387L0302

30.5.88 *EUROOPAN YHTEISÖJEN VIRALLINEN LEHTI* N:o L 133/1

# KOMISSION DIREKTIIVI,

**annettu 18 päivänä marraskuuta 1987,**

**vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen yhdeksännen kerran**

(87/302/ETY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan talousyhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 27 päivänä kesäkuuta 1967 annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY(1), sellaisena kuin se on muutettuna kuudennen kerran direktiivillä 79/831/ETY(2), ja erityisesti sen 19 artiklan,

sekä katsoo, että

direktiivin 67/548/ETY 3 artiklan 1 kohdassa säädetään, että aineiden ja valmisteiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja ympäristömyrkyllisyys on määritettävä liitteessä V vahvistetuin menetelmin,

direktiivin 67/548/ETY 3 artiklan 2 kohdassa säädetään, että aineen tai valmisteen aiheuttama todellinen tai mahdollinen ympäristölle aiheutuva vaara on määritettävä liitteessä VII ja VIII esitettyjen ominaisuuksien perusteella,

liite V, sellaisena kuin se on muutettuna komission direktiivillä 84/449/ETY(3), sisältää tällä hetkellä ainoastaan liitteessä VII esitettyjen ominaisuuksien testausmenetelmät ja on tarpeen asettaa käytettäväksi myös liitteessä VIII esitettyjen ominaisuuksien testausmenetelmät, ja

tämän direktiivin säännökset ovat vaarallisten aineiden ja valmisteiden kaupan teknisten esteiden poistamiseksi annettujen direktiivien mukauttamista tekniikan kehitykseen käsittelevän komitean lausunnon mukaisia,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

*1 artikla*

Lisätään tämän direktiivin liitteen teksti direktiivin 67/548/ETY liitteeseen V.

*2 artikla*

Jäsenvaltioiden on annettava ja julkaistava ennen 31 päivää joulukuuta 1988 tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät säännökset ja ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä. Niiden on saatettava nämä säännökset voimaan 30 päivästä kesäkuuta 1989 alkaen.

*3 artikla*

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 18 marraskuuta 1987.

*Komission puolesta*

Stanley CLINTON DAVIS

*Komission jäsen*

(1) EYVL N:o 196, 16.8.1967, s. 1/67
(2) EYVL N:o L 259, 15.10.1979, s. 10
(3) EYVL N:o L 251, 19.9.1984, s. 1

*LIITE*

Tässä selostetut testausmenetelmät on tarkoitettu tiettyjen myrkyllisyyttä ja ympäristömyrkyllisyyttä koskevien neuvoston direktiivin 79/831/ETY liitteessä VIII lueteltujen ominaisuuksien määrityksiin. Liitteessä VIII oleville 1 ja 2 tasolle soveltuvat testausmenetelmät on selostettu, mutta testejä ei ole jaoteltu edelleen eri tasojen mukaan.

SISÄLLYSLUETTELO

OSA B: Myrkyllisyyden määritysmenetelmät ..... 6

Yleisjohdanto, osa B ..... 6

Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystutkimus, toistuva annostelu suun kautta, 90 vrk., jyrsijät ..... 10

Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystutkimus, toistuva annostelu suun kautta, 90 vrk., muut kuin jyrsijät . 14

Subkrooninen myrkyllisyystutkimus (ihon kautta), toistuva annostelu ihon kautta, 90 vrk., jyrsijät ..... 18

Subkrooninen myrkyllisyystutkimus (hengitysteiden kautta), toistuva annostelu hengitysteiden kautta, 90 vrk., jyrsijät ..... 22

Teratogeenisuustutkimus, jyrsijät ja muut kuin jyrsijät ..... 26

Krooninen myrkyllisyystesti ..... 29

Karsinogeenisuustesti ..... 34

Yhdistetty krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuustesti ..... 39

Myrkkyjen vaikutus lisääntymiskykyyn (yhden sukupolven testi) ..... 45

Myrkkyjen vaikutus lisääntymiskykyyn (kahden sukupolven testi) ..... 49

Myrkkykinetiikka ..... 53

Mutageenisuustestaus ja karsinogeenisten aineiden seulonta ..... 57

— Geenimutaatiot - *Saccharomyces cerevisiae* ..... 57

— Mitoottinen rekombinaatio - *Saccharomyces cerevisiae* ..... 60

— Nisäkässoluviljelmällä suoritettava geenimutaatiotesti ..... 63

— DNA-vaurio ja sen korjaantuminen - UDS-testi nisäkässoluviljelmällä ..... 66

— Sisarkromatidivaihdostesti ..... 70

— Resessiivi letaali -testi banaanikärpäsellä *(Drosophila melanogaster)* ..... 73

— Solutransformaatiotestit nisäkässoluviljelmillä ..... 75

— Dominoiva letaalitesti jyrsijöillä ..... 78

— Nisäkkäiden sukusolujen sytogenetiikka *in vivo* ..... 81

— Hiiren spot-testi ..... 84

— Hiiren periytyvä translokaatio ..... 87

OSA C: Ympäristömyrkyllisyyden määritysmenetelmät ..... 90

Yleisjohdanto, osa C ..... 90

Levän inhibitiotesti ..... 91

Myrkyllisyystutkimus madoilla, keinomaatesti ..... 97

Biologinen hajoaminen - Zahn-Wellens-testi ..... 101

Biologinen hajoaminen - aktiivilietteen simulointitestit ..... 108

Biologinen hajoaminen - aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti ..... 120

Biologinen hajoaminen - modifioitu SCAS-testi ..... 125

# OSA B: MYRKYLLISYYDEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

## YLEISJOHDANTO: OSA B

### PITKÄAIKAISTUTKIMUKSET

Subkrooniset, krooniset ja karsinogeenisuustutkimukset

**Testattavan aineen ja käsittelyseoksen kuvaus**

Testattavan aineen koostumuksen, merkittävien epäpuhtauksien sekä olennaisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, kuten stabiilisuuden, on oltava tiedossa ennen myrkyllisyystutkimusten aloittamista.

Testattavan aineen fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista saadaan tärkeitä tietoja, joiden perusteella valitaan antotapa ja suunnitellaan subkroonisten, kroonisten ja karsinogeenisuustutkimusten kulku sekä testattavan aineen käsittely- ja varastointitapa.

Kemiallista rakennetta ja fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia koskevat tiedot voivat myös antaa viitteitä valitun antotavan imeytymisominaisuuksista sekä aineenvaihduntaan ja kudoksiin kohdistuvista vaikutuksista. Aikaisemmista myrkyllisyyttä ja sen kinetiikkaa koskevista tutkimuksista voidaan myös saada myrkkykineettisiä parametrejä koskevia tietoja.

Analyysimenetelmän annosteluaineessa ja biologisessa materiaalissa olevan testattavan aineen kvalitatiivista ja kvantitatiivista määritystä varten (mukaan lukien merkittävät epäpuhtaudet, kun mahdollista) on oltava valmiina ennen tutkimuksen aloittamista.

**Koe-eläimet: lajin ja kannan valinta**

Koska on tarpeen käsitellä eläimiä suurimman osan niiden elinajasta, tutkimukset tehdään yleensä helposti saatavissa olevilla ja suhteellisen lyhytikäisillä koe-eläinlajeilla. On erittäin tärkeää, että käytetyllä koe-eläinkannalla vertailukelpoisissa olosuhteissa ilmenneet spontaanit sairaudet ja kasvaimet ovat tiedossa.

Kantojen on oltava tarkoin määriteltyjä, eikä niissä saa esiintyä häiritseviä synnynnäisiä vikoja. F1-hybridisisäsiitoskannoilla on tässä suhteessa etuja, mutta mikäli ulkosiitoskannoista on saatavilla tarpeelliset taustatiedot ja eläimet ovat peräisin suljetusta yhdyskunnasta, niitä voidaan käyttää.

**Eläinten hoito, ruoka- ja vesihuolto**

Eläinkokeet ja -tutkimukset on suoritettava kansallisten määräysten mukaisesti ottaen huomioon humaanit periaatteet ja eläinten hyvinvointia koskeva kansainvälinen kehitys.

Ympäristöolosuhteiden ja eläinten hoitotapojen tarkka valvonta on luotettavien tutkimustulosten ehdoton edellytys. Asuinoloilla, väliintulevalla sairaudella, lääkehoidolla, ruokavalion, ilman, veden ja kuivikkeiden epäpuhtauksilla sekä yleisillä eläintenhoito-olosuhteilla voi olla huomattava vaikutus pitkäaikaistutkimusten tuloksiin. Kemiallisten sterilointiaineiden vaikutus tutkimukseen on oltava selvillä.

Ruokavalion on täytettävä kaikki testattavan lajin ravintovaatimukset, eikä siinä saa olla tutkimuksen tulokseen vaikuttavia epäpuhtauksia. Jyrsijöille on oltava ruokaa ja vettä jatkuvasti saatavilla ja ruoka on uusittava vähintään kerran viikossa. Tällä hetkellä käytetään kolmea ruokavaliota: tavanomaista, synteettistä ja erilaisia vapaavalintaisia seoksia.

Käytettiinpä mitä ruokavaliota tahansa, rehun toimittajan on määräajoin tarkistettava perusruokavalion ravintoarvo ja epäpuhtausaste ja toimittettava nämä tiedot laboratorioon kunkin rehuerän yhteydessä. On hyvin toivottavaa, että ruokavalion vaikutus aineenvaihduntaan sekä kasvainten kehittymiseen ja eläimen elinikään on tiedossa.

Tämän lisäksi koelaboratorio voi analysoida perusravinnon aineosia ja tahattomia epäpuhtauksia, kuten karsinogeenejä. Mikäli analyysejä tehdään, niiden tulokset säilytetään ja liitetään kustakin testattavasta aineesta tehtävään tutkimusselostukseen.

Yleisiä ravinnon aineosia, joiden tiedetään vaikuttavan syövän syntyyn (esim. antioksidantit, tyydyttymättömät rasvahapot, seleeni) ei saa esiintyä häiritsevän suurina pitoisuuksina. Koska useat ravintoaineiden epäpuhtaudet voivat vaikuttaa karsinogeenisuusmäärityksiin, erityistä huomiota on kiinnitettävä ravinnossa oleviin hyönteismyrkkyjäämiin, orgaanisiin klooriyhdisteisiin, polysyklisiin aromaattisiin hiilivetyihin, estrogeeneihin, raskasmetalleihin, nitrosamiineihin ja mykotoksiineihin.

Stabilisuustestit ovat välttämättömiä, kun testattava aine annetaan veden tai ruoan mukana. Ennen toistuvilla annoksilla tehtäviä testejä määritetään huolellisesti suoritettujen stabiilisuus- ja homogeenisuuskokeiden avulla, kuinka usein on tarpeen antaa ravintoseosta ja suorittaa valvontaa.

Kun ravinto on steriloitua, steriloinnin vaikutus testattavaan aineeseen ja ravinnon aineosiin on oltava tiedossa. Tarvittavat säätötoimenpiteet on suoritettava.

Karsinogeenisuustestien suorittajien on tiedettävä käytetyssä vedessä mahdollisesti olevat epäpuhtaudet. Ihmisten käyttöön tarkoitettu vesi on yleensä sopivaa ja sen koostumuksesta on tavallisesti tietoja saatavilla.

Ruokavaliossa olevan testattavan aineen pitoisuutta voidaan joutua säätämään eläinten kasvaessa, jotta testiainetta joutuu elimistöön suhteellisen vakiona pysyvä määrä suhteessa eläimen painoon.

Kontrolli- ja koe-eläinten ruokavalion ravintoarvojen tulisi olla mahdollisimman yhdenmukaisia. Sen vuoksi ruokavalioon lisätyn testattavan aineen ravintoarvo on otettava huomioon. Tähänastisten kokemusten mukaan alle 5 % testattavaa ainetta, joka ei sisällä ravintoaineita, lisättynä ruokavalioon ei merkittävästi vaikuta ruokavalion ravintoarvoon.

**1 Inhalaatiotutkimus**

Raja-annostestiä ei ole määritelty, koska ei ole mahdollista määrittää yksittäistä sisäänhengityksen altistusrjaa.

**2 Teratogeenisuustutkimus**

Tässä testimenetelmässä tutkittava aine annetaan yleensä suun kautta. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää muitakin antotapoja riippuen tutkittavan aineen ominaisuuksien tai ihmisten yleisen altistustavan mukaan. Tällaisissa tapauksissa testausmenetelmään tehdään tarvittavat muutokset ottaen huomioon 28 päivän testausmenetelmissä tarvittavat soveltuvat osatekijät.

**3 Myrkkykinetiikka**

Myrkkykineettiset tutkimukset ovat avuksi myrkyllisyystulosten tulkinnassa ja arvioinnissa. Näiden tutkimusten tarkoituksena on selvittää tutkittavan kemikaalin tiettyjä myrkyllisiä ominaisuuksia ja niiden tuloksista saattaa olla hyötyä jatkotutkimusten suunnittelussa. Tarkoituksena ei ole, että kaikki parametrit on aina määritettävä. Vain harvoissa tapauksissa on tarpeen tehdä koko toksikokineettinen koesarja (imeytyminen, eritys, jakaantuminen ja aineenvaihdunta). Tiettyjä yhdisteitä tutkittaessa saattaa olla eduksi muuttaa koesarjan järjestystä tai yhden annoksen tutkimus voi olla riittävä.

*Määritelmät*

| | |
|---|---|
| Myrkkykinetiikka: | testattavien aineiden imeytymis-, eritys-, jakaantumis- ja aineenvaihduntatutkimukset; |
| Imeytyminen: | tapa (tavat), jolla aine joutuu ruumiiseen; |
| Eritys: | tapa (tavat), jolla aine ja/tai sen metaboliitit poistuvat ruumiista; |
| Jakaantuminen: | tapa (tavat), jolla imeytynyt aine ja/tai sen metaboliitit jakaantuvat ruumiiseen; |
| Metabolia: | tapa (tavat), jolla aine muuttuu rakenteeltaan ruumiissa entsyymi- tai muiden kuin entsyymireaktioiden vaikutuksesta. |

**4 Akuutti ja subakuutti tutkimus toisella lajilla**

Toisella lajilla tehdyn tutkimuksen tarkoituksena on täydentää ensimmäisestä tutkimuksesta tehtyjä johtopäätöksiä.

Toisella lajilla tehty tutkimus voidaan suorittaa jo kuvatulla testimenetelmällä tai sitä voidaan soveltaa pienempään eläinmäärään.

**5 Hedelmällisyystutkimukset**

Kun kolmen sukupolven lisääntymistestin suorittaminen on tarpeen, selostettua kahden sukupolven lisääntymistestiä voidaan jatkaa kolmanteen sukupolveen.

