet eivät ole 80–120 prosenttia nimellispitoisuudesta (esimerkiksi testattaessa nopeasti biohajoavia tai adsorptiivisia kemikaaleja), vaikuttavat pitoisuudet on määritettävä ja ilmoitettava suhteessa läpivirtaustestien aritmeettiseen keskiarvopitoisuuteen.

▼M8

36. Laimennusveden ja varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava sopivin väliajoin (esim. kolme kertaa viikossa) altistuksen koko keston ajan. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joita ei voida havaita kokonaan tai lainkaan nimellispitoisuuksina (esim. koska ne hajoavat tai adsorpoituvat testiastioissa nopeasti tai koska ne selvästi kertyvät altistettujen eläimien ruumiisiin), on suositeltavaa mukauttaa jokaisen kammion testiliuoksen vaihtumisnopeus siten, että testipitoisuudet saadaan pidettyä mahdollisimman vakioina.

Havainnot ja päätetapahtumien mittaukset

37. Altistumisen aikana arvioidaan päätetapahtumia, jotka viittaavat toksisuuteen (kuolleisuus, epänormaali käyttäytyminen, kuten sairauden ja/tai yleistyneen toksisuuden kliiniset merkit), ja kasvuparametreja (pituus ja paino). Lisäksi arvioidaan patologisia päätetapahtumia, jotka voivat liittyä sekä yleistyneeseen toksisuuteen että endokriinisiin vaikutustapoihin, jotka kohdistuvat estrogeeni-, androgeeni- tai kilpirauhasvälitteisiin reitteihin. Testin päättyessä voidaan lisäksi mitata plasman VTG-pitoisuus valinnaisesti. VTG:n mittaamisesta voi olla hyötyä tutkimustulosten ymmärtämisessä oletettujen hormonaalisten haitta-aineiden endokriinisten vaikutusmekanismien kannalta. Yhteenveto päätetapahtumista ja mittausajankohdista on taulukossa 1.

Taulukko 1

Yhteenveto LAGDA-testin päätetapahtumista

Päätetapahtumat (*)	Päivittäin	Välinäytteenotto (toukat)	Testin päättyessä (juveniilit)
Kuolleisuus ja poikkeavuudet	X		
Aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen		X	
Histo(pato)logia (kilpirauhanen)		X	
Morfometriikka (kasvu painon ja pituuden perusteella)		X	X
Maksan somaattinen indeksi (LSI)			X
Geneettisen/fenotyyppisen sukupuolen suhde			X
Histopatologia (sukurauhaset, lisääntymiselimet, munuaiset ja maksa)			X
Vitellogeniini (VTG) (valinnainen)			XX

(*) Kaikki päätetapahtumat analysoidaan tilastollisesti.

Kuolleisuus ja päivittäiset havainnot

38. Kaikki testisäiliöt on tarkastettava päivittäin kuolleiden eläinten varalta, ja kuolleiden määrä on kirjattava muistiin jokaisesta säiliöstä. Kuolleet eläimet on poistettava testisäiliöstä heti, kun ne havaitaan. Kuolleiden eläinten kehitysvaihe on luokiteltava joko NF-vaihetta 58 edeltäväksi (ennen eturaajan kehittymistä), NF-vaiheiden 58 ja 62 väliseksi, NF-vaiheen 63 ja 66 väliseksi (NF-vaiheen 62 ja pyrstön täydellisen surkastumisen välillä) tai NF-vaiheen 66 jälkeiseksi (toukkavaiheen jälkeinen vaihe). Jos kuolleisuus on yli 20 prosenttia, se saattaa olla merkki epätarkoituksenmukaisista testiolosuhteista

▼M8

tai testikemikaalin selvistä toksisista vaikutuksista. Eläimet ovat yleensä herkimpiä muista kuin kemikaaleista johtuville kuolleisuustapahtumille kehityksen muutaman ensimmäisen päivän aikana kudun jälkeen ja muodonvaihdoksen huippukohdan aikana. Tällainen kuolleisuus voi käydä selvästi ilmi kontrolliaineistosta.

39. Myös mahdolliset havainnot epänormaalista käyttäytymisestä, selvästi nähtävistä epämuodostumista (esim. skolioosi) tai leesioista on kirjattava. Skolioosihavainnot on laskettava (ilmaantuvuus) ja niiden vakavuus on arvioitava (esim. merkityksetön – 0, vähäinen – 1, kohtalainen – 2, vaikea – 3; lisäys 8). On pyrittävä varmistamaan, että kohtalaisen ja vaikean skolioosin esiintyvyys on vähäistä (esim. alle 10 prosenttia kontrolleissa) koko tutkimuksessa, joskaan se, että kontrolleissa esiintyy enemmän poikkeavuuksia, ei välttämättä ole syy lopettaa testiä. Vesikolonnissa olevien toukkavaiheen eläinten käyttäytyminen on normaalia, kun niiden pyrstö on päätä korkeammalla, niiden peräevän liike on säännöllisen rytmikästä, ne tulevat ajoittain pintaan, niiden kiduskannet toimivat ja ne reagoivat ärsykkeisiin. Epänormaalia käyttäytymistä on esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjassa makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen ja ärsykkeisiin reagoimattomuus. Muodonvaihdoksen tehneiden eläinten osalta on edellä mainitun epänormaalin käyttäytymisen lisäksi kirjattava myös selvät erot ravinnon kulutuksessa käsittelyjen välillä. Selviä epämuodostumia ja leesioita voivat olla esimerkiksi morfologiset poikkeamat (esimerkiksi raajojen epämuodostumat), vatsan turvotus, verta vuotavat leesiot sekä bakteeri- tai sieni-infektiot. Juveniilien päässä heti sierainten takana olevat leesiot voivat olla merkki riittämättömästä kosteudesta. Nämä määritykset ovat laadullisia, ja ne on rinnastettava sairaudesta/stressistä kertoviin kliinisiin merkkeihin kontrollieläimiin vertaamalla. Jos näitä merkkejä esiintyy altistussäiliöissä enemmän kuin kontrollisäiliöissä, niitä on pidettävä osoituksena selvästä toksisuudesta.

Osaotos toukista

Osaotos toukista pääpiirteissään

40. NF-vaiheen 62 saavuttaneet sammakonpoikaset on otettava pois säiliöistä, ja niistä on joko otettava näytteet tai ne on siirrettävä altistuksen seuraavaan osaan uuteen säiliöön, tai ne on erotettava muista samassa säiliössä olevista sammakonpoikasista fyysisesti väliseinällä. Sammakonpoikaset tarkastetaan päivittäin, ja tutkimuksen se päivä, jona yksi sammakonpoikanen saavuttaa NF-vaiheen 62, kirjataan muistiin. Määräävä ominaisuus, jota tässä arvioinnissa käytetään, on pään muoto. Kun pään koko on pienentynyt siinä määrin, että se on silmämääräisesti yhtä leveä kuin sammakonpoikasen muu ruumis, ja kun eturaaja on sydämen keskipisteen tasolla, kyseisen yksilön katsotaan saavuttaneen NF-vaiheen 62.

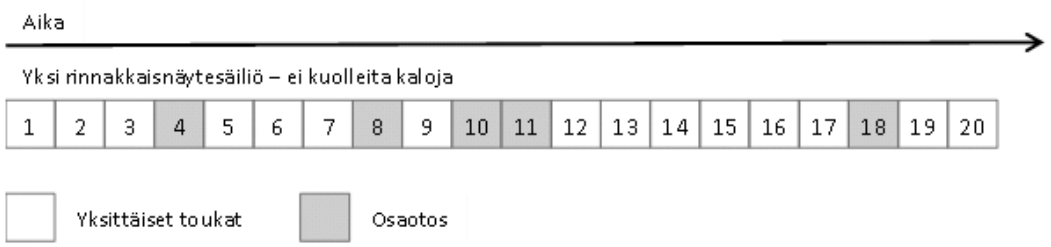
41. Tavoitteena on ottaa näytteet yhteensä viidestä NF-vaiheen 62 saavuttaneesta sammakonpoikasesta yhtä rinnakkaisnäytesäiliötä kohti. Tämä tulee tehdä täysin satunnaisesti, mutta siitä on päätettävä etukäteen. Hypoteettinen esimerkki rinnakkaisnäytesäiliöstä on **kuvassa 1**. Jos tietyssä säiliössä on 20 elossa olevaa sammakonpoikasta, kun ensimmäinen yksilö saavuttaa NF-vaiheen 62, väliltä 1–20 on valittava viisi satunnaista numeroa. Sammakonpoikanen nro 1 on ensimmäinen yksilö, joka saavutti NF-vaiheen 62, ja sammakonpoikanen nro 20 on säiliön viimeinen yksilö, joka saavutti tämän vaiheen. Jos säiliössä on 18 elossa olevaa toukkaa, nämä viisi satunnaista numeroa valitaan väliltä 1–18. Tämä on tehtävä jokaiselle rinnakkaisnäytesäiliölle, kun testin ensimmäinen yksilö saavuttaa NF-vaiheen 62. Jos NF-vaiheen 62 näytteenoton aikana havaitaan kuolleita yksilöitä, loput näytteet on satunnaistettava uudelleen sen mukaan, montako toukkaa ei vielä ole NF-vaiheessa 62 ja montako lisänäytettä tarvitaan, jotta kyseisestä rinnakkaisnäytteestä saadaan yhteensä viisi näytettä. Sinä päivänä, jona yksi sammakonpoikanen saavuttaa

▼**M8**

NF-vaiheen 62, katsotaan tehdystä näytteenottokaaviosta, käytetäänkö tätä yksilöä näytteenotossa vai erotetaanko se fyysisesti muista sammakonpoikasista altistuksen jatkuessa. Annetussa esimerkissä (kuva 1) ensimmäinen NF-vaiheen 62 saavuttanut yksilö (ts. laatikko nro 1) erotetaan muista poikasista fyysisesti, sen altistusta jatketaan ja päivä, jona tämä yksilö saavutti NF-vaiheen 62, kirjataan. Yksilöitä nro 2 ja 3 käsitellään samalla tavalla kuin yksilöä nro 1. Yksilöltä nro 4 otetaan näytteet kasvua ja kilpirauhasen histologiaa varten (tässä esimerkissä). Tätä menettelyä jatketaan, kunnes 20. yksilö joko liittyy muihin NF-vaiheen 62 jälkeisessä vaiheessa oleviin yksilöihin tai sitä käytetään näytteenotossa. Tässä on käytettävä sellaista satunnaistamismenetelmää, että jokaisella testin organismilla on yhtäläinen todennäköisyys tulla valituksi. Tämä voidaan saavuttaa millä tahansa satunnaistavalla menetelmällä, mutta se edellyttää myös, että jokainen sammakonpoikanen joutuu haaviin jossakin kohtaa NF-vaiheen 62 osaotosjaksoa.