**6 Mutageenisuustutkimukset**

Mutageenisuuden lisätestit sekä karsinogeenisuuden seulontatestit

Direktiiviin liitteessä VIII mainitaan mutageenisuuden jatkotutkimuksia tai karsinogeenisuuden esiseulontaa koskevia lisätutkimuksia. Tässä osassa selostettuja tutkimuksia voidaan yleensä käyttää kummallakin osa-alueella.

*Johdanto*

Aineen mutageenisuuden alustava määritys koostuu bakteerien geeni(piste)mutaatiota ja nisäkkäiden solujen sytogeneettisiä vaurioita (*in vitro* tai *in vivo*) koskevista tutkimuksista. Näihin "perussarjan" tutkimuksiin soveltuvia menetelmiä on selostettu edellä. Tässä osassa käsitellään lisätutkimuksia, jotka soveltuvat perussarjalla saatujen tulosten varmentamiseen ja/tai valaisemiseen, ja joita voidaan käyttää lukuisiin tarkoituksiin:

1 varmentamaan perussarjalla saatuja tuloksia;

2 tutkimaan tulostapahtumaa, jota perussarjalla ei tutkita;

3 aloittamaan tai laajentamaan *in vivo* -tutkimuksia.

Tästä syystä selostettu testivalikoima sisältää eukaryoottisysteemit *in vitro* ja *in vivo* sekä laajan sarjan biologisia tulostapahtumia. Nämä testit antavat tietoja geenimutaatioista organismeissa, jotka ovat kehittyneempiä kuin perussarjassa käytetyt bakteerit, ja lisätietoja aineen kromosomipoikkeamia aiheuttavista ominaisuuksista.

Muita tulostapahtumia kuin geeni(piste)mutaatioita ja kromosomipoikkeamia kartoittavia testejä selostetaan niinikään. Niistä saadaan lisätietoja ja ne voidaan tarpeen mukaan sisällyttää tutkimussuunnitelmiin.

Yleisperiaatteena on, että mutageenisuustutkimusten jatko-ohjelmaa harkittaessa se on suunniteltava niin, että sen avulla saadaan olennaista lisätietoa tutkittavan aineen mutageenisuudesta ja/tai karsinogeenisuudesta.

Sopivien tutkimusten valinta riippuu useista tekijöistä, kuten aineen kemiallisista ja fysikaalisista ominaisuuksista, sytogeneettisten ja bakteeritutkimusten tuloksista, aineen-vaihduntaprofiilista, muiden myrkyllisyystutkimusten tuloksista sekä aineen tunnetuista käyttötavoista. Testien jäykkä valintamenetelmä ei tule kysymykseen, koska on otettava huomioon lukuisia seikkoja. Joitakin yleisiä periaatteita voidaan kuitenkin käyttää ohjenuorana. Jos perussarjan testi oli positiivinen, lisätutkimusten on sisällettävä vähintään yksi testi, jolla määritetään sama geneettinen tulostapahtuma. Jos perussarjan molemmat testit olivat negatiivisia, lisätutkimuksena on yleensä tehtävä geenimutaatiotesti ja kromosomipoikkeavuustesti. Lisätietoja voidaan myös hankkia osoitustesteillä (luettelo jäljempänä).

Tällaiset tutkimusmenetelmät on ryhmitelty jäljempänä niiden pääasiallisen geneettisen tulostapahtuman mukaisesti.

*Geeni(piste)mutaatiotutkimukset*

Aineen geenimutaatioita aiheuttavien ominaisuuksien jatkotutkimuksiin voi jokin seuraavista testeistä olla sopiva:

a) Suora- tai takaisinmuutatiotutkimukset eukaryoottisilla mikro-organismeilla *(Saccharomyces cerevisiae).*

b) Nisäkkäiden solumuutoksia käsittävät *in vitro* -tutkimukset.

c) *Drosophila melanogaster* illa tehty sukupuoleen liittyvä resessiivinen letaalitesti.

d) Somaattinen solumutaatiotutkimus *in vivo*: hiiren spot-testi.

*Kromosomipoikkeavuuden tutkimukset*

Aineen kromosomipoikkevuuksia aiheuttavien ominaisuuksien jatkotutkimuksiin voi jokin seuraavista testeistä olla sopiva:

a) nisäkkäiden sytogeneettiset tutkimukset *in vivo*,

Luuydinsolujen metafaasianalyysin tekoa olisi harkittava, ellei se sisälly alustaviin tutkimuksiin ("perussarjaan"). Lisäksi voidaan tutkia siittiösolun sytogeneettisyyttä *in vivo*,

b) nisäkässolujen sytogeneettiset tutkimukset *in vitro*, elleivät ne sisälly alustaviin tutkimuksiin,

c) Dominoiva letaalitesti jyrsijöillä,

d) Hiiren periytyvä translokaatiotesti.

*Osoitustestit DNA:han kohdistuvista vaikutuksista*

Tietyillä menetelmillä saadaan viitteitä DNA:han kohdistuvista vaikutuksista, vaikkei niillä varsinaisesti tutkita mutageenisuustapahtumaa. Näillä tutkimuksilla voidaan saada mutageenisuustestin tuloksia täydentäviä ja tulkintaa helpottavia tietoja. Kun tällaisia tutkimuksia tarvitaan, jokin alla esitetyistä eukaryoottisia mikro-organismeja tai nisäkässoluja käyttävistä menetelmistä voi olla sopiva:

a) Mitoottinen rekombinaatio *Saccharomyces cerevisiae*lla,

b) DNA-vaurio ja sen korjaantuminen - UDS-testi nisäkässoluviljelmillä,

c) Sisarkromatidivaihdos nisäkässoluviljelmillä.

*Muut karsinogeenisuutta mittaavat viitetestit*

Tietyillä nisäkkäiden solumuutoksia tutkivilla tutkimuksilla voidaan määrittää aineen soluviljelmään aiheuttamia morfologisia ja käyttäytymistä koskevia muutoksia, joilla arvellaan olevan yhteyttä pahanlaatuisiin muutoksiin *in vivo*. Tutkimuksissa voidaan käyttää useita solutyyppejä ja muutosten arviointiperusteita.

*Perimän vaikutusten vaarallisuuden arviointi nisäkkäillä*

On olemassa menetelmiä, joiden avulla määritetään geeni(piste)mutaatioiden aiheuttamaa perinnöllisyysvaikutusta nisäkkäillä (hiiren spesifisen lokuksen -testi([1])) tai kromosomipoikkeavuuksille (hiiren periytyvä translokaatiotesti). Näitä menetelmiä voidaan käyttää arvioitaessa aineen mahdollista geneettistä vaara ihmiselle. Koska nämä testit ovat varsin monimutkaisia ja niihin, etenkin spesifisen lokuksen -testiin, tarvitaan hyvin suuri määrä eläimiä, näihin tutkimuksiin on oltava painavat syyt.

([1]) Hiiren spesifisen lokuksen -testillä (jota ei ole selostettu tässä asiakirjassa) voidaan mitata ensimmäisen sukupolven siittiösolujen mutaatioita mutageeniselle aineelle tapahtuneen altistuksen jälkeen. Muutokset näkyviä fenotyyppejä muodostavissa geeneissä voidaan havaita ja niiden määrää määrittää

# SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS

## TOISTUVA ANNOSTELU SUUN 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 annetaan päivittäin suun kautta asteittain suurenevina annoksina useille koe-eläinryhmille 90 vuorokauden aikana, niin että kukin ryhmä saa eri suuruisen annoksen. Antoaikana eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkkyvaikutusten toteamiseksi. Kokeen aikana kuolleille eläimille ja sen päättymisen jälkeen vielä elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Eläimet siirretään koetiloihin ja kokeen aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen testin alkua. Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin.

Testattavia aineita voidaan antaa ruoan mukana, ruokintaletkulla, kapseleina tai juomavedessä. Samaa antotapaa on käytettävä kaikille koe-eläimille koko kokeen ajan. Mikäli liuotinta tai muita lisäaineita käytetään annostelun helpottamiseksi, niiden myrkyttömyyden on oltava tiedossa esimerkiksi aikaisempien tutkimustulosten perusteella.

*Koeolosuhteet*

Koe-eläimet

Rotta on suositeltavin laji, ellei sen käyttöä ole kontraindikoitu. Koe-eläimiksi valitaan yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä eläimiä ja annostus aloitetaan ennen kuin rotat ovat kuuden viikon ikäisiä, kuitenkin viimeistään kahdeksan viikon iässä. Testin alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskiarvosta. Mikäli subkrooninen oraalinen testi on tehty pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, samaa lajia ja kantaa käytetään kummassakin tutkimuksessa.

Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 20 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 myrkkyvaikutusten ohimenevyyden, pysyvyyden tai viivästyneen esiintymisen toteamiseksi.

Annostasot

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa sekä kontrolliryhmää, jolle ei anneta testattavaa ainetta, mutta jota käsitellään muuten aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos annostelun helpottamiseksi käytetään liuotinta, sitä annostellaan kontrolleille 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 altistumisesta on tietoja, pienimmän testiannoksen on oltava tätä suurempi. Keskimmäisen annostason tulisi aiheuttaa pienimmät havaittavissa olevat myrkytysoireet. Käytettäessä useampia väliannostasoja ne tulee porrastaa niin, että myrkkyvaikutukset lisääntyvät asteittain.

Pienimmän ja keskisuuren annoksen saavissa ryhmissä sekä kontrolliryhmässä kuolemantapausten luvun on oltava pieni, jotta tuloksista voidaan tehdä luotettava arviointi.

Kun testattavaa ainetta annetaan ruoan mukana, voidaan käyttää pysyvää pitoisuutta ruoassa (ppm tai mg/kg ruokaa) tai pysyvää annostasoa suhteessa eläimen ruumiinpainoon. On mainittava, kumpaa tapaa käytetään. Kun aine annetaan letkuruokintana, annos annetaan samaan aikaan joka päivä. Sitä säädetään määräajoin (viikottain tai kahden viikon välein), jotta annostaso pysyy muuttomattomana suhteessa eläimen painoon.

Raja-annostesti

Jos 90 päivää kestävän, jäljempänä selostetulla menetelmällä 1 000 mg/kg ruumiinpaino/päivä tai ihmisten altistumiseen perustuvalla suuremmalla annoksella tehdyn tutkimuksen tuloksena ei synny myrkyllisiä vaikutuksia, tutkimusta ei tarvitse jatkaa. Tutkittaessa lievästi myrkyllisiä aineita on syytä varmistua siitä, etteivät ruoan seassa annetut testattavat ainemäärät ja niiden ominaisuudet vaikuta eläimen ravinnon hyväksikäyttöön.

Tarkkailuaika

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja kaikki myrkytysoireet, niiden alkamisaika, voimakkuus ja kesto kirjataan. Kuolinaika ja myrkkyvaikutusten alkamis- ja loppumisaika kirjataan.

*Testin suorittaminen*

Eläimille tulisi antaa testattavaa ainetta mieluimmin viikon jokaisena päivänä 90 vuorokauden ajan. Mikäli tutkimukseen kuuluu seurantatarkkailuun tarkoitettu satelliittiryhmä, sitä tarkkaillaan 28 päivän ajan tutkimuksen jälkeen myrkkyvaikutusten ohimenevyyden tai pysyvyyden toteamiseksi.

Eläinten tarkkailussa on kiinnitettävä huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Ruoan kulutus mitataan viikottain (ja veden kulutus kun testattava aine annetaan juomavedessä) ja eläimet punnitaan viikottain.

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 välittömästi ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Seuraava tutkimus tehdään kokeen päätyttyä kaikille testiryhmien ja kontrolliryhmän eläimille:

a) Silmätutkimus olisi suoritettava oftalmoskoopilla tai vastaavalla laitteella ennen aineen antamista ja testin päätyttyä mieluimmin kaikille eläimille, mutta vähintään suurimman annoksen saaneille sekä kontrolliryhmälle. Jos 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 trombosyytit, tehdään testiajanjakson päätyttyä.

c) Veren kliininen biokemiallinen tutkimus tehdään testiajanjakson päätyttyä. Kaikkiin tutkimuksiin soveltuvia määrityskohteita ovat elektrolyyttitasapaino, hiilihydraattien metabolia sekä, maksan ja munuaisten toiminta. Määrityksien valintaperusteena on aineen todettu vaikutusmekanismi. 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 lipidi-, hormoni-, happo/emästasapaino-, methemoglobiini- ja kolinesteraasiaktiivisuudenanalyysit. Muitakin kliinisiä biokemiallisia testejä voidaan tehdä tutkittaessa laajemmin todettuja vaikutuksia.

d) Virtsa-analyysiä ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta.

Mikäli taustatiedot ovat riittämättömät, hematologisten ja biokemiallisten parametrien määritystä tulisi harkita ennen annostuksen 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 mukaanlukien, pikkuaivokuori ja aivokuori, aivolisäke, kilpirauhanen/lisäkilpirauhanen, kateenkorvakudosta, henkitorvi ja keuhkot, sydän, aortta (sylkirauhaset), maksa, perna, munuaiset, lisämunuaiset, haima, sukupuolirauhaset, kohtu, (muut sukupuolielimet), (iho), ruokatorvi, mahalaukku, pohjukaissuoli, ohutsuoli, umpisuoli, paksusuoli, peräsuoli, virtsarakko, tyypillinen imusolmuke (naaraan rintarauhanen), (reisilihaksistoa), ääreishermo, rintalaa luuytimineen, (silmät), (reisiluu ja nivelen pintaa) (selkärankaa kolmesta kohdasta - kaulasta, henkitorven keskiosasta ja lantiosta) sekä (kyynelrauhaset). Suluissa olevat kudokset tutkitaan vain, mikäli ne tai kohde-elimet osoittavat merkkejä myrkyllisyydestä.

Histopatologinen tutkimus

a) Suurimman annoksen saaneesta ryhmästä sekä kontrolliryhmästä otetuille elin- ja kudosnäytteille suoritetaan täydellinen histopatologinen tutkimus.

b) Kaikki näkyvät vammat tutkitaan.

c) Muiden annosryhmien eläinten kohde-elimet tutkitaan.

d) Alhaisen ja keskitason annosryhmien eläinten keuhkot tutkitaan infektioiden löytämiseksi, koska niiden perusteella pystytään vaivattomasti arvioimaan eläinten terveydentila. Näiden ryhmien eläinten maksan ja munuaisten histopatologista tutkimusta voidaan myös harkita. Yleensä ei näiden ryhmien eläimille tarvitse suorittaa muita histopatologisia tutkimuksia, mutta elimet, jotka olivat vaurioituneet suurimman annoksen saaneessa ryhmässä, on aina tutkittava myös näiden ryhmien osalta.

e) Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä, histopatologinen tutkimus suoritetaan niille elimille ja kudoksille, joissa muiden ryhmien eläimillä ilmeni vaurioita.

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa, vammautuneiden eläinten määrä ja eläinten prosentuaalinen osuus kutakin erityyppistä vammaa kohden. Tulosten merkitsevyys arvioidaan jotakin tilastollista menetelmää käyttäen. Kaikki tunnetut tilastointimenetelmät ovat sallittuja.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio,

— koeolosuhteet,

— annostasot (käytetty liuotin) ja pitoisuudet,

— myrkkyvaikutukset sukupuolen ja annostason perusteella,

(1) Nykyisin seerumin alaniiniaminotransferaasi
(2) Nykyisin seerumin aspartaattiaminotransferaasi

— oireeton taso, mikäli mahdollista,
— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet sen päätyttyä,
— selostus myrkky- 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,
— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä,
— tulosten tilastointitapa,
— tulosten pohdinta,
— tulosten tulkinta.

3.2 **Arviointi ja tulkinta**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS

## TOISTUVA ANNOSTELU SUUN KAUTTA, 90 VRK, MUUT KUIN 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 annetaan päivittäin suun kautta asteittain suurenevina annoksina useille koe-eläinryhmille (muille kuin jyrsijöille) 90 vuorokauden aikana, niin että kukin ryhmä saa eri suuruisen annoksen. Antoaikana eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkytysoireiden toteamiseksi. Kokeen aikana kuolleille eläimille ja sen päättymisen jälkeen vielä elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Eläimet siirretään koetiloihin ja kokeen aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen kokeen alkua. Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin.

Testattavaa ainetta voidaan antaa ruoan mukana tai kapseleina, jos se on helpompaa. Muitakin suun kautta annettavia annostelutapoja voidaan käyttää. Samaa antotapaa tulee käyttää kaikille koe-eläimille koko kokeen ajan. Mikäli liuotinta tai muita lisäaineita käytetään annostelun helpottamiseksi, niiden myrkyttömyys täytyy olla tiedossa esimerkiksi aikaisempien tutkimustulosten perusteella.

*Koeolosuhteet*

Koe-eläimet

Kun koe tehdään jollakin muulla lajilla kuin jyrsijöillä, yleisimmin käytetty eläinlaji on koira, mieluimmin rotukoira. Muitakin eläinlajeja voidaan käyttää. Eläinten on oltava nuoria ja terveitä ja koiria käytettäessä annostus olisi aloitettava 4-6 kuukauden iässä ja viimeistään 9 kuukauden iässä. Mikäli subkrooninen oraalinen testi on tehty pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, samaa lajia/rotua olisi käytettävä kummassakin testissä.

Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään kahdeksan eläintä (neljä naarasta ja neljä urosta). Testin päättyessä eläimiä on oltava riittävästi, jotta myrkyllisyydestä voidaan tehdä luotettava arvio.

Annostasot

Kokeessa käytetään vähintään kolmea annostasoa sekä kontrolliryhmää, jolle ei anneta testattavaa ainetta, mutta jota käsitellään muuten aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä. Suurimman annoksen olisi aiheutettava myrkytysoireita, mutta ei kuolemantapauksia. Pienin annos ei saisi aiheuttaa

myrkytysoireita. Mikäli ihmisten altistumisesta on tietoja, pienimmän testiannoksen on oltava tätä suurempi. Keskimmäisen annostason olisi aiheutettava pienimmät havaittavissa olevat myrkytysoireet. Käytettäessä useampia väliannosasteita ne on porrastettava niin, että myrkytysoireet lisääntyvät asteittain.

Pienimmän ja keskisuuren annoksen saavissa ryhmissä sekä kontrolliryhmässä ei myöskään saisi esiintyä kuolemantapauksia.

Lievästi myrkyllisiä aineita testattaessa on varmistauduttava siitä, että testattavan aineen määrä ei vaikuta normaaliin ravinnon hyväksikäyttöön.

Kun testattavaa ainetta annetaan ruoan mukana, voidaan käyttää pysyvää pitoisuutta ruoassa (ppm tai mg/kg ruokaa) tai pysyvää annostasoa suhteessa eläimen ruumiinpainoon. On mainittava, kumpaa tapaa käytetään. Kun ainetta annetaan suoraan esimerkiksi kapseleina, annos annetaan samaan aikaan joka päivä ja sitä säädetään tarvittaessa viikottain, jotta annostaso pysyy muuttomattomana suhteessa eläimen painoon. Mikäli subkrooninen oraalinen testi on tehty pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, molemmissa on yleensä käytettävä samaa ruokavaliota.

Raja-annostesti

Jos 90 vuorokautta kestävän, jäljempänä selostetulla menetelmällä 1 000 mg/kg ruumiinpaino/päivä tai ihmisten altistumiseen perustuvalla suuremmalla annoksella tehdyn tutkimuksen tuloksena ei synny myrkyllisiä vaikutuksia, tutkimusta ei tarvitse jatkaa. Tutkittaessa lievästi myrkyllisiä aineita on syytä varmistua siitä, etteivät ruoan seassa annetut testattavat ainemäärät ja niiden ominaisuudet vaikuta eläimen ravinnon hyväksikäyttöön.

Tarkkailuaika

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja kaikki myrkytysoireet, niiden alkamisaika, voimakkuus ja kesto kirjataan. Kuolinaika ja myrkytysoireiden alkamis- ja loppumisaika kirjataan.

*Testin suorittaminen*

Eläimille tulisi antaa testattavaa ainetta mieluimmin viikon jokaisena päivänä 90 vuorokauden aikana. Lähinnä käytännön syistä pidetään kuitenkin hyväksyttävänä antaa testattavaa ainetta viitenä päivänä viikossa, mikäli annos annetaan muulla tavoin kuin ravinnon yhteydessä.

Eläinten tarkkailussa tulee kiinnittää huomiota ainakin seuraaviin kohtiin: muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Ruoankulutus mitataan viikottain (ja veden kulutus mikäli testattava aine annetaan juomavedessä) ja eläimet punnitaan viikottain.

Huolellinen kliininen tutkimus suoritetaan päivittäin ja tarvittaviin toimenpiteisiin ryhdytään, jotta eläimiä ei menettäisi testin aikana. Tutkimuksen päätyttyä kaikille eloonjääneille eläimille suoritetaan ruumiinavaus. Kuolemaisillaan olevat eläimet poistetaan välittömästi ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Seuraava tutkimus tehdään testin päätyttyä kaikille testiryhmien ja kontrolliryhmän eläimille:

a) Silmätutkimus on suoritettava oftalmoskoopilla tai vastaavalla laitteella ennen aineen antamista ja testin päätyttyä mieluimmin kaikille eläimille, mutta ainakin 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 hyytymismäärityksiä kuten hyytymisaika, protrombiiniaika, tromboplastiiniaika tai trombosyytit tehdään testin alussa, sen jälkeen joko kuukauden väliajoin tai testin puolivälissä sekä testiajanjakson päätyttyä.

c) Veren kliininen biokemiallinen tutkimus on suoritettava testin alussa, sen jälkeen joko kuukauden väliajoin tai testin puolivälissä sekä testiajanjakson päätyttyä. Kaikkiin tutkimuksiin soveltuvia määrityskohteita ovat elektrolyyttitasapaino, hiilihydraattien metabolia sekä, maksan ja munuaisten toiminta. Testien valintaperusteena on aineen todettu vaikutusmekanismi. Suositeltavia määrityskohteita ovat: kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, glukoosin paastoarvo (lajille/rodulle soveltuva paaston pituus), seerumin glutamiinipyruviinitransaminaasi(1), seerumin glutamiinioksaloasetaattitransaminaasi(2), ornitiinidekarboksylaasi, gammaglutamyylitranspeptidaasi, virtsan typpi, albumiini, veren kreatiniinin kokonaisbilirubiini ja seerumin proteiinit.

(1) Nykyisin seerumin alaniiniaminotransferaasi
(2) Nykyisin seerumin aspartaattiaminotransferaasi

Myrkyllisyyden arvioinnit auttavat tarvittaessa lipidi-, hormoni-, happo/emästasapaino-, methemoglobiini- ja kolinesteraasiaktiivisuuden analyysit. Muitakin kliinisiä biokemiallisia testejä voidaan tehdä, mikäli todettujen vaikutusten laajempi tutkimus on tarpeen. Muiden kuin jyrsijöiden on paastottava (korkeintaan vuorokausi) ennen verinäytteiden ottamista.

d) Virtsan analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu toksisuus antaa siihen aihetta.

Ruumiinavaus

Kaikille koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus, jossa tutkitaan ruumis ulkopuolelta, kaikki aukot, kallo-, rinta- ja vatsaontelo sekä niiden sisältö. Maksa, munuaiset, kilpirauhanen (sekä lisäkilpirauhanen) 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 mukaanlukien, pikkuaivokuori ja aivokuori, aivolisäke, kilpirauhanen/lisäkilpirauhanen, kateenkorvakudosta, (henkitorvi), keuhkot, sydän, aortta, sylkirauhaset, maksa, perna, munuaiset, lisämunuaiset, haima, sukupuolirauhaset, kohtu, (muut sukupuolielimet), (iho), sappirakko, ruokatorvi, mahalaukku, pohjukaissuoli, ohutsuoli, umpisuoli, paksusuoli, peräsuoli, virtsarakko, tyypillinen imusolmuke (naaraan rintarauhanen), (reisilihaksistoa), ääreishermo, (silmät), rintalaa luuytimineen, (reisiluu ja nivelen pintaa) sekä (selkärankaa kolmesta kohdasta - kaulasta, henkitorven keskiosasta ja lantiosta). Suluissa olevat kudokset tutkitaan vain, jos ne tai kohde-elimet osoittavat merkkejä myrkyllisyydestä.

Histopatologinen tutkimus

Suurimman annoksen saaneesta ryhmästä sekä kontrolliryhmästä otetuille elin- ja kudosnäytteille tehdään täydellinen histopatologinen tutkimus. Muiden ryhmien osalta tutkitaan elimet, jotka suurimman annoksen saaneessa ryhmässä olivat vaurioituneet tai mikäli kliininen tutkimus viittaa tutkimustarpeeseen.

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin 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:

— lajin rotu tai kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ruokavalio,

— koeolosuhteet,

— annostasot (käytetty liuotin) ja pitoisuudet,

— myrkytysoireet sukupuolen ja annostason perusteella,

— oireeton taso, mikäli mahdollista,

— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet sen päätyttyä,

— selostus myrkky- ja muista vaikutuksista (erityisesti kliiniset löydökset),

— 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,

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— tulosten tilastointitapa,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 **Arviointi ja tulkinta**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# 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*

Koe-eläimet

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.

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 (viikottain 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 välianno-stasoja 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.

*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 viikottain. Tarkkailua on suoritettava säännöllisesti, jotta koe-eläimiä ei menetettäisi kannibalismin, kudosten autolyysin tai virheellisen sijoituksen vuoksi. Tutkimuksen päätyttyä eloonjääneille eläimille satelliittiryhmää lukuunottamatta 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.

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 mukaanlukien, 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), (rintalaa 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.

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.

(1) Nykyisin seerumin alaniiniaminotransferaasi
(2) Nykyisin seerumin aspartaattiaminotransferaasi

## 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,

— 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.

# SUBKROONINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS (HENGITYSTEIDEN KAUTTA)

## TOISTUVA ANNOSTELU HENGITYSTEIDEN 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

Koe-eläinryhmät altistetaan päivittäin tietyksi ajaksi testattavalle aineelle asteittain suurenevina annoksina 90 vuorokauden aikana siten, että kukin ryhmä saa eri suuruisen annoksen. Jos käytetään liuotinta sopivan ilmaseospitoisuuden aikaansaamiseksi, tutkimuksessa on käytettävä liuotinkontrolliryhmää. Tutkimuksen kuluessa eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkyllisyysoireiden toteamiseksi. Testin aikana kuolleille eläimille ja sen päättymisen jälkeen vielä elossa oleville eläimille suoritetaan ruumiinavaus.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Eläimet siirretään koetiloihin ja tutkimuksen aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen tutkimuksen alkua. Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin. Testattaviin aineisiin voidaan tarpeen mukaan lisätä liuotinta, jotta saadaan halutun pitoinen ilmaseos. Mikäli liuotinta tai muita lisäaineita käytetään annostelun helpottamiseksi, niiden myrkyttömyys täytyy olla tiedossa esimerkiksi aikaisempien tutkimustulosten perusteella.

*Koeolosuhteet*

Koe-eläimet

Rotta on suositeltavin laji, ellei sen käyttö ole kontraindikoitu. Koe-eläimiksi valitaan yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä rottia. Tutkimuksen alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % tavanomaisesta keskiarvosta. Mikäli pitkäaikaistutkimuksen esitestinä tehdään subkrooninen hengitysteiden kautta tapahtuva altistumistesti, kummassakin kokeessa on käytettävä samaa eläinlajia ja -kantaa.

Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 20 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 vuorokauden ajan tutkimuksen päätyttyä myrkytysoireiden ohimenevyyden, pysyvyyden tai viivästyneen esiintymisen toteamiseksi.

Annostasot

Kokeessa käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää tai liuotinkontrolliryhmää (jolle annostellaan liuotinta suurimman annoksen sisältävän liuotinmäärän verran). Kontrolliryhmän eläimiä käsitellään aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi että niille ei annetta testattavaa ainetta. Suurimman annoksen olisi aiheutettava myrkytysoireita, mutta ei lainkaan tai hyvin vähän kuolemantapauksia. Mikäli altistusannoksesta ihmisillä on tietoja, pienimmän testiannoksen on oltava tätä suurempi. Keskimmäinen annostaso olisi säädettävä sellaiseksi, että se aiheuttaa vähäisimmät havaittavissa olevat myrkytysoireet. Käytettäessä useampia väliannostasoja ne on porrastettava niin, että myrkkyvaikutukset lisääntyvät asteittain. Pienimmän ja keskisuuren annoksen saavissa ryhmissä sekä kontrolliryhmässä kuolemantapausten luvun on oltava pieni, jotta tuloksista voidaan tehdä luotettava arviointi.

Altistusaika

Päivittäinen altistusaika on kuusi tuntia hengityskammion tasapainotuksen jälkeen. Erityistapauksissa aika voi vaihdella.