Kuva 1

Hypoteettinen esimerkki NF-vaiheen 62 näytteenotosta yhdestä rinnakkaisnäytesäiliöstä



42. Toukkaosaotoksesta tutkitaan seuraavat päätetapahtumat: 1) NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika (ts. hedelmöittymisen ja NF-vaiheen 62 välisten päivien lukumäärä), 2) ulkoiset poikkeavuudet, 3) morfometriikka (paino ja pituus) ja 4) kilpirauhasen histologia.

Sammakonpoikasten humaani lopettaminen

43. NF-vaiheen 62 saavuttaneista sammakonpoikasista (5 yksilöä rinnakkaisnäytesäiliötä kohti) koostuva osajoukko on lopetettava upottamalla ne 30 minuutiksi riittävään määrään (esim. 500 ml:aan) nukutusliuosta (esim. 0,3-prosenttinen MS-222-liuos, trikaiinimetaanisulfonaatti, CAS-nro 886-86-2). MS-222-liuos pitää puskuroida natriumbikarbonaatilla siten, että sen pH on noin 7,0, koska puskuroimaton MS-222-liuos on hapanta ja ärsyttää sammakon ihoa, jolloin se imeytyy huonosti ja aiheuttaa eläimille tarpeetonta lisästressiä.

44. Sammakonpoikanen nostetaan testikammiosta haavilla ja siirretään (asetetaan) lopetusliuokseen. Eläin on varmasti kuollut ja valmis ruumiinavaukseen, kun se ei reagoi ulkoisiin ärsykkeisiin, kuten takaraajan nipistämiseen pinseteillä.

Morfometriikka (paino ja pituus)

45. Jokaiselta sammakonpoikaselta on punnittava märkäpaino (pyöristys lähimpään milligrammaan) ja mitattava kuonon ja peräaukon välinen pituus (pyöristys lähimpään 0,1 mm:iin) heti, kun sen todetaan olevan reagoimaton nukutusliuoskäsittelyn jälkeen (kuva 2a). Kuonon ja peräaukon välinen pituus

▼M8

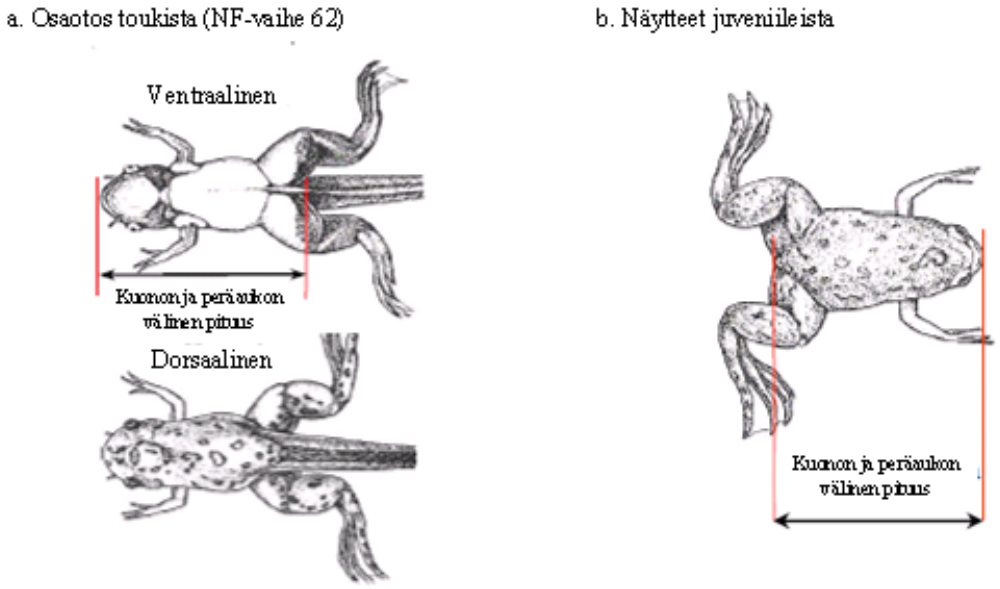
voidaan mitata myös valokuvasta kuvien analysointiohjelmalla. Ennen punnitsemista sammakonpoikasista on poistettava liiallinen vesi taputtelemalla ne kuiviksi. Kun koon mittaus (paino ja kuonon ja peräaukon välinen pituus) on tehty, kaikki selvät morfologiset poikkeamat ja/tai toksisuuden kliiniset merkit, kuten skolioosi (ks. lisäys 8), petekiat ja verenpurkaumat, on tallennettava tai kirjattava, ja digitaalista dokumentointia suositellaan. Petekiat ovat pieniä punaisia tai violetteja verenpurkaumia ihon hiussuonissa.

Kudosnäytteiden ottaminen ja kiinnittäminen

46. Osaotoksen toukkien kilpirauhasille tehdään histologinen arviointi. Eturaajojen jälkeinen alaruumis irrotetaan ja hävitetään. Siistitty muu osa ruumiista kiinnitetään Davidsonin kiinnitysaineella. Kiinnitysaineen tilavuuden säiliössä on oltava vähintään 10-kertainen kudosten arvioituun tilavuuteen nähden. Jotta tutkittavat kudokset kiinnittyvät asianmukaisesti, kiinnitysainetta sisältävää astiaa on sekoitettava tai ravistettava sopivalla tavalla. Kaikkia kudoksia pidetään Davidsonin kiinnitysaineessa vähintään 48 mutta enintään 96 tuntia, minkä jälkeen ne huuhdellaan deionisoidulla vedellä ja säilötään 10-prosenttiseen puskuroituun formaliiniin (1) (29).

Kilpirauhasen histologia

47. Kunkin osaotokseen valitun toukan (kudokset kiinnitetty) kilpirauhanen tutkitaan histologisesti (diagnostinen ja vakavuusasteen arviointi) (29) (30).



Kuva 2: Kuonon ja peräaukon välisen pituuden mittauspisteet LAGDA-testissä NF-vaiheessa 62 (a) ja nuorilta sammakoilta (b). NF-vaiheen 62 määräävät ominaisuudet (a): Pää on yhtä leveä kuin muu ruumis, hajuhermon pituus on lyhyempi kuin hajurauhasen läpimitta (dorsaalisesti katsottuna), ja eturaajat ovat sydämen tasolla (ventraalisesti katsottuna). Kuvat muokattu teoksesta Nieuwkoop ja Faber (1994).

Toukkien altistuksen päättäminen

48. Kun otetaan huomioon sammakonpoikasten alkuperäinen määrä, on odotettavissa, että on todennäköisesti pieni prosenttiosuus yksilöitä, jotka eivät kehity normaalisti ja joiden osalta muodonvaihdos (NF-vaihe 66) ei tapahdu

▼M8

kokonaan kohtuullisen ajan kuluessa. Toukkavaiheen altistus saa kestää enintään 70 päivää. Kaikki tämän ajan jälkeen elossa olevat sammakonpoikaset on lopetettava (ks. 43 kohta). Niiltä on punnittava paino ja mitattava kuonon ja peräaukon välinen pituus. Lisäksi niiden kehitysvaihe on määritettävä Nieuwkoopin ja Faberin (1994) mukaisesti, ja mahdolliset kehitykselliset poikkeavuudet on merkittävä muistiin.

Karsinta NF-vaiheen 66 jälkeen

49. Jokaisesta säiliöstä kymmenen yksilön on jatkettava testiä NF-vaiheen 66 (pyrstön surkastuminen kokonaan) jälkeen altistuksen päättymiseen saakka. Siksi on tehtävä karsinta sen jälkeen, kun kaikki eläimet ovat saavuttaneet NF-vaiheen 66 tai kun 70 päivää on kulunut (sen mukaan, kumpi tapahtuu ensin). NF-vaiheen 66 jälkeiset eläimet, joiden altistusta ei jatketa, on valittava satunnaisesti.

50. Eläimet, joita ei valita altistuksen jatkamiseen, lopetetaan (ks. 43 kohta). Jokaisesta eläimestä määritetään kehitysvaihe, punnitaan märkäpaino ja mitataan kuonon ja peräaukon välinen pituus (kuva 2b), ja niille tehdään ruumiinavaus. Fenotyyppiseksi sukupuoleksi (sukurauhasten morfologian perusteella) kirjataan naaras, koiras tai määrittämätön.

Näytteenotto juveniileista

Näytteenotto juveniileista pääpiirteissään

51. Loppujen eläinten osalta altistusta jatketaan siihen saakka, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta laimennusvesikontrollissa (ja/tai liuotinkontrollissa, jos tarpeen). Altistusjakson päättyessä loput eläimet (enintään 10 sammakkoa rinnakkaisnäytettä kohti) lopetetaan, ja seuraavat päätetapahtumat mitataan tai arvioidaan ja niiden tiedot kirjataan: 1) morfometriikka (paino ja pituus), 2) fenotyyppisen/genotyyppisen sukupuolen suhde, 3) maksan paino (maksan somaattinen indeksi), 4) histopatologia (sukurauhaset, lisääntymiselimet, maksa ja munuaiset) ja valinnaisena 5) plasman VTG-pitoisuus.

Sammakoiden humaani lopettaminen

52. Juveniilit eläimet (muodonvaihdoksen tehneet sammakot) lopetetaan antamalla niille intraperitoneaalinen injektio nukutusainetta (esim. 10-prosenttinen MS-222) asianmukaisessa fosfaattipuskuroidussa liuoksessa. Sammakoilta voidaan ottaa näytteet, kun niistä on tullut reagoimattomia (yleensä noin kahden minuutin kuluttua injektiosta, jos 10-prosenttista MS-222-ainetta käytetään annoksella 0,01 ml/g sammakkoa kohden). Vaikka juveniilit sammakot voidaan upottaa pitoisuudeltaan voimakkaaseen nukutusaineeseen (MS-222), kokemus on osoittanut, että niiden lopettaminen tällä tavalla kestää kauemmin, ja sen kesto voi olla epätarkoituksenmukaista näytteenoton kannalta. Injektio on tehokas ja nopea lopettamiskeino ennen näytteenottoa. Näytteenottoa ei saa aloittaa, ennen kuin sammakoiden reagoimattomuus on varmistettu, jotta on varmaa, että ne ovat kuolleet. Jos sammakoissa on merkkejä huomattavasta kärsimyksestä (hyvin vakavasta ja kuolemaa selvästi ennakoivasta) ja jos ne ovat kuolemaisillaan, ne on nukutettava ja lopetettava. Aineiston analyysissa niitä on käsiteltävänä kuolemantapauksina. Jos sammakko lopetetaan sairauden vuoksi, se on merkittävä muistiin ja raportoitava. Sen mukaan, missä vaiheessa tutkimusta sammakko lopetetaan, se voidaan säilyttää histopatologista analyysia varten (jolloin se käsitellään kiinnitysaineella mahdollista histopatologista tutkimusta varten).

Morfometriikka (paino ja pituus)

53. Märkäpaino punnitaan ja kuonon ja peräaukon välinen pituus (kuva 2b) mitataan samalla tavalla kuin toukkaosaotoksessa.

▼M8

Plasman VTG-pitoisuus (valinnainen)

54. VTG on laajalti hyväksytty biomarkkeri, joka on seurausta estrogeenisille kemikaaleille altistumisesta. LAGDA-testissä plasman VTG-pitoisuus voidaan mitata juveniilinäytteistä valinnaisesti (tällä voi olla erityistä merkitystä silloin, jos testikemikaalin oletetaan olevan estrogeenin tavoin vaikuttava).

55. Lopetetun juveniilin takaraajat leikataan ja verinäyte kerätään heparinisoituun kapillaariin (myös muita verenkeruumenetelmiä, kuten sydänpunktiota, voidaan käyttää). Veri siirretään mikrosentrifugiputkeen (tilavuus noin 1,5 ml), joka sentrifugoidaan plasman erottelemiseksi. Plasmanäytteet on säilytettävä -70 °C:ssa tai sitä kylmemmässä VTG-pitoisuuden määrittämiseen asti. Plasman VTG-pitoisuus voidaan mitata entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA) (lisäys 6) tai muulla menetelmällä, esimerkiksi massaspektrometrialla (31). Lajikohtaisten vasta-aineiden käyttöä suositellaan paremman herkkyyden vuoksi.

Geneettisen sukupuolen määrittäminen

56. Jokaisen juveniilin sammakon geneettinen sukupuoli määritetään Yoshimoton ja muiden (11) kehittämien markkereiden perusteella. Geneettisen sukupuolen määrittämistä varten otetaan osa yhdestä dissektion aikana irrotetusta takaraajasta (tai koko raaja) (tai osa muusta kudoksesta) ja laitetaan se mikrosentrifugiputkeen (sammakoiden kudosnäytteet voidaan ottaa mistä tahansa kudoksesta). Kudosta voidaan säilyttää – 20 °C:ssa tai sitä kylmemmässä deoksiribonukleiihinapon (DNA) eristämiseen saakka. DNA voidaan eristää kudoksista kaupallisesti saatavilla olevilla tarvikepaketeilla, ja markkerin olemassaolo tai puuttuminen analysoidaan polymeraasiketjureaktio (PCR) -menetelmällä (lisäys 5). Yleensä histologisen sukupuolen ja genotyypin välinen vastaavuus kontrollieläimillä juveniilivaiheen näytteenotossa kontrolliryhmissä on yli 95 prosenttia.

Kudosnäytteiden ottaminen ja kiinnittäminen histopatologisia tutkimuksia varten

57. Sukurauhaset, sukujohtimet, munuaiset ja maksat irrotetaan histologista analyysia varten lopullisessa näytteenotossa. Eläimen vatsaontelo avataan, ja maksa irrotetaan ja punnitaan. Seuraavaksi poistetaan ruoansulatuselimet (maha, suolet) varovasti vatsan alaosasta, jotta sukurauhaset, munuaiset ja sukujohtimet saadaan näkyviin. Sukurauhasten mahdolliset selvät morfologiset poikkeavuudet on kirjattava muistiin. Lopuksi on irrotettava vielä takaraajat, ellei niitä ole irrotettu jo aiemmin verinäytettä varten. Irrotetut maksat ja ruumiit, joihin sukurauhaset on jätetty paikalleen, on laitettava heti Davidsonin kiinnitysaineeseen. Kiinnitysaineen tilavuuden säiliössä on oltava vähintään 10-kertainen kudosten arvioituun tilavuuteen nähden. Kaikkia kudoksia pidetään Davidsonin kiinnitysaineessa vähintään 48 mutta enintään 96 tuntia, minkä jälkeen ne huuhdellaan deionisoidulla vedellä ja säilötään 10-prosenttiseen puskuroituun formaliiniin (1) (29).

Histopatologia

58. Jokaiselle juveniilinäytteelle tehdään sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksakudoksen histopatologinen tutkimus (diagnoosi ja vaikeusasteen määritys) (32). Tämän tutkimuksen perusteella johdetaan myös sukurauhasten fenotyyppi (ts. munasarjat, kivekset, intersukupuolisuus), ja näitä havaintoja voidaan geneettisen sukupuolen yksilöllisten määritysten kanssa käyttää fenotyyppisten/genotyyppisten sukupuolten suhteen laskemiseen.

▼M8

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tilastoanalyysi

59. LAGDA-testistä saadaan kolmenlaisia tietoja, jotka voidaan analysoida tilastollisesti: 1) kvantitatiiviset jatkuvat tiedot (paino, kuonon ja peräaukon välinen pituus, maksan somaattinen indeksi, VTG), 2) tiettyyn tapahtumaan kulunut aika (time to event) kehitysnopeuden arviointia varten (esim. NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kuluneiden päivien määrä testin aloittamisesta) ja 3) histopatologisiin tutkimuksiin perustuvia numerotietoja poikkeavuuksien vaikeusasteista tai kehitysvaiheista.

60. Testin rakenteen ja tilastollisten testien valinnan tulisi mahdollistaa riittävä voima, jotta havaitaan biologisesti tärkeät muutokset sellaisissa päätetapahtumissa, joista on ilmoitettava NOEC- tai ECx-arvo. Aineiston tilastollisissa analyyseissa (yleensä rinnakkaisnäytteiden keskiarvon perusteella) on noudatettava mieluiten menettelyjä, jotka on kuvattu julkaisussa Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application (33). Tämän testimenetelmän lisäyksessä 4 on suositeltua tilastoanalyysia kuvaava päätöksentekokaavio ja ohjeet aineiston käsittelystä sekä sopivimman tilastollisen testin tai mallin valinnasta LAGDA-testissä.

61. Juveniilien näytteenotosta saadut tiedot (esim. kasvu, maksan somaattinen indeksi) on analysoitava kummankin genotyyppisen sukupuolen osalta erikseen, koska se määritetään kaikilta sammakoilta.

Tietojen analysointiin liittyviä näkökohtia

Vaarantuneiden rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen käyttö

62. Rinnakkaisnäytteet ja käsittelyt voivat vaarantua selvästä toksisuudesta johtuvan liiallisen kuolleisuuden, sairauksien tai teknisen virheen vuoksi. Jos käsittely vaarantuu sairauden tai teknisen virheen vuoksi, analyysia varten on oltava kolme vaarantumatonta käsittelyä ja kolme vaarantumatonta rinnakkaisnäytettä. Jos selvää toksisuutta ilmenee suurten pitoisuuksien yhteydessä, analyysia varten on oltava mieluiten vähintään kolme käsittelypitoisuutta ja kolme vaarantumatonta rinnakkaisnäytettä (OECD:n testiohjeissa noudatettavan suurin siedetty pitoisuus -lähestymistavan mukaisesti (34)). Kuolleisuuden lisäksi selvän toksisuuden merkkejä voivat olla käyttäytymiseen kohdistuvat vaikutukset (esimerkiksi pinnalla kelluminen, säiliön pohjalla makaaminen, käänteinen tai epäsäännöllinen uiminen, pintatoiminnan puuttuminen), morfologiset leesiot (esim. vertavuotavat leesiot, vatsan turvotus) tai normaalin ruokintavasteen estyminen, kun sitä verrataan laadullisesti kontrollieläimiin.

Liuotinkontrolli

63. Testin lopuksi on arvioitava liuottimen mahdolliset vaikutukset (jos sitä on käytetty). Tämä tehdään vertailemalla liuotinkontrolliryhmää ja laimennusvesikontrolliryhmää tilastollisesti. Tärkeimmät tässä analyysissa huomioon otettavat päätetapahtumat ovat kasvuparametrit (paino ja pituus), koska yleistyneet toksisuusvaikutukset saattavat vaikuttaa niihin. Jos laimennusvesikontrollin ja liuotinkontrollin ryhmien välillä havaitaan tilastollisesti merkitseviä eroja näissä päätetapahtumissa, sen määrittämisessä, onko testin validiteetti vaarantunut, on käytettävä parasta tieteellistä asiantuntemusta. Jos kahden kontrollin välillä on eroja, kemikaalille altistettuja käsittelyjä on verrattava liuotinkontrolliin, ellei tiedetä, että laimennusvesikontrolliin vertaaminen on parempi vaihtoehto. Jos näiden kahden kontrolliryhmän välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, suositellaan, että testikemikaalille altistettuja käsittelyjä verrataan yhdistettyihin (liuotin- ja laimennusvesi-)kontrolliryhmiin, ellei tiedetä, että vain jompaankumpaan vertaaminen on parempi vaihtoehto.

▼M8

Testiraportti

64. Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä

— Yhdestä ainesosasta koostuva aine:

ulkonäkö, vesiliukoisuus ja muut merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

kemialliset tunnistetiedot, kuten IUPAC- tai CAS-nimi, CAS-numero, SMILES- tai InChI-koodi, rakennekaava, puhtaus, tarvittaessa epäpuhtauksien kemialliset tunnistetiedot sen mukaan kuin käytännössä on mahdollista jne. (tarvittaessa esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus).