Laitteet

Eläinten testauksiin käytetään inhalaatiolaitetta, jonka dynaamisessa ilmavirrassa ilma vaihtuu vähintään 12 kertaa tunnissa, jotta hapen ja tasaisesti jakautuneen altistusaineen saanti voidaan varmistaa. Jos tutkimuksessa käytetään kammiota, sen on oltava suunniteltu siten, että koe-eläimet voidaan sijoittaa mahdollisimman väljästi, ja että ne joutuvat hengittämään mahdollisimman tehokkaasti testattavaa ainetta. Yleissääntönä kammion ilman pitämiseksi vakaana on, että koe-eläinten viemä tila on korkeintaan 5 % kammion tilavuudesta. Eläimen sieraimet ja suu, yksinomaan pää tai koko ruumis voidaan altistaa yksittäiskammiossa; kaksi ensin mainittua tapaa vähentävät testattavan aineen imeytymistä muulla tavoin.

Tarkkailuaika

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin testin ja toipumisen aikana myrkytysoireiden toteamiseksi. Kuolinaika ja myrkkyvaikutusten alkamis- ja loppumisaika kirjataan.

*Testin suorittaminen*

Eläimet altistetaan testattavalle aineelle päivittäin viidestä seitsemään päivänä viikossa 90 vuorokauden ajan. Mikäli tutkimukseen kuuluu seurantatarkkailuun tarkoitettu satelliittiryhmä, sitä tarkkaillaan vielä 28 päivän ajan altistamisen jälkeen myrkkyvaikutusten ohimenevyyden tai pysyvyyden toteamiseksi. Testin aikana lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suositeltavin suhteellinen kosteus on 30-70 %, mutta tietyissä tapauksissa (esim. aerosolitesteissä) tämä ei ole mahdollista käytännössä. Altistamisen aikana ei anneta ruokaa eikä vettä.

Testissä on käytettävä dynaamista inhalointimenetelmää, jossa on analyyttinen pitoisuuden valvontajärjestelmä. Esitestaus on suositeltavaa tarvittavien altistuspitoisuuksien määrittämiseksi. Ilman virtaus säädetään siten, että olosuhteet ovat homogeeniset altistuskammion joka kohdassa. Vakaisiin altistusolosuhteisiin on päästävä mahdollisimman lyhyessä ajassa.

Seuraavat mittaukset tai tarkkailutoimenpiteet on suoritettava:

a) ilmavirran nopeus (jatkuva tarkkailu),

b) testattavan aineen todellinen hengityskohdassa mitattu pitoisuus. Päivittäisen altistuksen aikana pitoisuuden vaihtelu saa olla korkeintaan ± 15 % keskiarvosta. Testattaessa pölyjä ja aerosoleja tämän tason saavuttaminen voi olla vaikeaa ja tällöin hyväksytään suurempi poikkeama. Päivittäisten pitoisuuksien olisi pysyttävä mahdollisimman vakaina koko tutkimuksen ajan. Hiukkas-ja aerosolitestauksissa hiukkasten koko on mitattava tarvittaessa hiukkasten koko jakautuman selvittämiseksi,

c) lämpötila ja kosteus,

d) altistamisen aikana ja sen jälkeen eläimiä tarkkaillaan ja huomiot kirjataan järjestelmällisesti. Jokaisesta eläimestä pidetään erikseen kirjaa. Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja kaikki myrkytysoireet, niiden alkamisaika, voimakkuus ja kesto kirjataan. Eläimiä tarkkailtaessa on kiinnitettävä huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä, limakalvoissa, hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa ja käyttäytymistavassa. Eläimet punnitaan viikottain ja viikottainen ruoan kulutus mitataan. Tarkkailu on suoritettava säännöllisesti, jotta koe-eläimiä ei

menetettäisi kannibalismin, kudosten autolyysin tai virheellisen sijoituksen vuoksi. Tutkimuksen päätyttyä eloonjääneille eläimille suoritetaan ruumiinavaus. Kuolemaisillaan olevat eläimet poistetaan ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Seuraavat tutkimukset tehdään kokeen päätyttyä kaikille eläimille, mukaan lukien kontrolliryhmän eläimet:

a) Silmätutkimus on suoritettava oftalmoskoopilla tai vastaavalla laitteella ennen aineelle altistusta ja tutkimuksen päätyttyä mieluimmin kaikille eläimille, mutta ainakin korkeimman 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.

c) Veren kliininen biokemiallinen tutkimus on suoritettava tutkimusajan 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 tarvittaessa esimerkiksi lipidi-, hormoni-, happo/emästasapaino-, methemoglobiini- ja kolinesteraasiaktiivisuuden analyysit. Muitakin kliinisiä biokemiallisia testejä voidaan tehdä, mikäli todettujen vaikutusten laajempi tutkimus on tarpeen.

d) Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun odotettu 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: näkyviä vammoja sisältävät kohteet, keuhkot - jotka olisi poistettava kokonaisina, punnittava ja käsiteltävä jollakin fiksatiivilla, jotta keuhkojen rakenne säilyy (fiksatiiviperfuusio on tehokas menetelmä), nenänielun kudokset, aivot - ytimen/ aivosillan osat mukaanlukien, pikkuaivokuori ja aivokuori, aivolisäke, kilpirauhanen/lisäkilpirauhanen, kateenkorvakudosta, henkitorvi, keuhkot, sydän, aortta, sylkirauhaset, maksa, perna, munuaiset, lisämunuaiset, haima, sukupuolirauhaset, kohtu, (muut sukupuolielimet), (iho), sappirakko (jos on), ruokatorvi, mahalaukku, pohjukaissuoli, ohutsuoli, umpisuoli, paksusuoli, peräsuoli, virtsarakko, tyypillinen imusolmuke (naaran rintarauhanen), (reisilihaksistoa), ääreishermo, (silmät), rintalaa luuytimineen, (reisiluu ja nivelen pintaa) sekä (selkärankaa kolmesta kohdasta - kaulasta, henkitorven keskiosasta ja lantiosta). Suluissa olevat kudokset tutkitaan vain, jos ne tai kohde-elimet osoittavat merkkejä myrkyllisyydestä.

Histopatologinen tutkimus

a) Suurimman annoksen saaneen ryhmän ja kontrolliryhmän eläinten hengitystiet sekä elin- ja kudosnäytteet tutkitaan tarkoin.

b) Kaikki näkyvät vammat tutkitaan.

c) Muiden annosryhmien eläinten kohde-elimet on myös tutkittava.

d) Alhaisen ja keskitason annosryhmien eläinten keuhkot tutkitaan histopatologisesti, koska näin 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.

(1) Nykyisin seerumin alaniiniaminotransferaasi
(2) Nykyisin seerumin aspartaattiaminotransferaasi

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin 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:

*Altistamislaitteen kuvaus:* merkki, tyyppi, mitat, ilmanlähde, hiukkasten ja aerosolien tuottamistapa, ilmastointitapa, poistoilman käsittelytapa ja eläinten sijainti koekammiossa altistamisen aikana. Lämpötilan, kosteuden, ja tarvittaessa hiukkasten koon ja aerosolin pitoisuuden mittaustapa on mainittava.

*Altistamistiedot:* Altistamistiedot laaditaan taulukon muotoon, jossa esitetään keskiarvo ja poikkeamat (esim. keskihajonta) ja, mikäli mahdollista, seuraavat tiedot:

a) ilmavirran nopeus inhalaatiolaitteessa,

b) ilman lämpötila ja kosteus,

c) nimellispitoisuudet (inhalaatiolaitteeseen asetetun testattavan aineen kokonaismäärä jaettuna ilman tilavuudella),

d) käytetty liuotin,

e) todelliset pitoisuudet hengitysalueella,

f) hiukkasten keskikoko (tarvittaessa),

— 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 niiden tulokset,

— kliiniset biokemialliset testit ja niiden tulokset (myös virtsa-analyysitulokset),

— ruumiinavauslöydökset,

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— tulosten tilastointitapa,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# TERATOGEENISUUSTUTKIMUS, JYRSIJÄT JA MUUT KUIN 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 annetaan päivittäin asteittain suurenevina annoksina tai pitoisuuksina useille kantavista eläimistä koostuville koe-eläinryhmille raskausaikana ainakin alkion organogeneesin ajan siten, että kukin ryhmä saa eri suuruisen annoksen. Vähän ennen laskettua synnyttämisajankohtaa emo lopetetaan, kohtu poistetaan ja sen sisältö tutkitaan. Tällä testausmenetelmällä tutkitaan myrkkyvaikutuksia alkioon ja sikiöön.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Terveet, nuoret, sukukypsät, pariutumattomat naaraat, jotka ovat samanikäisiä ja -kokoisia, siirretään koetiloihin vähintään viisi päivää ennen kokeen alkua. Sen jälkeen ne pariutetaan urosten kanssa, joiden hedelmällisyys on tutkittu. Siemennyksen jälkeen naaraat jaetaan satunnaisesti koeryhmiin.

Siemennys voi tapahtua joko luonnollisesti tai keinosiementämällä. Testattavan aineen päivittäinen annostelu aloitetaan pian siemennyksen jälkeen ja sitä jatketaan organogeneesin ajan. Päivää ennen raskauden päättymistä kohtu poistetaan ja sikiöt tutkitaan sisäelinten ja luuston kehityshäiriöiden, kasvun ja luun muodostuksen hidastumisen sekä suoliston verenvuotojen toteamiseksi.

*Koeolosuhteet*

Koe-eläimet

Rotta, hiiri, hamsteri ja kani ovat yleisesti käytettyjä eläinlajeja. Suositeltavimmat lajit ovat rotta ja kani. Yleisesti käytettyjä laboratoriokantoja on käytettävä. Kannan hedelmällisyys ei saa olla alhainen ja teratogeenisuusvasteen on oltava hyvä. Eläimet on säilytettävä yksittäishäkeissä.

Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa varten tarvitaan vähintään 20 kantavaa rottaa, hiirtä tai hamsteria tai 12 kania. On varmistauduttava siitä, että tutkimukseen saadaan tarvittava määrä poikueita ja poikasia aineen teratogeenisten ominaisuuksien arvioimiseksi.

Annostasot

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää. Jos käytetään liuotinta aineen annostelussa, on perustettava myös liuotinkontrolliryhmä. Liuottimen myrkkyvaikutusten olisi oltava tiedossa; sillä ei saisi olla teratogeenisia eikä lisääntymiseen vaikuttavia ominaisuuksia. Kontrolliryhmän (ryhmien) eläimiä käsitellään aivan samoin kuin testiryhmän eläimiä, paitsi ettei niille anneta

testattavaa ainetta. Elleivät aineen fysikaalis-kemialliset tai biologiset ominaisuudet aiheuta rajoituksia, suurimman annoksen olisi aiheutettava emossa joitakin näkyviä myrkkyvaikutuksia kuten lievää painon menetystä, mutta korkeintaan 10 % kuolemantapauksia. Pienimmällä annoskoolla ei olisi oltava havaittavia testattavasta aineesta johtuvia vaikutuksia. Keskimmäinen annostaso/keskimmäiset annostasot olisi säädettävä geometrisesti suurimman ja pienimmän koon väliin.

Raja-annostesti

Jos vähintään 1 000 mg/kg ei aiheuta sikiössä myrkkyvaikutuksia tai teratogeenisuutta, kun tutkitaan lievästi myrkyllisiä aineita, muita annostasoja ei tarvitse tutkia.

Altistusaika

Jos on mahdollista todeta kohdunkaulan tulppa tai spermaa, toteamispäivä on 0-päivä. Annosteluajan tulee kattaa suurin osa organogeneesistä. Tänä voidaan rotalla ja hiirellä pitää päiviä 6-15, hamsterilla päiviä 6-14 ja kanilla päiviä 6-18. Mikäli 0-päiväksi katsotaan parittelu- tai keinosiemennyspäivä, näihin aikoihin on lisättävä yksi päivä. Vaihtoehtoisesti annostusaikaa voidaan pidentää raskauden päättymistä edeltävään päivään.

Tarkkailuaika

Huolellinen kliininen tutkimus on suoritettava vähintään kerran päivässä. Sen ohella tarkkailua on suoritettava päivittäin ja toimenpiteisiin ryhdyttävä tarvittaessa, jotta tutkimuksesta ei menetettäisi eläimiä.

*Testin suorittaminen*

Testattavaa ainetta annetaan suun kautta ruokintaletkulla. Annos tulee antaa suunnilleen samaan aikaan joka päivä.

Naaraspuolisille koe-eläimille annetaan testattavaa ainetta päivittäin tutkimusajan päättymiseen saakka. Annoksen määritysperusteena voidaan käyttää naaraiden painoa annostelun alkaessa. Koska raskauden aikana paino nousee nopeasti, vaihtoehtona on punnita eläimet määräajoin ja mitoittaa annos viimeisen punnituksen perusteella. Myrkytysoireet ja niiden voimakkuus sekä alkamis- ja kestoaika kirjataan. Naaraat, jotka osoittavat oireita abortoimisesta tai ennenaikaisesta synnyttämisestä, lopetetaan ja niille suoritetaan huolellinen makroskooppinen tutkimus. Altistamisen jälkeistä tarkkailuaikaa olisi jatkettava suunnilleen raskauden viimeistä edelliseen päivään. Tarkoituksena on kattaa suurin osa raskausajasta, mutta välttää luonnollisen synnytyksen aiheuttamia tulosten tulkintavaikeuksia. Eläinten tarkkailuun on sisällyttävä vähintään seuraava kohteet: muutokset, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa sekä käyttäytymistavassa. Ruoan kulutus mitataan ja eläimet punnitaan viikottain.

Ruumiinavaus

Tutkimuksen kuluessa tai sen jälkeen kuolleet emot tutkitaan paljain silmin havaittavien, raskauteen mahdollisesti vaikuttavien rakenteellisten tai patologisten muutosten toteamiseksi. Kohtu poistetaan välittömästi emon lopettamisen jälkeen ja alkio- ja sikiökuolemat sekä elävien sikiöiden määrä todetaan. Kohtukuolemien ajankohta on yleensä mahdollista määrittää. Rottien ja kanien munasarjojen keltarauhasten lukumäärä voidaan määrittää. Sikiöiden sukupuoli määritetään, kukin sikiö punnitaan, paino kirjataan ja keskimääräinen sikiöpaino lasketaan. Ulkoinen tutkimus suoritetaan kullekin sikiölle. Rottien, hiirien ja hamstereiden poikueista kolmannes tai puolet preparoidaan ja niistä tutkitaan luuston poikkeamat ja jäljelle jäävät sikiöt preparoidaan ja niistä tutkitaan kudosten poikkeamat tavanomaisia menetelmiä käyttäen. Kanien jokaiselle sikiölle suoritetaan dissektio ja sisäelinten poikkeamat ja luuston epämuodostumat tutkitaan.