— Useista ainesosista koostuvat aineet, UVCB-aineet ja seokset:

mahdollisimman tarkka luonnehdinta, esimerkiksi ainesosien kemiallinen koostumus (ks. edellä), esiintymistiheys ja olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet.

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta (jos se tiedetään), hedelmöittyneiden munien lähde ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

— Tiedot skolioosin ilmaantuvuudesta aikaisemmissa kontrolleissa käytetyn varastoviljelmän osalta.

Testiolosuhteet:

— valoisa aikajakso (valoisat aikajaksot)

— testin rakenne (esimerkiksi kammion koko, materiaali ja veden määrä, testikammioiden ja rinnakkaisnäytteiden lukumäärä, testiorganismien määrä rinnakkaisnäytettä kohti)

— varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtoväli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)

— testikemikaalin annostelumenetelmä (esim. pumput, laimennusjärjestelmät)

— menetelmän saantoteho ja nimelliset testipitoisuudet, kvantifiointiraja, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset koskevat testikemikaalin pitoisuutta aidossa liuoksessa

— laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), kokonaisjodipitoisuus, orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä (jos se on mitattu), suspendoituneet kiinteät aineet (jos ne on mitattu), testimediumin suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja mahdolliset muut mittaukset

— nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja keskihajonnat

— testiastioissa olevan veden laatu, pH, lämpötila (päivittäin) ja liuenneen hapen pitoisuus

▼M8

— yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. ruoan tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotiheys).

Tulokset:

— todisteet siitä, että kontrollit täyttävät yleiset validiteettikriteerit

— seuraavat tiedot kontrolleista (myös liuotinkontrollista, jos sitä on käytetty) ja käsittelyryhmistä: havaittu kuolleisuus ja poikkeavuus, NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika, kilpirauhasen histologisen tutkimuksen tiedot (vain toukkanäytteistä), kasvu (paino ja pituus), maksan somaattinen indeksi (vain juveniilinäytteistä), geneettisen/fenotyyppisen sukupuolen suhde (vain juveniilinäytteistä), sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksan histopatologisen tutkimuksen tulokset (vain juveniilinäytteistä) ja plasman VTG-pitoisuus (vain juveniilinäytteistä, jos VTG-näyte on otettu)

— tilastollisessa analyysissa ja tietojen käsittelyssä sovellettu lähestymistapa (käytetty tilastollinen testi tai malli)

— pitoisuus, josta ei aiheudu vaikutuksia (NOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä

— pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus (LOEC) kunkin arvioidun vasteen yhteydessä ($\alpha = 0{,}05$) tarvittaessa ECx kullekin arvioidulle vasteelle ja luottamusvälit (esim. 95 prosenttia) sekä kaavio sen laskentaan käytetystä sovitetusta mallista, pitoisuus-vastekäyrän kaltevuus, regressiomallin kaava, estimoidut malliparametrit ja niiden vakiovirheet

— mahdolliset poikkeamat tästä testimenetelmästä ja hyväksymisperusteista sekä pohdinta niiden mahdollisista vaikutuksista testin tulokseen.

65. Päätetapahtumien mittaustuloksista on esitettävä keskiarvot ja keskihajonnat (sekä rinnakkaisnäytteiden että pitoisuuksien perusteella, mikäli mahdollista).

66. NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut mediaani aika on laskettava ja esitettävä rinnakkaisnäytteiden mediaanien keskiarvona ja niiden keskihajontana. Käsittelyjen osalta myös käsittelyn keston mediaani on laskettava ja esitettävä rinnakkaisnäytteiden mediaanien keskiarvona ja niiden keskihajontana.

LÄHDEKIRJALLISUUS

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16–27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140–144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281–285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335–340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143–150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469–2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441–448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321–327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159–169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Tämän liitteen C.4 luku, Biohajoavuuden määritys.

(18) Tämän liitteen C.29 luku, Biohajoavuuden määritys – CO_2 suljetuissa astioissa (Headspace-testi).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539–551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593–9.

(21) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69–92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Tämän liitteen luku C.38, Sammakkoeläinten muodonvaihdostutkimus

(26) Tämän liitteen luku C.48, Kalojen lyhytaikainen lisääntymistutkimus

(27) Tämän liitteen luku C.41, Kalojen sukupuolikehitystä tutkiva testi

(28) Tämän liitteen luku C.49, Kalojen alkioilla tehtävä akuuttia toksisuutta koskeva testi (fet-testi)

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415–424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197–202.

▼**M8**

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Apikaalinen päätetapahtuma: Aiheuttaa vaikutuksen populaation tasolla.

Kemikaali: Aine tai seos

ELISA: Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys

ECx: (Effect concentration for x % effect = vaikuttava pitoisuus, joka aiheuttaa x prosenttia muutoksia) on pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin suuruisen vaikutuksen testiorganismeihin tietyn altistusjakson aikana kontrolliin verrattuna. Esimerkiksi EC50 on pitoisuus, jolla estimoidaan olevan 50 prosentin vaikutus testissä tutkittavaan päätetapahtumaan altistuksen kohteeksi joutuneessa populaatiossa määritellyn altistusajan kuluessa.

phj: Päivää hedelmöittymisen jälkeen

Läpivirtaustesti: Testi, jossa testiliuokset virtaavat jatkuvasti testijärjestelmän läpi altistusjakson ajan.

HPG-akseli: Hypotalamus-aivolisäke-sukurauhasakseli

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, kansainvälinen puhtaan ja sovelletun kemian liitto

LOEC: (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testikemikaalin testattu pitoisuus, jolla kemikaalilla havaitaan olevan tilastollisesti merkitsevä vaikutus (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kaikilla LOEC-pitoisuutta suuremmilla testipitoisuuksilla on kuitenkin oltava vähintään yhtä suuri haitallinen vaikutus kuin LOEC-pitoisuudella. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, on annettava tyhjentävä selitys siitä, miten LOEC-pitoisuus (ja myös NOEC-pitoisuus) on valittu. Tästä on ohjeita lisäyksessä 7.

Mediaani tappava pitoisuus (LC50): Testikemikaalin pitoisuus, jonka arvioidaan aiheuttavan 50 prosentin kuolleisuuden altistuneissa testiorganismeissa testin aikana.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ($p < 0,05$).

SMILES: SMILES-järjestelmä (Simplified Molecular Input Line Entry Specification).

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

UVCB: Koostumukseltaan tuntematon tai vaihteleva aine, kompleksi reaktiotuote tai biologinen materiaali.

VTG: Vitellogeniini on fosfolipoglykoproteiini, munankeltuaisproteiinin esiaste, jota tavataan yleensä kaikilla munimalla lisääntyvien lajien sukukypsillä naarailla.

▼**M8**

Lisäys 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISIA OMINAISUUKSIA

Aine	Rajapitoisuus
Hiukkaset	5 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
Jäännöskloori	10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
Alumiini	1 µg/l
Arseeni	1 µg/l
Kromi	1 µg/l
Koboltti	1 µg/l
Kupari	1 µg/l
Rauta	1 µg/l
Lyijy	1 µg/l
Nikkeli	1 µg/l
Sinkki	1 µg/l
Kadmium	100 ng/l
Elohopea	100 ng/l
Hopea	100 ng/l

▼**M8**

Lisäys 3

LAGDA-TESTIN TESTAUSOLOSUHTEET

1. Testilajit	*Xenopus laevis*
2. Testityyppi	Jatkuva läpivirtaus
3. Veden lämpötila	Nimellislämpötila on 21 °C. Keskimääräinen lämpötila testin keston ajan on 21 ± 1°C (rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 1,0 °C)
4. Valaistus	Loisteputket (laajakirjoiset) 600–2000 luksia (luumenia/m^2) veden pinnassa
5. Valojaksot	12 h valoisaa: 12 h pimeää
6. Testiliuoksen määrä ja testiastia (säiliö)	4–10 l (vedensyvyys vähintään 10–15 cm) Lasinen tai ruostumattomasta teräksestä valmistettu säiliö
7. Testiliuosten vaihtuvuus	Jatkuva, otettava huomioon sekä biologisten olosuhteiden ylläpito että kemikaalille altistus (esim. 5 vaihtoa päivässä)
8. Testiorganismien ikä testin alkaessa	Nieuwkoopin ja Faberin (NF) vaihe 8–10
9. Organismien lukumäärä kussakin rinnakkaisnäytteessä	20 eläintä (alkiota) / säiliö (rinnakkaisnäyte) altistuksen alkaessa ja 10 eläintä (juveniilia) / säiliö (rinnakkaisnäyte) NF-vaiheen 66 jälkeen altistuksen lopettamiseen asti
10. Käsittelyjen lukumäärä	Vähintään 4 testikemikaalikäsittelyä + tarvittava(t) kontrolli(t)
11. Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä kussakin käsittelyssä	4 rinnakkaisnäytettä testikemikaalikäsittelyä kohti ja 8 rinnakkaisnäytettä kontrollia (kontrolleja) kohti
12. Organismien lukumäärä testipitoisuutta kohti	Vähintään 80 eläintä testikemikaalikäsittelyä kohti ja vähintään 160 eläintä kontrollia (kontrolleja) kohti
13. Laimennusvesi	Mikä tahansa vesi, jossa *X. laevis* voi kasvaa ja kehittyä normaalisti (esim. lähdevesi tai aktiivihiilisuodatettu hanavesi)
14. Ilmastus	Ei tarvita, mutta säiliöt voidaan joutua ilmastamaan, jos liuenneen hapen pitoisuus pienenee suositellun rajan alle ja suurenee, kun testiliuoksen virtaus maksimoidaan.
15. Liuenneen hapen pitoisuus testiliuoksessa:	Liuennut happi: ≥ 40 % ilman kyllästysarvosta tai ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	Testiliuoksen pH-arvo	6,5–8,5 (rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla enintään 0,5)
17.	Testiliuoksen kovuus ja emäksisyys	10–250 mg $CaCO_3$/l
18.	Ruokinta	(Ks. lisäys 4)
19.	Altistusaika	NF-vaiheesta 8–10 siihen asti, kunnes on kulunut 10 viikkoa NF-vaiheen 62 saavuttamisen mediaaniajasta vesi- ja/tai liuotinkontrolliryhmässä (enintään 17 viikkoa)
20.	Biologiset päätetapahtumat	Kuolleisuus (ja havaitut poikkeavuudet), NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kulunut aika (toukkanäytteistä), kilpirauhasen histologisen tutkimuksen tiedot (toukkanäytteistä), kasvu (paino ja pituus), maksan somaattinen indeksi (juveniilinäytteistä), geneettisen/fenotyyppisen sukupuolen suhde (juveniilinäytteistä), sukurauhasten, sukujohtimien, munuaisten ja maksan histopatologia (juveniilinäytteistä) ja plasman vitellogeniinipitoisuus (juveniilinäytteistä, valinnainen)
21.	Testin validiteettikriteerit	Liuenneen hapen pitoisuuden on oltava > 40 % ilman kyllästysarvosta; veden lämpötilan on oltava 21 ± 1 °C, ja rinnakkaisnäytteiden ja käsittelyjen välinen ero saa olla < 1,0 °C; testiliuoksen pH-arvon on oltava 6,5–8,5; kontrolleissa kuolleisuuden on oltava ≤ 20 % kussakin rinnakkaisnäytteessä, ja kontrolleissa NF-vaiheen 62 saavuttamiseen kuluneen ajan on oltava keskimäärin ≤ 45 päivää; testiorganismien keskimääräisen painon NF-vaiheessa 62 tulee olla kontrolleissa ja liuotinkontrolleissa (jos käytössä) 1,0 ± 0,2 g ja testin lopettamisvaiheessa 11,5 ± 3 g; saatavilla on oltava tietoja, jotka osoittavat, että testikemikaalin pitoisuudet liuoksessa ovat olleet ± 20 prosenttia keskimääräisistä mitatuista arvoista.