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa, kantaviksi tulleiden eläinten määrä, elossa olleiden sikiöiden sekä sikiöiden, joissa havaittiin kudos- tai luustopoikkeamia, lukumäärä ja prosentuaalinen osuus kutakin poikuetta 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,

— myrkyllisyysvasteen tulokset annostasoittain,

— 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,

— raskauden kesto ja poikuetta koskevat tiedot (myöskin taustatiedot tutkimusta edeltävältä ajalta),

— sikiötä koskevat tiedot (elossa/kuollut, kudos- ja luustovauriot),

— poikueita koskevat tiedot (elossa/kuollut, kudos- ja luustovauriot kunkin poikueen osalta),

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# KROONINEN MYRKYLLISYYSTESTI

## 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 valittua antotapaa käyttäen yleensä viikon jokaisena päivänä useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta, niin että kukin ryhmä saa eri suuruisen annoksen. Antoaikana ja sen päätyttyä eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkkyvaikutusten toteamiseksi.

### 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.

*Koeolosuhteet*

Koe-eläimet

Rotta on suositeltavin laji. Aikaisempien tutkimusten perusteella voidaan valita jokin muu laji (jyrsijä tai muu laji). Koe-eläimiksi valitaan yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä eläimiä ja annostelu aloitetaan niin pian kuin mahdollista vierotuksen jälkeen.

Testin alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskiarvosta. Mikäli subkrooninen testi suun kautta annosteltuna on tehty pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, samaa lajia ja kantaa on käytettävä kummassakin tutkimuksessa.

Lukumäärä ja sukupuoli

Kun tutkimuksessa käytetään jyrsijöitä, kutakin annostasoa ja kontrolliryhmää varten tarvitaan vähintään 40 eläintä (20 naarasta ja 20 urosta). Naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla kantavia. Mikäli tutkimussuunnitelma edellyttää eläinten lopettamista tutkimuksen kuluessa, eläinmäärään on lisättävä lopetettaviksi aiottujen eläinten määrä.

Tutkittaessa muita kuin jyrsijöitä voidaan käyttää pienempää eläinmäärää. Kussakin ryhmässä on kuitenkin oltava vähintään neljä eläintä kumpaakin sukupuolta.

Annostasot ja altistustiheys

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää. Suurimman annoksen olisi aiheutettava selkeitä myrkytysoireita mutta vähän kuolemantapauksia. Pienimmällä annoksella ei saisi olla myrkkyvaikutusta.

Väliannostaso (tasot) on porrastettava ylimmän ja alimman annoksen keskiväliin.

Annostasojen valinnassa on otettava huomioon aikaisemmista myrkyllisyystesteistä ja -tutkimuksista saadut tulokset.

Eläimet altistetaan tavallisesti päivittäin. Mikäli kemikaalia annostellaan juomaveteen tai ravintoon sekoitettuna, niitä on oltava jatkuvasti saatavilla.

Kontrollit

Tutkimuksessa on käytettävä kontrolliryhmää, joka on aivan samanlainen kuin tutkimusryhmät, paitsi että sille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Erityistapauksissa, esimerkiksi aerosoleihin liittyvissä inhalaatiotutkimuksissa tai kun suun kautta annosteltavaa ainetta tutkittaessa käytetään emulgaattoria, jonka biologiset ominaisuudet eivät ole tiedossa, tutkimukseen tulee liittää myös negatiivinen kontrolliryhmä. Negatiivista kontrolliryhmää käsitellään aivan samalla tavalla kuin tutkimusryhmiä, paitsi ettei sitä altisteta tutkittavalle aineelle eikä liuottimelle.

Annostelutapa

Kaksi pääasiallisesti käytettyä annostelutapaa ovat altistus suun kautta ja hengitysteiden kautta. Valinta riippuu testattavan aineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista sekä ihmisten todennäköisestä altistumistavasta.

Ihon kautta altistamiseen liittyy huomattavia käytännön ongelmia. Johtopäätökset ihon kautta imeytymisestä johtuvasta kroonisista systeemisistä myrkkyvaikutuksista voidaan yleensä tehdä suun kautta annosteltua ainetta koskevan testin sekä niiden tietojen perusteella, joita ihon kautta imeytymisestä on saatu aikaisemmista testeistä, joissa aineen myrkyllisyyttä ihon kautta annosteltuna on testattu.

Tutkimukset, joissa annostelu tapahtuu suun kautta

Kun testattava aine imeytyy ruoansulatuskanavasta sen ollessa myös ihmisten todennäköinen altistumistapa, suun kautta annostelu on paras tapa, ellei kontraindikaatioita ole.

Testattavaa ainetta voidaan antaa eläimille ravinnon yhteydessä, juomaveteen liuotettuna tai kapseleina.

Eläimille olisi annetteva testattavaa ainetta viikon jokaisena päivänä, koska annostus viitenä päivänä viikossa voi aiheuttaa myrkyllisyysoireiden häviämisen tai niistä toipumisen sen ajan kuluessa, jolloin ainetta ei anneta, ja näin vaikuttaa tuloksiin ja niiden tulkintaan. Lähinnä käytännön syistä annostelu viitenä päivänä viikossa voidaan kuitenkin hyväksyä.

Tutkimukset, joissa annostelu tapahtuu hengitysteiden kautta.

Koska altistus hengitysteiden kautta on teknisesti paljon ongelmallisempi kuin muut altistustavat, seuraavassa selostetaan tarkemmin tätä altistustapaa. On myös huomattava, että aineen tiputus henkitorveen voi joissakin tapauksissa olla hyväksyttävä vaihtoehto.

Pitkäaikaisaltistukset suunnitellaan yleensä ihmisten todennäköisen altistumistavan perusteella. Eläimet altistetaan hengityskammion tasapainotuksen jälkeen joko kuudeksi tunniksi päivittäin viitenä päivänä viikossa (jaksoittainen altistus) tai todennäköisen ympäristöaltistustavan perusteella 22-24 tuntia vuorokaudessa viikon jokaisena päivänä (jatkuva altistus), jolloin eläimillä on noin tunnin mittainen ruokailuaika samaan aikaan joka päivä. Kummassakaan tapauksessa eläimien saaman testattavan aineen pitoisuutta ei yleensä muuteta. Jaksoittaisen ja jatkuvan altistuksen pääasiallinen ero on, että jaksoittaisessa altistuksessa eläimillä on 17-18 tuntia aikaa toipua päivittäisestä altistuksesta ja viikonloppuisin vielä tätäkin pidempi toipumisaika.

Jaksoittaisen tai jatkuvan altistuksen valinta riippuu tutkimuksen tavoitteista ja siitä, mitä ihmisten altistumistapaa simuloidaan. Tietyt tekniset vaikeudet on joka tapauksessa otettava huomioon. Esimerkiksi eläinten syöttäminen ja juottaminen altistuksen aikana ja monimutkaisemmat (ja luotettavammat) laitteet aerosolien ja höyryn tuottamiseksi sekä niiden valvonta voivat aiheuttaa ongelmia, jotka ovat merkittävämpiä kuin ympäristöolosuhteiden simuloimiseksi valitun jatkuvan altistuksen edut.

Altistuskammiot

Eläinten testauksiin käytetään inhalaatiokammiota, jonka dynaamisessa ilmavirrassa ilma vaihtuu vähintään 12 kertaa tunnissa, jotta hapen ja tasaisesti jakautuneen altistamisaineen saanti voidaan varmistaa. Testattavalle aineelle tapahtuvaa altistusta lukuun ottamatta kontrolli- ja altistuskammioiden on oltava rakenteeltaan yhdenmukaisia. Kammiossa on yleensä lievä negatiivinen paine, jotta testattavaa ainetta ei pääsisi vuotamaan ympäristöön. Kammioissa on oltava riittävästi tilaa eläimille. Yleissääntönä kammion ilman pitämiseksi vakaana on, että koe-eläinten viemä tila on korkeintaan 5 % kammion tilavuudesta.

Seuraavat mittaukset tai valvontatoimenpiteet on suoritettava:

i) Ilman virtaus: ilman virtausnopeutta kammion läpi on tarkkailtava jatkuvasti,

ii) Pitoisuus: päivittäisen altistuksen aikana pitoisuuden vaihtelu saa olla korkeintaan ± 15 % keskiarvosta,

iii) Lämpötila ja kosteus: lämpötilan on oltava 22 ± 2 °C ja kammion kosteuden 30-70 %, paitsi milloin testattavaa ainetta suspensoidaan veden avulla kammion ilmaan. Molempia arvoja on jatkuvasti tarkkailtava,

iv) Hiukkasten koon mittaukset: kun testataan nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja, kammion ilmassa olevien hiukkasten koko on määritettävä. Aerosolihiukkasten on oltava kooltaan koe-eläinten hengitykselle sopivia. Näytteet kammion ilmasta on otettava eläinten hengitysalueelta. Otoksen on oltava edustava näyte testattavan aineen hiukkasten jakautumisesta ja gravimetrisesti myös kaikista aerosolin suspensiohiukkasista, vaikka suuri osa aerosolista ei joudu hengitykseen. Hiukkasten koosta on tehtävä analyysi useita kertoja hiukkasten tuottoa säädettäessä ja sen jälkeen koe-eläinten altistuksen aikana niin usein kuin tarvitaan hiukkasten jakautumisen vakaana pysymisen varmistamiseksi.

Tutkimuksen kesto

Altistusajan on oltava vähintään yksi vuosi.

*Testin suorittaminen*

Tarkkailu

Huolellinen kliininen tutkimus on suoritettava ainakin kerran päivässä. Sen ohella eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja toimenpiteisiin ryhdytään tarvittaessa, jotta tutkimuksesta ei menetettäisi eläimiä. Kuolleet eläimet pakastetaan tai niille suoritetaan ruumiinavaus ja heikot tai kuolemaisillaan olevat eläimet eristetään tai lopetetaan. Myrkytysoireiden puhkeamista ja kehittymistä tarkkaillaan ja sairauden, autolyysin tai kannibalismin aiheuttamat menetykset pyritään pitämään mahdollisimman vähäisinä.

Kunkin eläimen osalta kirjataan kliiniset oireet, neurologiset ja silmän muutokset sekä kuolleisuus. Myrkkyvaikutusten puhkeaminen ja kehitys sekä epäillyt kasvaimet kirjataan.

Kunkin eläimen paino kirjataan kerran viikossa tutkimusajan 13 ensimmäisen viikon aikana ja sen jälkeen vähintään kerran neljässä viikossa. Ravinnon kulutus mitataan viikottain 13 ensimmäisen viikon aikana ja sen jälkeen noin kolmen kuukauden välein, ellei eläinten terveydentila tai painon muutokset edellytä useampia määrityksiä.

Veritutkimus

Veritutkimus (esim. hemoglobiini, puna- ja valkosolujen määrä, trombosyytit tai jokin muu hyytymisominaisuusmääritys) on tehtävä kolmen ja kuuden kuukauden kuluttua ja sen jälkeen noin kuuden kuukauden välein. Tutkimuksen päätyttyä otetaan verinäyte kunkin ryhmän osalta 10 uros- ja 10 naaraspuolisesta rotasta ja kaikista muiden lajien koe-eläimistä. Jos mahdollista, näytteet on otettava joka kerta samoista rotista. Muista kuin jyrsijöistä otetaan tämän lisäksi näyte ennen tutkimuksen alkua.

Mikäli kliiniset havainnot viittaavat eläinten terveydentilan huononemiseen tutkimuksen kuluessa, näiden eläinten verenkuva on tutkittava.

Suurimman annoksen saaneen ryhmän ja kontrolliryhmän eläinten verenkuva tutkitaan. Pienempiä annoksia saaneiden ryhmien osalta verenkuva tutkitaan vain, jos suurimman annosryhmän ja kontrolliryhmän välillä on suuri ero tai jos patologiset löydökset edellyttävät sen tutkimista.

Virtsa-analyysi

Virtsanäyte otetaan kunkin ryhmän osalta jos mahdollista samoin välein ja samalta 10 uros- ja 10 naaraspuoliselta rotalta, jolta otettiin verinäyte, ja kaikilta muiden lajien koe-eläimiltä. Seuraavat määritykset on tehtävä joko kunkin eläimen näytteestä tai jyrsijöiden osalta sukupuolen ja ryhmän perusteella yhdistetystä näytteestä:

— ulkonäkö: määrä ja tiheys kunkin eläimen osalta,

— proteiinit, glukoosi, ketonit, veri (semikvantitatiivisesti),

ja

— sakan mikroskooppitutkimus (semikvantitatiivisesti).

Kliininen kemia

Otetaan verinäytteetnoin kuuden kuukauden välein mieluimmin joka kerta samalta 10 uros- ja 10 naaraspuoliselta rotalta ja kaikilta muiden lajien koe-eläimiltä kliinisen kemian määrityksiä varten. Muilta kuin jyrsijöiltä otetaan lisäksi näyte ennen tutkimuksen alkua. Näytteiden plasmasta tehdään seuraavat määritykset:

— kokonaisproteiinipitoisuus,

— albumiinipitoisuus,

— maksakokeet esim. alkaalifosfataasin, glutamiinipyruviinitransaminaasin(1), glutamiinioksaloasetaattitransaminaasin(2) toiminta, gammaglutamyylitranspeptidaasi, ornitiinidekarboksylaasi,

— hiilihydraattien metabolia, esim. glukoosin paastoarvo,

— munuaisten toiminta, esim. veren ureatyppi.

Ruumiinavaus

Kaikille, myös tutkimuksen kuluessa kuolleille tai huonokuntoisuuden vuoksi lopetetuille koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus. Ennen eläinten lopettamista niistä otetaan verinäytteet verenkuvan määritystä varten. Kaikki paljain silmin havaittavat vammat, kasvaimet tai kasvaimeksi epäillyt kohteet säilytetään. Silmämääräiset havainnot on pyrittävä korreloimaan mikroskooppisiin löydöksiin.

Kaikki elimet ja kudokset on säilytettävä histopatologista tutkimusta varten. Tämä koskee yleensä seuraavia elimiä ja kudoksia: aivot(3),(ydin/aivosilta, pikkuaivokuori ja aivokuori), aivolisäke, kilpirauhanen (sekä lisäkilpirauhanen), kateenkorva, keuhkot (ja henkitorvi), sydän, aortta, sylkirauhaset, maksa(3), perna, munuaiset(3), lisämunuaiset(3), ruokatorvi, mahalaukku, pohjukaissuoli, ohutsuoli, umpisuoli, paksusuoli, peräsuoli, kohtu, virtsarakko, imusolmukkeet, haima, sukupuolirauhaset(3), muut sukupuolielimet, naaraan rintarauhanen, iho, lihakset, ääreishermo, selkärankaa (kaulasta, henkitorven keskiosasta ja lantiosta), rintalaa luuytimineen, reisiluu (nivelineen) sekä silmät. Keuhkojen ja virtsarakon täyttäminen fiksatiivilla on näiden elinten paras säilytystapa, keuhkojen täyttäminen hengitystietutkimuksissa on välttämätöntä, jotta tarvittava histopatologinen tutkimus voidaan suorittaa. Erityistutkimuksissa, kuten altistustesteissä hengitysteiden kautta, koko hengityselimistö mukaan lukien nenä, nielu ja kurkunpää, tulee tutkia.