▼M8

Lisäys 4

RUOKINTA

Vaikka suositellaan tällaista ruokintaa, myös muut vaihtoehdot ovat hyväksyttäviä, kunhan testiorganismit kasvavat ja kehittyvät asianmukaisesti.

Toukkien ruokinta

Toukkien ravinnon valmistus

A. 1:1 (v/v) lohien kasvatusravintoa: levä/TetraFin® (tai vastaava tuote);

1. lohien kasvatusravinto: 50 grammaa lohien kasvatusravintoa (pieniä rakeita tai jauhetta) ja 300 ml sopivaa suodatettua vettä sekoitetaan tehosekoittimen nopealla toiminnolla 20 sekunnin ajan

2. Levä/TetraFin® (tai vastaava tuote) -sekoitus: 12 g spirulina-levätabletteja ja 500 ml suodatettua vettä sekoitetaan tehosekoittimen nopealla toiminnolla 40 sekunnin ajan; 12 g Tetrafiniä® (tai vastaavaa tuotetta) ja 500 ml suodatettua vettä sekoitetaan, ja nämä sekoitukset yhdistetään, jolloin saadaan 1 litra sekoitusta, joka sisältää 12 g spirulina-levää ja 12 g Tetrafiniä® (tai vastaavaa tuotetta) litrassa.

3. Yhdistä yhtä suuret määrät sekoitettua lohien kasvatusravintoa ja levä-/TetraFin® (tai vastaava tuote) -sekoitusta.

B. Suolalehtijalkaiset:

15 ml suolalehtijalkaisten munia annetaan kuoriutua 1 litraan suolavettä (joka valmistetaan lisäämällä 20 ml NaCl:ää yhteen litraan deionisoitua vettä). Kun liuosta on ilmastettu 24 tuntia huoneenlämmössä jatkuvassa valossa, suolalehtijalkaiset kerätään. Niiden annetaan asettua 30 minuutin ajan lopettamalla ilmastus. Säiliön pinnalla kelluvat rakkulat kerätään pois ja hävitetään. Suolalehtijalkaiset kaadetaan asianmukaisten suodattimien läpi ja lisätään 30 ml:aan suodatettua vettä.

Ruokintasuunnitelma

Taulukossa 1 esitetään, minkä tyyppistä ja mikä määrä ravintoa annetaan altistuksen aikana toukkavaiheissa. Eläimiä on ruokittava kolmesti päivässä maanantaista perjantaihin ja kerran päivässä viikonloppuisin.

Taulukko 1

***X. laevis* -toukkien ruokinta läpivirtausolosuhteissa**

Aika (*) (hedelmöittymisen jälkeen)	Lohien kasvatusravinto: levä/TetraFin® (tai vastaava tuote)		Suolalehtijalkaiset	
	Arkipäivä (3 kertaa päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)	Arkipäivä (kahdesti päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)
Päivät 4–14 (viikoilla 0–1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (päivät 8–15) 1 ml (päivästä 16 alkaen)	0,5 ml (päivät 8–15) 1 ml (päivästä 16 alkaen)
Viikko 2	0,67 ml	2,4 ml		
Viikko 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Viikko 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Viikko 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Aika (*) (hedelmöittymisen jälkeen)	Lohien kasvatusravinto: levä/TetraFin® (tai vastaava tuote)		Suolalehtijalkaiset	
	Arkipäivä (3 kertaa päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)	Arkipäivä (kahdesti päivässä)	Viikonloppu (kerran päivässä)
Viikko 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Viikko 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Viikot 8–10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Päivä 0 on se päivä, jona hCG-injektio annetaan.

Ruokavalio siirryttäessä toukkavaiheesta juveniilivaiheeseen

Kun toukkien muodonvaihdos on valmis, niille aletaan antaa jäljempänä kuvattua juveniilien ravintoa. Tässä siirtymävaiheessa toukkien ravintoa on vähennettävä, koska juveniilien ravintomäärä lisääntyy. Tämä voidaan tehdä vähentämällä toukkien ravintoa ja lisäämällä juveniilien ravintoa suhteessa sen mukaan, miten kukin viiden sammakonpoikasen ryhmä ohittaa NF-vaiheen 62 ja miten niiden muodonvaihdos tulee valmiiksi NF-vaiheessa 66.

Juveniilien ruokinta

Juveniilien ravinto

Kun muodonvaihdos on valmis (vaihe 66), ravinnoksi vaihdetaan pelkästään 3/32 tuuman laadukas uppoava sammakonruoka (Xenopus Express™, FL, Yhdysvallat) tai vastaava tuote.

Murskattujen pellettien valmistaminen toukka- ja juveniilivaiheiden siirtymäkohdassa

Uppoavat sammakonruokapelletit laitetaan hetkeksi kahvimyllyyn, tehosekoittimeen tai huhmareeseen, jotta niiden kokoa saadaan pienennettyä noin kolmanneksen. Pellettejä ei tule kuitenkaan käsitellä niin kauan, että niistä tulee jauhetta.

Ruokintasuunnitelma

Taulukossa 2 esitetään, minkä tyyppistä ja mikä määrä ravintoa annetaan elinkaaren juveniili- ja aikuisvaiheissa. Eläimiä tulee ruokkia kerran päivässä. On kuitenkin muistettava, että kun eläimet tekevät muodonvaihdosta, suolalehtijalkaisten antamista jatketaan siihen asti, kunnes muodonvaihdos on valmis > 95 prosentilla eläimistä.

Eläimiä ei ruokita testin päättymispäivänä, jotta ravinto ei vaikuta painon punnitsemiseen.

Taulukko 2

***X. laevis* -juveniilien ruokinta läpivirtausolosuhteissa. Huom. Ne eläimet, joiden muodonvaihdos ei ole tapahtunut tai joilla se on viivästynyt kemikaalikäsittelyn takia, eivät voi syödä kokonaisia pellettejä**

Aika (*) (Viikkoa muodonvaihdoksen mediaanin päivän jälkeen)	Murskattujen pellettien määrä (mg/sammakko)	Kokonaisten pellettien määrä (mg/sammakko)
Kun eläinten muodonvaihdos on valmis	25	0
Viikot 0–1	25	28

▼**M8**

Aika (*) (Viikkoa muodonvaihdoksen mediaanin päivän jälkeen)	Murskattujen pellettien määrä (mg/sammakko)	Kokonaisten pellettien määrä (mg/sammakko)
Viikot 2–3	0	110
Viikot 4–5	0	165
Viikot 6–9	0	220

(*) Viikon 0 ensimmäinen päivä on kontrollieläinten muodonvaihdoksen mediaani päivä.

▼M8

Lisäys 5

GENEETTISEN SUKUPUOLEN MÄÄRITYS

Xenopus laeviksen geneettisen sukupuolen määrittämisen menetelmä perustuu julkaisuun Yoshimoto *ja muut.*, 2008. Yksityiskohtaiset genotyypitysmenettelyt voi katsoa tästä julkaisusta tarvittaessa. Vaihtoehtoisia menetelmiä (esim. suuren kapasiteetin qPCR) voidaan käyttää, jos ne katsotaan sopiviksi.

X. laeviksen alukkeet

DM-W-markkeri

Forward-aluke: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Reverse-aluke: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Positiivinen kontrolli

Forward-aluke: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Reverse-aluke: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

DNA:n puhdistaminen

Puhdista DNA lihas- tai ihokudoksesta käyttämällä esimerkiksi Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (luettelonro 69 506) -tarvikepakettia tai vastaavaa tuotetta paketin ohjeiden mukaisesti. DNA voidaan uuttaa spin-kolonneista käyttämällä vähemmän puskuria, jolloin saadaan konsentroituneempia näytteitä, jos se on tarpeen PCR:n osalta. DNA on melko vakaata, joten on toimittava varovasti, jotta vältetään ristikontaminaatio, joka voi johtaa siihen, että koiraat määritetään virheellisesti naaraiksi tai päinvastoin.

PCR

Taulukossa 1 kuvataan näyteprotokolla, jossa käytetään Sigman JumpStart™ *Taq* -polymeraasia

Taulukko 1

Näyteprotokolla, jossa käytetään Sigman JumpStart™ *Taq* -polymeraasia

Master mix -reaktioseokset	1x (µl)	[Lopullinen]
NFW (*)	11	-
10X-puskuri	2,0	-
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP:t (10 mM kutakin)	0,4	200 µM
Alukkeen merkkiaine (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev-alukkeen merkkiaine (8 µM)	0,8	0,3 µM
Alukkeen kontrolli (8 µM)	0,8	0,3 µM
Rev-alukkeen kontrolli (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 yksikköä/µl
DNA-templaatti	1,0	~ 200 pg/µl

(*) nukleaasiton vesi
Huom. Kun teet master mix -seoksia, tee aina hieman ylimääräistä, koska pipetoinnin aikana määrästä voi hävitä osa (esimerkki: 25x tulee käyttää vain 24 reaktioon).

▼**M8**

Reaktio:

Master mix	19,0 µl
Templaatti	1,0 µl
Yhteensä	20,0 µl

Termosyklerin profiili:

Vaihe 1.	94 °C	1 min
Vaihe 2.	94 °C	30 s
Vaihe 3.	60 °C	30 s
Vaihe 4.	72 °C	1 min
Vaihe 5.	Siirry vaiheeseen 2.	35 sykliä
Vaihe 6.	72 °C	1 min
Vaihe 7.	4 °C	pito

PCR-tuotteet voidaan ajaa heti geelissä tai säilyttää 4 °C:ssa.

Agaroosigeelielektroforeesi (3 %) (näyteprotokolla)

50X TAE

Tris	24,2 g
Jääetikka	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Lisää vettä 100 ml:aan asti

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1-agaroosi

3 osaa NuSieve™ GTG™ -agaroosia

1 osa Fisherin agaroosia, matala elektroendosmoosi (EEO)

Menetelmä

1. Valmista 3-prosenttinen geeli lisäämällä 1,2 g agaroosisekoitusta 43 ml:aan 1X TAE:ta. Sekoita hyvin, jotta suuret kokkareet hajoavat.

2. Kuumenna agaroosiseosta mikroaaltouunissa, kunnes se on liuennut kokonaan (mutta älä ylikuumenna sitä). Anna seoksen jäähtyä hetki.

3. Lisää siihen 1,0 µL etidiumbromidia (10 mg/ml). Ravista pulloa. Huomaa, että etidiumbromidi on mutageenista. Siksi tässä vaiheessa tulee käyttää vaihtoehtoisia kemikaaleja, mikäli se on teknisesti suinkin mahdollista, jotta työntekijöihin kohdistuvat terveysriskit olisivat mahdollisimman pienet ([1]).

4. Kaada geeli muottiin sopivan työkalun avulla. Anna geelin jäähtyä kunnolla.

([1]) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2004/37/EY, annettu 29 päivänä huhtikuuta 2004, työntekijöiden suojelemisesta syöpäsairauden vaaraa aiheuttaville tekijöille tai perimän muutoksia aiheuttaville aineille altistumiseen työssä liittyviltä vaaroilta (kuudes neuvoston direktiivin 89/391/ETY 16 artiklan 1 kohdassa tarkoitettu erityisdirektiivi) (EUVL L 158, 30.4.2004, s. 50), 4 artiklan 1 kohta.

▼**M8**

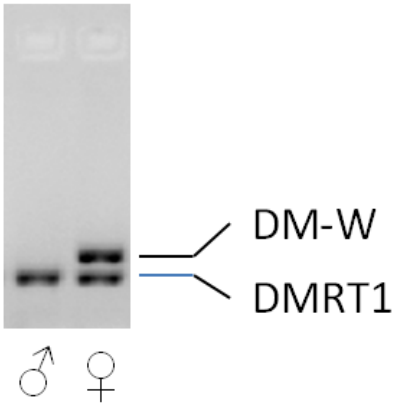
5. Lisää geeli laitteeseen. Peitä geeli 1X TAE:llä.

6. Lisää 1 µl 6x näytepuskuria aina 10 µl:aan PCR-tuotetta.

7. Pipetoi näytteet kuoppiin.

8. Käytä laitetta 160 V:n vakiojännitteellä noin 20 minuutin ajan.

Kuvassa 1 on agaroosigeelikuva, jossa näkyy koiras- ja naarasyksilöitä tarkoittavat juosteet.



Kuva 1: Agaroosigeelikuva, jossa näkyy koirasyksilöä (♂) tarkoittava juoste (yksi juoste ~203 bp: DMRT1) ja naarasyksilöä (♀) tarkoittava juoste (kaksi juostetta ~259 bp: DM-W ja 203 bp:DMRT1).

LÄHDEKIRJALLISUUS

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469–2474.

▼M8

Lisäys 6

VITELLOGENIININ MITTAUS

Vitellogeniinin (VTG) mittaus tehdään entsyymivälitteisellä immunosorbenttimääritys (ELISA) -menetelmällä, joka kehitettiin alun perin rasvapäämutun VTG:n mittaamiseen (Parks ja muut, 1999). Tällä hetkellä *X. laevikselle* ei ole kaupallisesti saatavia vasta-aineita. Koska tästä proteiinista on kuitenkin runsaasti tietoa ja koska kustannustehokkaita kaupallisia vasta-aineiden tuotantopalveluja on hyvin saatavilla, laboratoriot voivat kohtuullisen helposti kehittää ELISA-määrityksen tämän mittauksen tekemistä varten (Olmstead ja muut, 2009). Julkaisussa Olmstead ja muut (2009) kuvataan myös testi, joka on muokattu *X. tropicaliksen* VTG-mittausta varten (ks. jäljempänä). Menetelmässä käytetään *X. tropicaliksen* VTG:lle valmistettua vasta-ainetta, mutta sen tiedetään toimivan myös *X. laeviksen* VTG:lle. Myös ei-kilpailevia ELISA-määrityksiä voidaan käyttää; niissä voi kuitenkin olla pienemmät havaintorajat kuin jäljempänä selostetussa menetelmässä.

Materiaalit ja reagenssit

— Preadsorboitu 1. vasta-aineseerumi

— Sekoita 1 osa anti-*X. tropicalis* VTG 1. vasta-aineseerumia ja 2 osaa kontrollikoiraan plasmaa. Anna seoksen olla huoneenlämmössä ~ 75 minuuttia, laita se jäähauteeseen 30 minuutiksi ja sentrifugoi (> 20K x G) 1 tunti 4 °C:ssa. Poista supernatantti, tee alikvootit ja säilö -20 °C:seen.

— 2. vasta-aine

— Goat Anti-Rabbit IgG-HRP -konjugaatti (esim. Bio-Rad 172-1019)

— VTG-standardi

— Puhdistettu *X. laeviksen* VTG, pitoisuus 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3',5,5'-tetrametyylibentsidiini) (esim. KPL 50-76-00 tai Sigma T0440)

— Vuohen normaaliseerumi (NGS)(esim. Chemicon® S26-100 ml)

— 96-kuoppaisia EIA-polystyreenimikrotiitterilevyjä (esim. ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— 37 °C:n hybridisaatiouuni (tai nopeasti tasapainottuva elatuskaappi) levyille, vesihaude putkille

— Muut tavalliset laboratoriolaitteet, kemikaalit ja tarvikkeet.

Valmistusohjeet

Pinnoituspuskuri (50 mM karbonaattipuskuria, pH 9,6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
Vesi	428 ml

10X PBS (0,1 M fosfaattia, 1,5 M NaCl:ää):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
Vesi	810 ml

▼**M8**

Pesupuskuri (PBST):

10X PBS	100 ml
Vesi	900 ml

Säädä pH-arvoksi 7,3 1 M:lla HCl:ää ja lisää sen jälkeen 0,5 ml Tween-20:tä

Testipuskuri:

Vuohen normaaliseerumi (NGS)	3,75 ml
Pesupuskuri:	146,25 ml

Näytteiden kerääminen

Verinäytteet kerätään heparinisoituun mikrohematokriittiputkeen ja asetetaan jäähauteeseen. Putkia sentrifugoidaan 3 minuuttia, jonka jälkeen ne pisteytetään ja avataan, ja plasma siirretään 0,6 ml:n mikrosentrifugiputkiin, jotka sisältävät 0,13 yksikköä kylmäkuivattua aprotiniiniä. (Nämä putket valmistellaan etukäteen laittamalla niihin tarvittava määrä aprotiniiniä. Sen jälkeen ne jäädytetään ja kylmäkuivataan pikavakuumikylmäkuivaajassa matalalla lämmöllä, kunnes ne ovat kuivat.) Säilytä plasma -80°C:ssa analysointiin saakka.

Menettely yhdelle levylle

Levyn pinnoittaminen

Sekoita 20 µl puhdistettua VTG:tä ja 22 ml karbonaattipuskuria (lopullinen 3 µg/ml). Lisää 200 µl jokaiseen 96-kuoppaisen levyn kuoppaan. Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua 37 °C:ssa 2 tunnin ajan (tai 4 °C:ssa yön yli).

Levyn estäminen

Estoliuos valmistetaan lisäämällä 2 ml vuohen normaaliseerumia (NGS:ää) 38 ml:aan karbonaattipuskuria. Poista pinnoitusliuos ja kuivaa ravistamalla. Lisää jokaiseen kuoppaan 350 µl estoliuosta. Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua yön yli 37 °C:ssa 2 tunnin ajan (tai 4°C:ssa yön yli).

Vertailustandardien valmistaminen

5,8 µl puhdistettua VTG-standardia sekoitetaan 1,5 ml:aan testipuskuria boorilasista valmistetussa kertakäyttöisessä testiputkessa (12 x 75 mm). Näin saatava pitoisuus on 12 760 ng/ml. Sen jälkeen tehdään sarjalaimennus, jossa 750 µl edellisestä laimennoksesta lisätään 750 µl:aan testipuskuria, jolloin saadaan nämä loppupitoisuudet: 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 ja 50 ng/ml.

Näytteiden valmistelu

Aloita laimentamalla plasma testipuskuriin suhteessa 1:300 (yhdistä esimerkiksi 1 µl plasmaa ja 299 µl testipuskuria) tai 1:30. Jos odotetaan suurta VTG-pitoisuutta, lisälaimennokset tai suuremmat laimennokset voivat olla tarpeen. Yritä pitää B/B_o vertailustandardien mukaisina. Käytä laimennussuhdetta 1:30 niissä näytteissä, joissa VTG-pitoisuus on vähäinen, kuten kontrollikoirailla ja -naarailla (naaraista kaikki ovat epäkypsiä). Tätä vähemmän laimennetuissa näytteissä voi näkyä ei-toivottuja matriisivaikutuksia.