Tehtäessä muita kliinisiä tutkimuksia niiden tulosten on oltava selvillä ennen mikroskooppitutkimusta, koska niistä saattaa olla patologille merkittävää apua.

Histopatologinen tutkimus

Kaikki näkyvät muutokset, erityisesti jossakin elimessä esiintyvät kasvaimet tai muut vammat tulee tutkia mikroskooppisesti. Lisäksi suositellaan seuraavia toimenpiteitä:

a) Kaikkien säilytettyjen elinten ja kudosten mikroskooppinen tutkimus ja selostus kaikista vammoista:

   1 tutkimuksen aikana kuolleiden tai lopetettujen eläinten osalta,

   ja

   2 kaikkien suurimman annoksen ryhmän eläinten ja kontrolliryhmän eläinten osalta.

b) Alempien annosryhmien eläinten elimet tai kudokset, joissa esiintyi testattavasta aineesta aiheutuneita tai mahdollisesti aiheutuneita poikkeavuuksia, tutkitaan niin ikään.

c) Jos testi osoittaa, että eläinten normaali elinikä on huomattavasti lyhentynyt tai sen tuloksena on syntynyt myrkkyvasteeseen vaikuttavia seurauksia, lähinnä alempi annostaso on tutkittava yllä selostetulla tavalla.

d) Tiedot tutkimuksessa käytetyssä eläinkannassa samoissa laboratorio-olosuhteissa yleisesti ilmenevistä vammoista eli aikaisemmat tarkkailutulokset ovat välttämätön tietolähde, jotta altistetuissa koe-eläimissä ilmenneiden muutosten merkitsevyys pystytään arvioimaan.

(1) Nykyisin seerumin alaniiniaminotransferaasi
(2) Nykyisin seerumin aspartaattiaminotransferaasi
(3) Nämä elimet, 10 jyrsijästä ryhmää ja sukupuolta kohden ja kaikista muista eläimistä, sekä muiden eläinten kilpirauhanen (ja lisäkilpirauhanen), on punnittava

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä kokeen alussa, vammautuneiden eläinten määrä ja eläinten prosentuaalinen osuus kutakin 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:

Altistamislaitteen kuvaus:

merkki, tyyppi, mitat, ilmanlähde, hiukkasten ja aerosolien tuottamistapa, ilmastointitapa, poistoilman käsittelytapa ja eläinten sijainti koekammiossa altistamisen aikana. Lämpötilan, kosteuden, hiukkasten koon ja aerosolin pitoisuuden mittaustapa on mainittava.

Altistamistiedot:

Altistamistiedot laaditaan taulukkomuotoon, jossa esitetään keskiarvo ja poikkeamat (esim. keskihajonta) ja seuraavat tiedot:

a) ilmavirran nopeus inhalaatiolaitteessa,

b) ilman lämpötila ja kosteus,

c) nimellispitoisuudet (inhalaatiolaitteeseen asetetun testattavan aineen kokonaismäärä jaettuna ilman tilavuudella),

d) käytetty liuotin,

e) todelliset pitoisuudet hengitysalueella,

f) hiukkasten keskikoko (tarvittaessa),

— annostasot (mukaan lukien liuotin, mikäli sitä on käytetty)

— myrkyllisyysvasteen tulokset sukupuolen ja annostason perusteella,

— oireeton taso,

— 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 mahdolliset virtsa-analyysitulokset),

— ruumiinavauslöydökset,

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— tulosten tilastollinen käsittely, jos mahdollista,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# KARSINOGEENISUUSTESTI

## 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 valittua antotapaa käyttäen yleensä viikon jokaisena päivänä useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta siten, että kukin ryhmä saa eri suuruisen annoksen. Antoaikana ja sen päätyttyä eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkkyvaikutusten ja erityisesti kasvainten kehittymisen toteamiseksi.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

Eläimet siirretään koetiloihin ja testin aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen testin alkua. Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin.

Koe-eläimet

Laji (jyrsijä tai muu laji) valitaan aikaisempien tutkimusten perusteella. Koe-eläimiksi valitaan yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä eläimiä ja annostelu aloitetaan vierotuksen jälkeen niin pian kuin mahdollista.

Testin alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskiarvosta. Mikäli subkrooninen testi suun kautta annosteltuna on tehty pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, samaa lajia/kantaa on käytettävä kummassakin tutkimuksessa.

Lukumäärä ja sukupuoli

Kun tutkimuksessa käytetään jyrsijöitä, kutakin annostasoa ja kontrolliryhmää varten tarvitaan vähintään 100 eläintä (50 naarasta ja 50 urosta). Naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. Mikäli tutkimussuunnitelma edellyttää eläinten lopettamista tutkimuksen kuluessa, eläinmäärään on lisättävä lopettaviksi aiottujen eläinten määrä.

Annostasot ja altistustiheys

Testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa ja kontrolliryhmää. Suurimman annoksen olisi aiheutettava vähäisiä myrkytysoireita, kuten lievää painon nousun hidastumista (alle 10 %), eikä sen tuloksena saisi olla huomattavia muutoksia normaaliin elinikään kasvainten aiheuttamia vaikutuksia lukuun ottamatta.

Pienin annos ei saisi vaikuttaa eläimen normaaliin kasvuun, kehitykseen ja elinikään eikä aiheuttaa mitään myrkyllisyysoireita. Pienimmän annoksen on yleensä oltava vähintään 10 % suurimmasta annoksesta.

Väliannostaso (tasot) on porrastettava ylimmän ja alimman annoksen keskiväliin.

Annostasojen valinnassa on otettava huomioon aikaisemmista myrkyllisyystesteistä ja -tutkimuksista saadut tulokset.

Eläimet altistetaan tavallisesti päivittäin. Mikäli kemikaalia annostellaan juomaveteen tai ravintoon sekoitettuna, niitä on oltava jatkuvasti saatavilla.

Kontrollit

Tutkimuksessa on käytettävä kontrolliryhmää, joka on aivan samanlainen kuin tutkimusryhmät, paitsi että sille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Erityistapauksissa, esimerkiksi aerosoleihin liittyvissä inhalaatiotutkimuksissa, tai kun suun kautta annosteltavaa ainetta tutkittaessa käytetään emulgaattoria, jonka biologiset ominaisuudet eivät ole tiedossa, tutkimukseen tulee liittää vielä yksi kontrolliryhmä, jolle ei anneta liuotinta.

Annostelutapa

Kolme pääasiallisesti käytettyä annostelutapaa ovat altistus suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Valinta tehdään testattavan aineen fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumistavan mukaan.

Tutkimukset, joissa annostelu tapahtuu suun kautta

Kun testattava aine imeytyy ruoansulatuskanavasta sen ollessa myös ihmisten todennäköinen altistumistapa, suun kautta annostelu on paras tapa, ellei kontraindikaatioita ole. Testattavaa ainetta voidaan antaa eläimille ravinnon yhteydessä, juomaveteen liuotettuna tai kapseleina.

Eläimille olisi annettava testattavaa ainetta viikon jokaisena päivänä, koska annostus viitenä päivänä viikossa voi aiheuttaa myrkyllisyysoireiden häviämisen tai niistä toipumisen sen ajan kuluessa, jolloin ainetta ei anneta, ja näin vaikuttaa tuloksiin ja niiden tulkintaan. Lähinnä käytännön syistä annostelu viitenä päivänä viikossa voidaan kuitenkin hyväksyä.

Tutkimukset, joissa altistus tapahtuu ihon kautta

Altistusmenetelmäksi voidaan valita ihon altistus, joko sen vuoksi, että se simuloi ihmisten pääasiallista altistumistapaa tai esimerkkimenetelmäksi ihovaurioiden tuottamisesta.

Tutkimukset, joissa altistus tapahtuu hengitysteiden kautta

Koska altistus hengitysteiden kautta on teknisesti paljon ongelmallisempi kuin muut altistustavat, seuraavassa selostetaan tarkemmin tätä menetelmää. On myös huomattava, että aineen tiputus henkitorveen voi joissakin tapauksissa olla hyväksyttävä vaihtoehto.

Pitkäaikaisaltistukset suunnitellaan yleensä ihmisten todennäköisen altistumistavan perusteella. Eläimet altistetaan hengityskammion tasapainotuksen jälkeen joko kuudeksi tunniksi päivittäin viitenä päivänä viikossa (jaksoittainen altistus) tai todennäköisen ympäristöaltistustavan perusteella 22-24 tuntia vuorokaudessa viikon jokaisena päivänä (jatkuva altistus), jolloin eläimillä on noin tunnin mittainen ruokailuaika samaan aikaan joka päivä. Kummassakaan tapauksessa eläimien saaman testattavan aineen pitoisuutta ei yleensä muuteta.

Jaksoittaisen ja jatkuvan altistuksen pääasiallinen erona on, että jaksoittaisessa altistuksessa eläimillä on 17-18 tuntia aikaa toipua päivittäisestä altistuksesta ja viikonloppuisin vielä tätäkin pidempi toipumisaika.

Jaksoittaisen tai jatkuvan altistuksen valinta riippuu tutkimuksen tavoitteista ja siitä, mitä ihmisten altistumistapaa simuloidaan. Tietyt tekniset vaikeudet on joka tapauksessa otettava huomioon. Esimerkiksi eläinten syöttäminen ja juottaminen altistuksen aikana ja monimutkaisemmat (ja luotettavammat) laitteet aerosolien ja höyryn tuottamiseksi sekä niiden valvonta voivat aiheuttaa ongelmia, jotka ovat merkittävämpiä kuin ympäristöolosuhteiden simuloimiseksi valitun jatkuvan altistuksen edut.

Altistuskammiot

Eläinten testauksiin käytetään inhalaatiokammioita, joiden dynaamisessa ilmavirrassa ilma vaihtuu vähintään 12 kertaa tunnissa, jotta hapen ja tasaisesti jakautuneen altistusaineen saanti voidaan varmistaa. Testattavalle aineelle tapahtuvaa altistusta lukuunottamatta kontrolli- ja altistuskammioiden

on oltava rakenteeltaan yhdenmukaisia. Kammiossa on yleensä lievä negatiivinen paine, jotta testattavaa ainetta ei pääsisi vuotamaan ympäristöön. Kammioissa on oltava riittävästi tilaa eläimille. Yleissääntönä kammion ilman pitämiseksi vakaana on, että koe-eläinten viemä tila on korkeintaan 5 % kammion tilavuudesta.

Seuraavat mittaukset tai valvontatoimenpiteet on suoritettava:

i) Ilman virtaus: ilman virtausnopeutta kammion läpi tulee tarkkailla jatkuvasti,

ii) Pitoisuus: päivittäisen altistuksen aikana pitoisuuden vaihtelun saa olla korkeintaan ± 15 % keskiarvosta. Tutkimuksen koko kestoajan päivittäiset pitoisuudet on pidettävä mahdollisimman vakaana,

iii) Lämpötila ja kosteus: kun jyrsijöitä käytetään koe-eläiminä, lämpötilan on oltava 22 ± 2 °C ja kammion kosteuden 30-70 %, paitsi milloin testattavaa ainetta suspensoidaan veden avulla kammion ilmaan. Molempia arvoja on jatkuvasti tarkkailtava,

iv) Hiukkasten koon mittaukset: kun testataan nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja, kammion ilmassa olevien hiukkasten koko on määritettävä. Aerosolihiukkasten on oltava kooltaan koe-eläinten hengitykselle sopivia. Näytteet kammion ilmasta on otettava eläinten hengitysalueelta. Otoksen on oltava edustava näyte testattavan aineen hiukkasten jakautumisesta ja gravimetrisesti myös kaikista aerosolin suspensiohiukkasista, vaikka suuri osa aerosolista ei joudu hengitykseen. Hiukkasten koosta on tehtävä analyysi useita kertoja niiden tuottoa säädettäessä ja sen jälkeen koe-eläinten altistuksen aikana niin usein kuin tarvitaan hiukkasten jakautumisen vakaana pysymisen varmistamiseksi.

Tutkimuksen kesto

Karsinogeenisuustesti kattaa suurimman osan koe-eläinten normaalista elinajasta. Koe päättyy hiiriä ja hamstereita testattaessa 18 kuukauden kuluttua ja rottia testattaessa 24 kuukauden kuluttua, mutta jos testattavat eläinkannat ovat pitkäikäisempiä ja/tai niille kehittyy hitaasti spontaaneja kasvaimia, koe on lopetettava 24 kuukauden kuluttua hiiri- ja hamsteritesteissä ja 30 kuukauden kuluttua rotan ollessa koe-eläimenä. Vaihtoehtoisesti näin pitkäaikaisen tutkimuksen lopettaminen on mahdollista silloin, kun pienimmän annoksen saaneessa ryhmässä tai kontrolliryhmässä on elossa enää 25 %. Sellaisen tutkimuksen päättyessä, jossa eri sukupuolien vasteessa on selkeä ero, kumpikin sukupuoli on arvioitava erikseen. Kun ainoastaan suurimman annoksen saanut ryhmä kuolee ennenaikaisesti selkeisiin myrkkyvaikutuksiin, tämän ei tarvitse merkitä tutkimuksen lopettamista, jos myrkyllisyysoireet eivät aiheuta vaikeuksia muissa ryhmissä. Negatiivinen tulos on hyväksyttävä, jos tutkimuksesta on menetetty korkeintaan 10 % jostakin ryhmästä autolyysin, kannibalismin tai hoitoongelmien ja vähintään 50 % kaikkien ryhmien eläimistä on elossa 18 kuukauden kuluttua käytettäessä hiiriä tai hamstereita ja 24 kuukauden kuluttua, kun koe-eläiminä käytetään rottia.

*Testin suorittaminen*

Tarkkailu

Eläinten päivittäisessä tarkkailussa on kiinnitettävä huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa sekä käyttäytymistavassa.

Säännöllinen tarkkailu on tarpeen, jotta eläimiä ei menetettäisi kannibalismin, kudosten autolyysin tai hoitovirheiden vuoksi. Huonokuntoiset eläimet poistetaan ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Kunkin eläimen osalta kirjataan kliiniset oireet sekä kuolleisuus. Kasvainten kehittymiseen on kiinnitettävä erityistä huomiota. Jokaisen paljain silmin tai käsin tunnustelemalla havaittavissa olevan kasvaimen toteamisaika, paikka, koko, ulkonäkö ja kehitys kirjataan.