Lisäksi on suositeltavaa ajaa positiivinen kontrollinäyte jokaiselle levylle. Se tehdään plasmavarannosta, jonka VTG-pitoisuus on suuri. Varanto laimennetaan ensin NGS:llä, jaetaan alikvootteihin ja säilötään -80 °C:ssa. Jokaisen levyn osalta sulatetaan yksi alikvootti, joka laimennetaan testipuskurilla ja käsitellään testinäytteen tavoin.

▼**M8**

Inkubointi 1. vasta-aineella

1. vasta-aine valmistaan tekemällä preadsorboidusta 1. vasta-aineseerumista laimennos testipuskurissa suhteessa 1:2000 (ts. 8 µl 16 ml:aan testipuskuria). Yhdistä sen jälkeen 300 µl 1. vasta-ainetta sisältävää liuosta 300 µl:aan näytettä/vertailustandardia lasiputkessa. Tee B_o-putki samalla tavalla 300 µl:sta testipuskuria ja 300 µl:sta vasta-ainetta. Myös NSB-putki on valmistettava samalla tavalla käyttämällä vain 600 µl testipuskuria (eli ei siis vasta-ainetta). Peitä putket Parafilmillä ja sekoita ne varovasti kääntelemällä. Inkuboi putkia 37 °C-asteisessa vesihauteessa noin tunti.

Levyn peseminen

Pese levy hieman ennen kuin 1. vasta-aineen inkubointi tulee valmiiksi. Tyhjennä levy ja taputtele se kuivaksi imupaperilla. Täytä kuopat 350 µl:lla pesuliuosta, tyhjennä ne ja taputtele levy kuivaksi. Tässä monikanavainen toistopipetti tai levynpesuri on hyödyllinen. Pesuvaihe toistetaan vielä kaksi kertaa (pesuja tehdään siis yhteensä kolme).

Levyn täyttäminen

Kun levy on pesty, ota putket pois vesihauteesta ja kääntele niitä kevyesti. Lisää 200 µl jokaisesta näytteestä, vertailustandardista, B_o- ja NSB-putkista levyn kuoppiin (kaksi rinnakkaisnäytettä). Peitä levy tarttuvalla kalvolla ja anna sen inkuboitua 37 °C:ssa 1 tunnin ajan.

Inkubointi 2. vasta-aineella

Edellisen vaiheen inkuboinnin päätyttyä levy on taas pestävä kolme kertaa samalla tavalla kuin edellisellä kerralla. Laimennettu 2. vasta-aine valmistetaan sekoittamalla 2,5 µl 2. vasta-ainetta ja 50 ml testipuskuria. Lisää 200 µl laimennettua 2. vasta-ainetta jokaiseen kuoppaan, peitä levy kuten edellä ja inkuboi sitä 1 tunti 37 °C:ssa.

Substraatin lisääminen

Kun 2. vasta-aineella inkubointi on päättynyt, pese levy taas kolme kertaa edellä kuvatun mukaisesti. Lisää sen jälkeen jokaiseen kuoppaan 100 µl TMB-substraattia. Anna reaktion kehittyä 10 minuutin ajan mieluiten kirkkaalta valolta suojattuna. Lopeta reaktio lisäämällä 100 µl fosforihappoa (1 M). Tämä muuttaa värin sinisestä voimakkaan keltaiseksi. Mittaa absorbanssi 450 nm:n alueella levylukijalla.

B/Bo-arvon laskeminen

Vähennä keskimääräinen NSB-arvo kaikista mittausarvoista. Jokaisen näytteen ja standardin B/B_o-arvo lasketaan jakamalla absorbanssiarvo (B) B_o-näytteen keskimääräisellä absorbanssilla.

Standardikäyrän luominen ja tuntemattomien määrien määrittäminen

Luo standardikäyrä jollakin grafiikkaohjelmalla (esim. Slidewrite™ tai Sigma Plot®), jolla voidaan ekstrapoloida määrä näytteen B/B_o-arvosta standardien B/B_o-arvon perusteella. Yleensä määrä piirretään logaritmisella asteikolla, ja käyrä on S-kirjaimen muotoinen. Se voi kuitenkin näyttää lineaariselta, kun käytetään standardeja, joiden vaihteluväli on pieni. Asianmukainen näyte vastaa laimennuskerrointa ja ilmoitetaan muodossa ”milligrammaa vitellogeniinia millilitrassa plasmaa”.

Minimihavaintorajojen määrittäminen

Usein on epäselvää, miten pieniin arvoihin perustuvat tulokset ilmoitetaan, varsinkin normaalien koiraiden osalta. Näissä tapauksissa on käytettävä 95 prosentin luottamusvälejä sen määrittämiseksi, tuleeko arvo ilmoittaa nollana vai jonakin toisena lukuna. Jos näytteen tulos on nollastandardin (B_o) luottamusvälin sisällä,

▼M8

tulos on ilmoitettava nollana. Minimihavaintoraja on pienin vertailustandardi, joka on jatkuvasti eri kuin nollastandardi; nämä kaksi luottamusväliä eivät siis mene päällekkäin. Sellaisesta näytetuloksesta, joka on minimihavaintorajan luottamusvälin sisällä tai sitä suurempi, ilmoitetaan laskettu arvo. Jos näytteen tulos on nollastandardin ja minimihavaintorajan luottamusvälien välissä, kyseisen näytteen arvoksi on ilmoitettava puolet minimihavaintorajasta.

LÄHDEKIRJALLISUUS

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117–123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113–125.

▼**M8**

Lisäys 7

TILASTOANALYYSI

LAGDA-testistä saadaan kolmenlaisia tietoja, jotka voidaan analysoida tilastollisesti: 1) kvantitatiiviset jatkuvat tiedot 2) tiettyyn tapahtumaan kulunut aika (esim. aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen) kehitysnopeuden arviointia varten ja 3) histopatologisiin tutkimuksiin perustuvia numerotietoja poikkeavuuksien vaikeusasteista tai kehitysvaiheista. LADGA-testiä varten suositeltu tilastollisen analyysin päätöksentekokaavio on kuvassa 1. Jäljempänä esitetään myös muutamia huomautuksia, jotka voivat olla tarpeen, kun tehdään tilastollista analyysia LAGDA-testin mittauksista. Analyysin päätöksentekokaaviossa tulokset kuolleisuuden, kasvun (paino ja pituus) ja maksan somaattisen indeksin mittauksista tulee analysoida ”Muut päätetapahtumat” -kohdan mukaan.

Jatkuvat tiedot

Jatkuvia päätetapahtumia koskevista tiedoista on ensimmäiseksi tarkistettava monotonisuus tekemällä tietojen arvojärjestysmuunnos, sovittamalla ne ANOVA-malliin ja vertailemalla lineaarisia ja kvadraattisia kontrasteja. Jos tiedot ovat monotonisia, on tehtävä askeltava Jonckheere-Terpstran testi rinnakkaisnäytteiden mediaaneilla, eikä muita analyyseja tule tehdä. Vaihtoehtoinen testi tiedoille, jotka ovat normaalijakauman mukaisia ja joissa on homogeeninen varianssi, on askeltava Williamsin testi. Jos tiedot eivät ole monotonisia (kvadraattinen kontrasti on merkitsevä mutta lineaarinen ei), tiedot on analysoitava sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallilla. Sen jälkeen tiedoista on arvioitava normaalius (mieluiten Shapiro-Wilkin tai Anderson-Darlingin testillä) ja varianssin homogeenisuus (mieluiten Levenen testillä). Molemmat testit tehdään sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallin jäännöksillä. Näiden virallisten normaaliutta ja varianssin homogeenisuutta koskevien testien sijasta voidaan käyttää myös asiantuntijan arvioita, joskin ensisijaisesti tulee käyttää virallisia testejä. Jos tiedot jakautuvat normaalisti ja jos varianssi on homogeeninen, sekoitettujen vaikutusten ANOVA-mallin oletukset toteutuvat ja merkitsevä käsittelyvaikutus määritetään Dunnettin testillä. Jos taas tuloksena todetaan epänormaalius tai varianssin heterogeenisuus, Dunnettin testin oletuksia eivät toteudu ja on käytettävä normalisoivaa, varianssia stabiloivaa muunnosta. Jos tällaista muunnosta ei löydy, merkitsevä käsittelyvaikutus määritetään Dunnin testillä. Mikäli mahdollista, on tehtävä ensisijaisesti yksisuuntainen testi kaksisuuntaisen testin sijasta, joskin sen määrittäminen, kumpi on tarkoituksenmukaisempi tietyn päätetapahtuman osalta, edellyttää asiantuntijan arviota.

Kuolleisuus

Kuolleisuustiedot on analysoitava koko testin käsittävältä aikajaksolta, ja ne on ilmoitettava tietyssä säiliössä kuolleiden eläinten osuutena. Sammakonpoikasia, joiden muodonvaihdos ei tapahdu tietyn ajan kuluessa, niitä sammakonpoikasia, jotka ovat toukkien osaotoskohortissa, niitä juveniileja, jotka karsitaan, ja kaikkia eläimiä, jotka kuolevat tutkimuksen tekijän virheen vuoksi, on käsiteltävä sensuroituina tietoina, eivätkä ne sisälly prosenttiosuuksien laskennan nimittäjään. Ennen tilastollisten analyysien tekemistä kuolleisuusosuuksille on tehtävä arkussineliöjuurimuunnos. Vaihtoehtona on käyttää askeltavaa Cochran-Armitagen testiä mahdollisesti Rao-Scottin mukautuksella ylidispersion yhteydessä.

Paino ja pituus (kasvutiedot)

Koiraat ja naaraat eivät ole sukupuolisesti dimorfisia muodonvaihdoksen aikana, joten toukkaosaotoksen kasvutiedot on analysoitava sukupuolesta riippumatta. Juveniilien kasvutiedot on kuitenkin analysoitava erikseen geneettisen sukupuolen perusteella. Näiden päätetapahtumien osalta log-muunnos voi olla tarpeen, koska kokotietojen log-normaalius ei ole epätavallista.

▼M8

Maksan somaattinen indeksi (LSI)

Maksan painot on normalisoitava osuudeksi ruumiin kokonaispainosta (ts. maksan somaattinen indeksi) ja analysoitava erikseen geneettisen sukupuolen perusteella.

Aika NF-vaiheen 62 saavuttamiseen

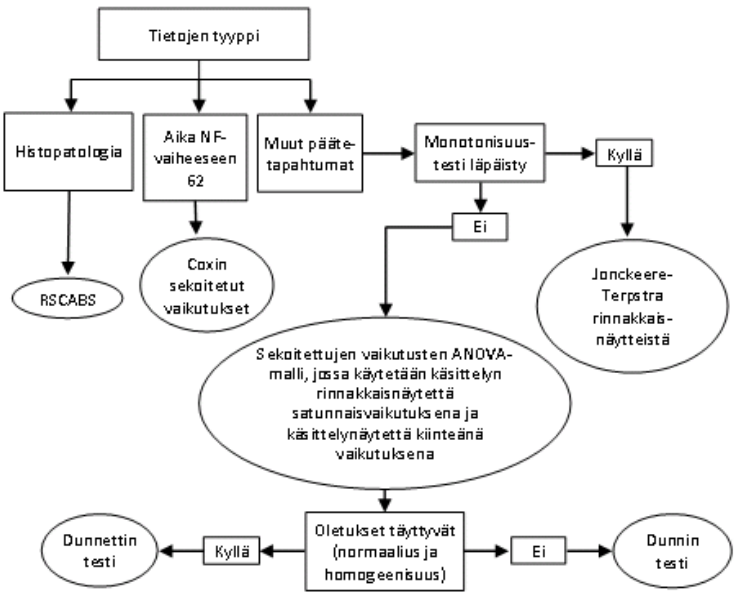
Muodonvaihdosvaiheen saavuttamiseen kulunutta aikaa koskevia tietoja on käsiteltävä time to event -tietoina. Mahdollisia kuolleita eläimiä tai yksilöitä, jotka eivät saavuttaneet 70 päivän kuluessa NF-vaihetta 62, on käsiteltävä oikealta sensuroituina tietoina (ts. todellinen arvo on suurempi kuin 70 päivää, mutta tutkimus päättyy, ennen kuin eläimet olivat saavuttaneet 70 päivässä NF-vaiheen 62). Testin päättymispäivä on määritettävä sen mediaaniajan perusteella, jona NF-vaihe 62 päättyi laimennusvesikontrollin eläinten osalta, kun muodonvaihdos tuli valmiiksi. Muodonvaihdoksen valmiiksi tulemisen mediaaniaika voidaan määrittää Kaplan-Meierin rajatuloestimaateilla. Tämä päätetapahtuma on analysoitava käyttämällä sekoitettujen vaikutusten Coxin suhteellisen vaaran mallia, jossa otetaan huomioon se, että tutkimuksessa käytettiin rinnakkaisnäytteitä.

Histopatologiset tiedot (vaikeusasteet ja kehitysvaiheet)

Histopatologiset tiedot esitetään vaikeusasteina tai kehitysvaiheina. Testissä nimeltä RSCABS (Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices) käytetään askeltavaa RAo-Scottin mukauttamaa Cochran-Armitagen trenditestiä jokaisella histopatologisen vasteen vaikeusastetasolla (Green ja muut, 2014). Rao-Scottin mukautuksella saadaan kokeen rinnakkaisnäytteisiin perustuva rakenne mukaan testiin. ”By Slices” -menettelyssä otetaan huomioon biologinen odotus, että vaikutuksen vakavuus yleensä suurenee annosten tai pitoisuuksien kasvaessa, mutta samalla siinä huomioidaan myös yksittäistä yksilöä koskevat pisteet ja näytetään kaikkien havaittujen vaikutusten vakavuus. Sen lisäksi, että RSCABS-menettelyssä määritetään, mitkä käsittelyt eroavat kontrolleista tilastollisesti (ts. joissa patologiset vaikutukset ovat vakavampia kuin kontrolleissa), siinä määritetään myös, millä vaikeusasteella ero ilmenee. Näin tästä menettelystä saadaan analyysissä erittäin tarpeellista kontekstitietoa. Kun arvioidaan sukurauhasten ja sukujohtimien kehitysvaihetta, tietoihin on sovellettava lisäkäsittelyä, koska RSCABS-menetelmässä oletuksena on, että vaikutuksen vakavuus suurenee annoksen mukaan. Havaittu vaikutus voi olla kehityksen viivästyminen tai nopeutuminen. Kehitysvaiheen arviointia koskevia tietoja on siis analysoitava ilmoitetun mukaisesti, jotta havaitaan kehityksen nopeutuminen, ja sen jälkeen ne on muunnettava manuaalisesti ennen toista analyysia, jotta havaitaan kehityksen viivästyminen.

Kuva 1

LAGDA-testin tietojen tilastollisen analyysin päätöksentekokaavio



▼**M8**

LÄHDEKIRJALLISUUS

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1 108–1 116.

▼M8

Lisäys 8

NÄKÖKOHTIA SKOLIOOSIN HAVAITSEMISEEN JA SEN ILMAANTUMISEN MINIMOIMISEEN

Idiopaattinen skolioosi, joka näkyy X. laeviksen poikasilla yleensä ”taipuneena pyrstönä”, voi vaikeuttaa testipopulaatioiden morfologian ja käyttäytymisen havainnointia. Siksi on syytä pyrkiä minimoimaan tai eliminoimaan skolioosin ilmaantuminen sekä kantapopulaatiossa että testiolosuhteissa. Lopullisessa testissä keskivaikean ja vaikean skolioosin esiintyvyyden tulee olla vähemmän kuin 10 prosenttia. Tämä lisää luottamusta siihen, että testillä voidaan havaita käsittelyyn liittyvät vaikutukset, jotka kohdistuvat muuten terveiden sammakkoeläinten toukkien kehitykseen.

Lopullisen testin päivittäisen havainnoinnin aikana on kirjattava sekä skolioosin ilmaantuvuus (yksilöiden määrä) että vaikeusaste, jos skolioosia havaitaan. Poikkeavuuden luonne on kuvattava käyryyden sijainnin (ts. peräaukon edessä vai takana) ja suunnan (ts. lateraalinen vai dorsaalisesta ventraaliseen) osalta. Vaikeusaste voidaan arvioida seuraavasti:

Merkityksetön: ei käyryyttä

1) Vähäinen: lievä lateraalinen käyryys peräaukon takana; näkyvissä vain eläimen ollessa levossa

2) Kohtalainen: lateraalinen käyryys peräaukon takana; näkyvissä aina, muttei estä eläimen liikkumista

3) Vaikea: lateraalinen käyryys peräaukon edessä; TAI käyryys, joka estää liikkumisen; TAI käyryys, jonka suunta on dorsaalisesta ventraaliseen

Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston (EPA) tieteellinen neuvoa-antava ryhmä FIFRA (FIFRA SAP 2013) arvioi yhteenvetotiedot skolioosista viidessätoista sammakkoeläinten muodonvaihdostestissä, joissa käytettiin *X. laevista* (NF-vaiheesta 51 vaiheeseen 60+) ja antoi yleisiä suosituksia tämän poikkeavuuden esiintyvyyden vähentämiseksi testipopulaatioissa. Nämä suositukset ovat merkityksellisiä myös LAGDA-testissä, vaikka tässä testissä tarkastellaankin pidempää kehityksellistä aikajanaa.

Aikaisempi kutemiskyky

Lisääntyvinä pareina tulee yleensä käyttää hyväkuntoisia ja terveitä aikuisia sammakoita. Sellaisten parien eliminointi, jotka tuottavat jälkeläisiä, joilla on skolioosi, voi minimoida sen ilmaantuvuuden ajan myötä. Etenkin luonnosta pyydystettyjen parien käytön minimoiminen voi olla tässä hyödyllistä. LAGDA-testissä altistusaika alkaa NF-vaiheessa 8–10 olevilla alkioilla, eikä testin alkaessa ole mahdollista määrittää, kehittyykö tietyille yksilöille skolioosi. Sen lisäksi, että testissä käytettäviltä eläimiltä seurataan skolioosin ilmaantumista, on dokumentoitava myös aikaisempi kyky tuottaa poikasia (myös skolioosin esiintyminen kaikilla toukilla, joiden annettiin kehittyä). Voi olla hyödyllistä jatkaa sellaisen poikueen osan tarkkailua, jota ei käytetä tietyssä tutkimuksessa, ja raportoida nämä havainnot (FIFRA SAP 2013).

Vedenlaatu

On tärkeää varmistaa, että veden laatu on riittävä sekä laboratoriokannassa että testin aikana. Niiden veden laatua koskevien kriteerien lisäksi, jotka arvioidaan rutiininomaisesti vesieliöiden toksisuustesteissä, voi olla hyödyllistä seurata mahdollisia ravintoainepuutoksia ja korjata ne tarvittaessa (esim. C-vitamiinin, kalsiumin ja fosforin puutos) tai liiallista seleeni- ja kuparipitoisuutta, sillä niiden on ilmoitettu aiheuttavan eriasteista skolioosia laboratorioissa kasvatetuille *Rana* sp. - ja *Xenopus* sp. -lajeille (Marshall ja muut 1980; Leibovitz ja muut. 1992; Martinez ja muut. 1992; FIFRA SAP:n raportin 2013 mukaisesti). Asianmukaisen ruokavalion (ks. lisäys 4) käyttö ja säännöllinen säiliön puhdistus yleensä parantavat vedenlaatua ja testiyksilöiden terveyttä.

▼M8

Ruokavalio

LAGDA-testissä suotuisaa ruokavaliota koskevat erityissuositukset ovat lisäyksessä 4. Ravinnon lähteet on suositeltavaa tarkastaa sellaisten biologisten toksiinien, rikkakasvien torjunta-aineiden ja muiden kasvinsuojeluaineiden varalta, joiden tiedetään aiheuttavan skolioosia *X. laevikselle* tai muille vesieläimille (Schlenk ja Jenkins 2013). Esimerkiksi tietyille kolinesteraasin estäjille altistuminen on liitetty skolioosin esiintymiseen kaloilla (Schultz ja muut 1985) ja sammakoilla (Bacchetta ja muut 2008).

LÄHDEKIRJALLISUUS

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110–118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185–198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322–328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445–453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314–320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.