Ravinnon kulutus (ja veden kulutus, kun testattava aine annetaan juomavedessä) mitataan viikottain 13 ensimmäisen viikon aikana ja sen jälkeen noin kolmen kuukauden välein, ellei eläinten terveydentila tai painon muutokset edellytä useampia määrityksiä.

Kunkin eläimen paino kirjataan kerran viikossa tutkimusajan 13 ensimmäisen viikon aikana ja sen jälkeen vähintään kerran neljässä viikossa.

*Kliiniset tutkimukset*

Hematologia

Jos eläinten terveydentilan todetaan huonontuneen tutkimuksen kuluessa, näiden eläinten verenkuva on tutkittava.

Koe-eläimistä otetaan verinäyte 12 ja 18 kuukauden kuluttua ja ennen eläinten lopettamista. Suurimman annoksen saaneen ryhmän ja kontrolliryhmän eläinten verenkuva tutkitaan. Pienempiä annoksia saaneiden ryhmien osalta verenkuva tutkitaan, jos suurimman annoksen ryhmästä erityisesti juuri ennen eläinten lopetusta otetuista näytteistä saadut tulokset tai patologiset löydökset edellyttävät sen tutkimista.

Ruumiinavaus

Kaikille, myös tutkimuksen kuluessa kuolleille tai huonokuntoisuuden vuoksi lopetetuille koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus. Kaikki paljain silmin havaittavat kasvaimet, vammoja tai kasvaimeksi epäiltyjä vaurioita sisältävät kohteet säilytetään.

Seuraavat elimet ja kudokset on säilytettävä histopatologista tutkimusta varten: aivot, (sekä osia ytimestä/aivosillasta, pikkuaivokuori ja aivokuori), aivolisäke, kilpirauhanen/ lisäkilpirauhanen, kateenkorvakudosta, henkitorvi ja keuhkot, sydän, aortta, sylkirauhaset, maksa, perna, munuaiset, lisämunuaiset, haima, sukupuolirauhaset, kohtu, muut sukupuolielimet, iho, ruokatorvi, mahalaukku, pohjukaissuoli, ohutsuoli, umpisuoli, paksusuoli, peräsuoli, virtsarakko, tyypillinen imusolmuke, naaraan rintarauhanen, reiden lihaksistoa, ääreishermo, rintalasta luuytimineen, reisiluu (nivelineen), selkärankaa kolmesta kohdasta (kaulasta, henkitorven keskiosasta ja lantiosta) sekä silmät.

Keuhkojen ja virtsarakon täyttäminen fiksatiivilla on näiden elinten paras säilytystapa. Keuhkojen täyttäminen hengitystietutkimuksissa on välttämätöntä, jotta tarvittava histopatologinen tutkimus voidaan suorittaa. Kun altistumista tutkitaan hengitysteiden kautta, koko hengityselimistö mukaan lukien nenä, nielu ja kurkunpää, on säilytettävä.

Histopatologinen tutkimus

a) Tutkimuksen aikana kuolleiden ja lopetettujen eläinten sekä suurimman annoksen saaneen ryhmän ja kontrolliryhmän eläinten elimille ja kudoksille on tehtävä täydellinen histopatologinen tutkimus.

b) Kaikki paljain silmin havaittavat kasvaimet tai kasvaimiksi epäillyt vauriot on tutkittava mikroskooppisesti kaikkien ryhmien osalta.

c) Jos suurimman annoksen saaneessa ryhmässä ja kontrolliryhmässä esiintyvien uudismuodostumien määrä poikkeaa huomattavasti toisistaan, muiden ryhmien vastaaville elimille tai kudoksille on suoritettava histopatologinen tutkimus.

d) Jos suurimman annoksen saaneessa ryhmässä eloonjääneiden osuus on huomattavasti kontrolliryhmää pienempi, seuraavaksi alempi ryhmä on tutkittava perusteellisesti.

e) Jos testi osoittaa, että suurimman annoksen saaneessa ryhmässä on syntynyt uudiskasvainvasteeseen vaikuttavia myrkky- tai muita vaikutuksia, lähinnä alempi annostaso on tutkittava perusteellisesti.

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä kokeen alussa, kasvaimia kehittäneiden eläinten määrä, kasvaimien toteamisajankohta ja eläinten lukumäärä, joilla todettiin kasvaimia niiden lopettamisen jälkeen. 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,

Altistamislaitteen kuvaus:

merkki, tyyppi, mitat, ilmanlähde, hiukkasten ja aerosolien tuottamistapa, ilmastointitapa, poistoilman käsittelytapa ja eläinten sijainti koekammiossa altistamisen aikana. Lämpötilan, kosteuden, hiukkasten koon ja aerosolin pitoisuuden mittaustapa on mainittava.

Altistamistiedot:

Altistamistiedot laaditaan taulukon muotoon, jossa esitetään keskiarvo ja poikkeamat (esim. keskihajonta) ja seuraavat tiedot:

a) ilmavirran nopeus inhalaatiolaitteessa,

b) ilman lämpötila ja kosteus,

c) nimellispitoisuudet (inhalaatiolaitteeseen asetetun testattavan aineen kokonaismäärä jaettuna ilman tilavuudella),

d) käytetty liuotin,

e) todelliset pitoisuudet hengitysalueella,

f) hiukkasten keskikoko (tarvittaessa),

— annostasot (mukaan lukien liuotin, mikäli sitä on käytetty)

— selostus kasvainten esiintymisestä sukupuolen ja kasvaimen laadun perusteella,

— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet sen päätyttyä,

— myrkkyvastetulokset sukupuolen ja annostason perusteella,

— selostus myrkyllisyysoireista ja muista vaikutuksista,

— poikkeavuuksien toteamisaika ja kehittyminen,

— ruokintaa ja painoa koskevat tiedot,

— veritestit ja kaikki tulokset,

— ruumiinavauslöydökset,

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— tulosten tilastollinen käsittely, jos mahdollista,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 **Arviointi ja tulkinta**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# YHDISTETTY KROONINEN MYRKYLLISYYS/KARSINOGEENISUUSTESTI

## 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

Yhdistetyn myrkyllisyys/karsinogeenisuustestin tarkoituksena on määrittää pitkäaikaisen altistuksen aiheuttamat krooniset ja karsinogeeniset vaikutukset johonkin nisäkäslajiin.

Karsinogeenisuustestiä täydentää ainakin yksi satelliittiryhmä, joka altistetaan, sekä kontrollisatelliittiryhmä. Suurimman annoksen saavan satelliittiryhmän annos voi olla suurempi kuin karsinogeenisuustestin uurimman annoksen ryhmälle annettu. Karsinogeenisuustestin koe-eläimistä tutkitaan yleiset myrkkyvaikutukset sekä karsinogeenisuusvaste. Altistetun satelliittiryhmän koe-eläimistä tutkitaan yleiset myrkkyvaikutukset.

Testattavaa ainetta annetaan valittua antotapaa käyttäen yleensä viikon jokaisena päivänä useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta, niin että kukin ryhmä saa eri suuruisen annoksen. Antoaikana ja sen päätyttyä eläimiä tarkkaillaan päivittäin myrkkyvaikutusten ja kasvainten kehittymisen toteamiseksi.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

Eläimet siirretään koetiloihin ja testin aikana annettava ruokinta aloitetaan vähintään viisi päivää ennen testin alkua. Nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin.

K o e - e l ä i m e t

Rotta on suositeltavin laji. Aikaisempien tutkimusten perusteella voidaan valita jokin muu laji (jyrsijä tai muu kuin jyrsijä). Koe-eläimiksi valitaan yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä eläimiä ja annostelu aloitetaan vierotuksen jälkeen niin pian kuin mahdollista.

Testin alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskiarvosta. Mikäli subkrooninen testi suun kautta annosteltuna on tehty pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, kummassakin tutkimuksessa on käytettävä samaa lajia ja kantaa.

L u k u m ä ä r ä j a s u k u p u o l i

Kun tutkimuksessa käytetään jyrsijöitä, kutakin annostasoa ja kontrolliryhmää varten tarvitaan vähintään 100 eläintä (50 naarasta ja 50 urosta). Naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineinä. Mikäli tutkimussuunnitelma edellyttää eläinten lopettamista tutkimuksen kuluessa, eläinmäärään on lisättävä lopettaviksi aiottujen eläinten määrä.

Altistetussa satelliittiryhmässä(ryhmissä), josta tutkitaan muut kuin kasvaimia koskevat myrkkyvaikutukset, on oltava 20 ja kontrollisatelliittiryhmässä 10 eläintä kumpaakin sukupuolta.

Annostasot ja altistustiheys

Karsinogeenisuuden määrittämiseksi testissä käytetään vähintään kolmea annostasoa kontrolliryhmän ohella. Suurimman annoksen olisi aiheutettava vähäisiä myrkytysoireita, kuten lievää painon nousun hidastumista (alle 10 %), eikä sen tuloksena saisi olla huomattavia muutoksia normaaliin elinikään kasvainten aiheuttamia muutoksia lukuun ottamatta.

Pienin annos ei saisi vaikuttaa eläimen normaaliin kasvuun, kehitykseen ja elinikään eikä aiheuttaa mitään myrkyllisyysoireita. Pienimmän annoksen on yleensä oltava vähintään 10 % korkeimmasta annoksesta.

Väliannostaso(tasot) on porrastettava ylimmän ja alimman annoksen keskiväliin.

Annostasojen valinnassa on otettava huomioon aikaisemmista myrkyllisyystesteistä ja -tutkimuksista saadut tulokset.

Kroonisten myrkkyvaikutusten määrittämiseksi kokeessa käytetään muita altistettuja ryhmiä ja kontrollisatelliittiryhmää. Satelliittiryhmän saaman suurimman annoksen on aiheutettava selkeitä myrkyllisyysoireita.

Eläimet altistetaan tavallisesti päivittäin. Mikäli kemikaalia annostellaan juomaveteen tai ravintoon sekoitettuna, niitä on oltava jatkuvasti saatavilla.

Kontrollit

Tutkimuksessa on käytettävä kontrolliryhmää, joka on aivan samanlainen kuin tutkimusryhmät, paitsi että sille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Erityistapauksissa, esimerkiksi aerosoleihin liittyvissä inhalaatiotutkimuksissa tai kun suun kautta annosteltavaa ainetta tutkittaessa käytetään emulgaattoria, jonka biologiset ominaisuudet eivät ole tiedossa, tutkimukseen tulee liittää myös toinen kontrolliryhmä, jolle ei anneta liuotinta.

Annostelutapa

Kolme pääasiallisesti käytettyä annostelutapaa ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Valinta riippuu testattavan aineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista sekä ihmisten todennäköisestä altistumistavasta.

Tutkimukset, joissa annostelu tapahtuu suun kautta

Kun testattava aine imeytyy ruoansulatuskanavasta ja sen ollessa myös ihmisten todennäköinen altistumistapa, suun kautta annostelu on paras tapa, ellei kontraindikaatioita ole. Testattavaa ainetta voidaan antaa koe-eläimille ravinnon yhteydessä, juomaveteen liuotettuna tai kapseleina. Eläimille olisi annettava testattavaa ainetta viikon jokaisena päivänä, koska annostus viitenä päivänä viikossa voi aiheuttaa myrkyllisyysoireiden häviämisen tai niistä toipumisen sen ajan kuluessa, jolloin ainetta ei anneta, ja näin vaikuttaa tuloksiin ja niiden tulkintaan. Lähinnä käytännön syistä annostelu viitenä päivänä viikossa voidaan kuitenkin hyväksyä.

Tutkimukset, joissa altistus tapahtuu ihon kautta

Altistusmenetelmäksi voidaan valita ihon altistus, joko sen vuoksi, että se simuloi ihmisten pääasiallista altistumistapaa tai esimerkkimenetelmänä ihovaurioiden tuottamista.

Tutkimukset, joissa altistus tapahtuu hengitysteiden kautta

Koska altistus hengitysteiden kautta on teknisesti paljon ongelmallisempi kuin muut altistustavat, seuraavassa selostetaan tarkemmin tätä altistustapaa. On myös huomattava, että aineen tiputus henkitorveen voi joissakin tapauksissa olla hyväksyttävä vaihtoehto.

Pitkäaikaisaltistukset suunnitellaan yleensä ihmisten todennäköisen altistumistavan perusteella. Eläimet altistetaan hengityskammion tasapainotuksen jälkeen joko kuudeksi tunniksi päivittäin viitenä päivänä viikossa (jaksoittainen altistus) tai todennäköisen ympäristöaltistustavan perusteella 22-24 tuntia vuorokaudessa viikon jokaisena päivänä (jatkuva altistus), jolloin eläimillä on noin tunnin mittainen ruokailuaika samaan aikaan joka päivä. Kummassakaan tapauksessa käytettäessä eläimien saaman testattavan aineen pitoisuutta ei yleensä muuteta. Jaksoittaisen ja jatkuvan altistuksen pääasiallinen ero on, että jaksoittaisessa altistuksessa eläimillä on 17-18 tuntia aikaa toipua päivittäisestä altistuksesta ja viikonloppuisin vielä tätäkin pidempi toipumisaika.

Jaksoittaisen tai jatkuvan altistuksen valinta riippuu tutkimuksen tavoitteista ja siitä, mitä ihmisten altistumistapaa simuloidaan. Tietyt tekniset vaikeudet on joka tapauksessa otettava huomioon. Esimerkiksi eläinten syöttäminen ja juottaminen altistuksen aikana ja monimutkaisemmat (ja luotettavammat) laitteet aerosolien ja höyryn tuottamiseksi sekä niiden valvonta voivat aiheuttaa ongelmia, jotka ovat merkittävämpiä kuin ympäristöolosuhteiden simuloimiseksi valitun jatkuvan altistuksen edut.

Altistuskammiot

Eläinten testauksiin käytetään inhalaatiokammioita, joiden dynaamisessa ilmavirrassa ilma vaihtuu vähintään 12 kertaa tunnissa, jotta hapen ja tasaisesti jakautuneen altistusaineen saanti voidaan varmistaa. Testattavalle aineelle tapahtuvaa altistusta lukuun ottamatta kontrolli- ja altistuskammioiden on oltava rakenteeltaan yhdenmukaisia. Kammiossa on yleensä lievä negatiivinen paine, jotta testattavaa ainetta ei pääsisi vuotamaan ympäristöön. Kammioissa on oltava riittävästi tilaa eläimille. Yleissääntönä kammion ilman pitämiseksi vakaana on, että koe-eläinten viemä tila on korkeintaan 5 % kammion tilavuudesta.

Seuraavat mittaukset tai valvontatoimenpiteet on suoritettava:

i) Ilman virtaus: ilman virtausnopeutta kammion läpi on tarkkailtava jatkuvasti.

ii) Pitoisuus: päivittäisen altistuksen aikana pitoisuuden vaihtelu saa olla korkeintaan ± 15 % keskiarvosta. Tutkimuksen koko keston ajan päivittäiset pitoisuudet on pidettävä mahdollisimman vakaana.

iii) Lämpötila ja kosteus: kun jyrsijöitä käytetään koe-eläiminä, lämpötilan on oltava 22 ± 2 °C ja kammion kosteuden 30-70 %, paitsi silloin, kuin testattavaa ainetta suspendoidaan veden avulla kammion ilmaan. Molempia arvoja on jatkuvasti tarkkailtava.

iv) Hiukkasten koon mittaukset: kun testataan nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja, kammion ilmassa olevien hiukkasten koko tulee määrittää. Aerosolihiukkasten on oltava kooltaan koe-eläinten hengitykselle sopivia. Näytteet kammion ilmasta on otettava eläinten hengitysalueelta. Otoksen on oltava edustava näyte testattavan aineen hiukkasten jakautumisesta ja gravimetrisesti myös kaikista aerosolin suspensiohiukkasista, vaikka suuri osa aerosolista ei joudu hengitykseen. Hiukkasten koosta on tehtävä analyysi useita kertoja niiden tuottoa säädettäessä ja sen jälkeen koe-eläinten altistuksen aikana riittävän usein hiukkasten jakautumisen vakaana pysymisen varmistamiseksi.

Tutkimuksen kesto

Tutkimuksen karsinogeenisuusosan kestoaika kattaa suurimman osan koe-eläinten normaalista elinajasta. Koe tulee päättää hiiriä ja hamstereita testattaessa 18 kuukauden kuluttua ja rottia testattaessa 24 kuukauden kuluttua, mutta jos testattavat eläinkannat ovat pitkäikäisempiä ja/tai niille kehittyy hitaasti spontaaneja kasvaimia, koe on lopetettava 24 kuukauden kuluttua hiiri- ja hamsteritesteissä ja 30 kuukauden kuluttua rotan ollessa koe-eläimenä. Näin pitkäaikaisen tutkimuksen lopettaminen on vaihtoehtoisesti mahdollista silloin, kun pienimmän annoksen saaneessa ryhmässä tai kontrolliryhmässä on elossa enää 25 %. Sellaisen tutkimuksen päättyessä, jossa eri sukupuolien vasteessa on selkeä ero, kumpikin sukupuoli on arvioitava erikseen. Kun ainoastaan suurimman annoksen saanut ryhmä kuolee ennenaikaisesti selkeisiin myrkkyvaikutuksiin, tämän ei tarvitse merkitä tutkimuksen lopettamista, jos myrkyllisyysoireet eivät aiheuta vaikeuksia muissa ryhmissä. Negatiivinen tulos on hyväksyttävä, jos tutkimuksesta on menetetty korkeintaan 10 % jostakin ryhmästä autolyysin, kannibalismismin tai hoito-ongelmien vuoksi ja vähintään 50 % kaikkien ryhmien eläimistä on elossa 18 kuukauden kuluttua käytettäessä hiiriä tai hamstereita ja 24 kuukauden kuluttua, kun koe-eläiminä käytetään rottia.

Satelliittiryhmiä, joissa on 20 kumpaakin sukupuolta olevaa altistettua eläintä ja kroonisen myrkyllisyystutkimukseen tarkoitettua 10 kumpaakin sukupuolta olevaa kontrollieläintä, on tutkittava vähintään 12 kuukauden ajan. Nämä eläimet on tarkoitettu testattavaan aineeseen liittyviin patologisiin tutkimuksiin ilman gerontologisten muutosten aiheuttamia vaikutuksia.

*Testin suorittaminen*

Tarkkailu

Eläimiä tarkkaillaan päivittäin ja tarkkailussa on kiinnitettävä huomiota muutoksiin, joita tapahtuu karvapeitteessä ja ihossa, silmissä ja limakalvoissa sekä hengitys- ja verenkiertoelimissä, autonomisessa ja keskushermostossa, somatomotorisissa toiminnoissa sekä käyttäytymistavassa.

Altistetun satelliittiryhmän (ryhmien) eläimille on suoritettava määräajoin kliininen tutkimus.

Säännöllinen tarkkailu on tarpeen, jotta eläimiä ei menetettäisi kannibalismin, kudosten autolyysin tai hoitovirheiden vuoksi. Huonokuntoiset eläimet poistetaan ja niille suoritetaan ruumiinavaus.

Kunkin eläimen osalta kirjataan kliiniset oireet, neurologiset ja silmän muutokset sekä kuolleisuus. Kasvainten kehittymiseen on kiinnitettävä erityistä huomiota. Jokaisen paljain silmin tai käsin tunnustelemalla havaittavissa olevan kasvaimen toteamisaika, paikka, koko, ulkonäkö ja kehitys on kirjattava.

Ravinnon kulutus (ja veden kulutus, kun testattava aine annetaan juomavedessä) mitataan viikottain 13 ensimmäisen viikon aikana ja sen jälkeen noin kolmen kuukauden välein, ellei eläinten terveydentila tai painonmuutokset edellytä useampia määrityksiä.

Kunkin eläimen paino kirjataan kerran viikossa tutkimusajan 13 ensimmäisen viikon aikana ja sen jälkeen vähintään kerran neljässä viikossa.

*Kliiniset tutkimukset*

Hematologia

Veritutkimus (esim. hemoglobiini, puna- ja valkosolujen määrä, trombosyytit tai jokin muu hyytymisominaisuusmääritys) on tehtävä kolmen ja kuuden kuukauden kuluttua ja sen jälkeen noin kuuden kuukauden välein. Tutkimuksen päätyttyä otetaan verinäyte kunkin ryhmän osalta 10 uros- ja 10 naaraspuolisesta rotasta. Mikäli mahdollista, näytteet on otettava joka kerta samoista rotista.

Mikäli eläinten terveydentilan todetaan huonontuneen tutkimuksen kuluessa, näiden eläinten verenkuva on tutkittava.

Suurimman annoksen saaneen ryhmän ja kontrolliryhmien eläinten verenkuva tutkitaan. Pienempiä annoksia saaneiden ryhmien osalta verenkuva tutkitaan vain, jos suurimman annoksen ryhmän ja kontrolliryhmien välillä on suuri ero tai jos patologiset löydökset edellyttävät sen tutkimista.

Virtsa-analyysi

Virtsanäyte otetaan kunkin ryhmän osalta jos mahdollista samoin välein ja samalta 10 uros- ja 10 naaraspuoliselta rotalta, jolta otettiin verinäyte. Seuraavat määritykset on tehtävä joko kunkin eläimen näytteestä tai jyrsijöiden osalta sukupuolen ja ryhmän perusteella yhdistetystä näytteestä:

— ulkonäkö: määrä ja tiheys kunkin eläimen osalta,

— proteiinit, glukoosi, ketonit, veri (semikvantitatiivisesti)

— sakan mikroskooppitutkimus (semikvantitatiivisesti).

Kliininen kemia

Noin kuuden kuukauden välein sekä tutkimuksen päätyttyä otetaan verinäyte mieluimmin joka kerta samalta 10 uros- ja 10 naaraspuoliselta rotalta sekä kaikilta muiden lajien koe-eläimiltä kliinisen kemian määrityksiä varten. Muilta kuin jyrsijöiltä otetaan lisäksi näyte ennen tutkimuksen alkua. Näytteiden plasmasta tehdään seuraavat määritykset:

— kokonaisproteiinipitoisuus,

— albumiinipitoisuus,

— maksakokeet esim. alkaalifosfataasin, glutamiinipyruviinitransaminaasin(1), glutamiinioksaloasetaattitransaminaasitoiminta(2), gammaglutamyylitranspeptidaasi, ornitiinidekarboksylaasi,

— hiilihydraattien metabolia, esim. glukoosin paastoarvo,

— munuaisten toiminta, esim. veren ureatyppi.

(1) Nykyisin seerumin alaniiniaminotransferaasi
(2) Nykyisin seerumin aspartaattiaminotransferaasi

Ruumiinavaus

Kaikille, myös tutkimuksen kuluessa kuolleille tai huonokuntoisuuden vuoksi lopetetuille koeeläimille suoritetaan ruumiinavaus. Ennen eläinten lopettamista niistä otetaan verinäytteet verenkuvan määritystä varten. Kaikki paljain silmin havaittavat kasvaimet tai kasvaimeksi epäillyt vauriokohteet säilytetään. Silmämääräiset havainnot on pyrittävä korreloimaan mikroskooppisiin löydöksiin.

Kaikki elimet ja kudokset säilytetään histopatologista tutkimusta varten. Tämä koskee yleensä seuraavia elimiä ja kudoksia: aivot(1),(ydin/aivosilta, pikkuaivokuori ja aivokuori), aivolisäke, kilpirauhanen (sekä lisäkilpirauhanen), kateenkorva, keuhkot (ja henkitorvi), sydän, aortta, sylkirauhaset, maksa(1), perna, munuaiset(1), lisämunuaiset(1), ruokatorvi, mahalaukku, pohjukaissuoli, ohutsuoli, umpisuoli, paksusuoli, peräsuoli, virtsarakko, imusolmukkeet, haima, sukupuolirauhaset(1), muut sukupuolielimet, naaraan rintarauhanen, iho, lihakset, ääreishermo, selkärankaa (kaulasta, henkitorven keskiosasta ja lantiosta), rintalaa luuytimineen, reisiluu (nivelineen) sekä silmät.

Keuhkojen ja virtsarakon täyttäminen fiksatiivilla on näiden elinten paras säilytystapa; keuhkojen täyttäminen hengitystietutkimuksissa on välttämätöntä, jotta tarvittava histopatologinen tutkimus voidaan suorittaa. Erityistutkimuksissa, kuten altistustesteissä hengitysteiden kautta, koko hengityselimistö mukaan lukien nenä, nielu ja kurkunpää, on tutkittava.

Muita kliinisiä tutkimuksia tehtäessä niiden tulosten on oltava selvillä ennen mikroskooppitutkimusta, koska niistä saattaa olla patologille merkittävää apua.

Histopatologinen tutkimus

Kroonisen myrkyllisyystutkimuksen osalta:

Suurimman annoksen saaneen satelliittiryhmän ja kontrolliryhmien eläinten kaikki säilytetyt elimet on tutkittava huolellisesti. Jos satelliittiryhmässä havaitaan testattavaan aineeseen liittyviä muutoksia, kaikkien muiden altistettujen satelliittiryhmien eläinten sekä karsinogeenisuustutkimuksessa altistettujen ryhmien eläinten kohde-elimet on tutkittava perusteellisesti tutkimuksen päätyttyä.

Karsinogeenisuustutkimuksen osalta:

a) Tutkimuksen aikana kuolleiden ja lopetettujen eläinten sekä suurimman annoksen saaneen ryhmän ja kontrolliryhmän eläinten elimille ja kudoksille on tehtävä täydellinen histopatologinen tutkimus.

b) Kaikki paljain silmin havaittavat elinten kasvaimet tai kasvaimiksi epäillyt muutokset on tutkittava mikroskooppisesti kaikkien ryhmien osalta.

c) Jos suurimman annoksen saaneessa ryhmässä ja kontrolliryhmässä esiintyvien uudisvaurioiden määrä poikkeaa huomattavasti toisistaan, histopatologinen tutkimus on suoritettava muiden ryhmien vastaaville elimille tai kudoksille.

d) Jos suurimman annoksen saaneessa ryhmässä eloonjääneiden osuus on huomattavasti kontrolliryhmää pienempi, seuraavaksi alempi ryhmä on tutkittava perusteellisesti.

e) Jos testi osoittaa, että korkeimman annoksen saaneessa ryhmässä on syntynyt uudiskasvainvasteeseen vaikuttavia myrkky- tai muita vaikutuksia, lähinnä alempi annostaso on tutkittava perusteellisesti.

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta näkyy kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa, kasvaimia kehittäneiden ja muita myrkkyvaikutuksia osoittavien eläinten määrä, kasvaimien toteamisajankohta ja niiden eläinten lukumäärä, joilla todettiin kasvaimia lopettamisen jälkeen. 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,

(1) Nämä kunkin ryhmän 10 naaras- ja 10 urospuolisen jyrsijän elimet tulee punnita

— koeolosuhteet,

Altistamislaitteen kuvaus:

merkki, tyyppi, mitat, ilmanlähde, hiukkasten ja aerosolien tuottamistapa, ilmastointitapa, poistoilman käsittelytapa ja eläinten sijainti koekammiossa altistamisen aikana. Lämpötilan, kosteuden, hiukkasten koon ja aerosolin pitoisuuden mittaustapa on mainittava.

Altistamistiedot:

Altistamistiedot laaditaan taulukkomuotoon, jossa esitetään keskiarvo ja poikkeamat (esim. keskihajonta) ja seuraavat tiedot:

a) ilmavirran nopeus inhalaatiolaitteessa,

b) ilman lämpötila ja kosteus,

c) nimellispitoisuudet (inhalaatiolaitteeseen asetetun testattavan aineen kokonaismäärä jaettuna ilman tilavuudella),

d) käytetty liuotin,

e) todelliset pitoisuudet hengitysalueella,

f) hiukkasten keskikoko (tarvittaessa).

— annostasot (mukaan lukien liuotin, jos sitä on käytetty)

— selostus kasvainten esiintymisestä sukupuolen ja kasvaimen laadun perusteella,

— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja eloonjääneet sen päätyttyä myös satelliittiryhmän osalta,

— myrkkyvastetulokset sukupuolen ja annostason perusteella,

— selostus myrkyllisyysoireista ja muista vaikutuksista,

— kunkin poikkeavuuden toteamisaika ja kehittyminen,

— silmälöydökset,

— ruokintaa ja painoa koskevat tiedot,

— veritestit ja kaikki tulokset,

— kliiniset biokemialliset testit ja kaikki tulokset (myös virtsa-analyysi)

— ruumiinavauslöydökset,

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä,

— tulosten tilastollinen käsittely ja käytetty tilastointimenetelmä,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 **Arviointi ja tulkinta**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# 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.

K o e - e l ä i m e t

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 kontrolleläimet 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 vierotukseen 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 haittavaikutusta kumpaankaan sukupolveen. Kun annos annetaan kapseleina tai ruokintaletkulla, se tulee määrittää kunkin eläimen painon perusteella ja säätää viikottain 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.

*Testin suorittaminen*

Testin aikataulu

Parentaalipolven (P) urosten päivittäinen altistus on aloitettava vierotuksen 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 vierotukseen 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 vierotukseen 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.

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 viikottain. 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 viikottain 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 kontrolleläinten 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.

## 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.

# MYRKKYJEN VAIKUTUS LISÄÄNTYMISKYKYYN (KAHDEN 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. Parentaalisukupolven (P) 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. Vierotuksen jälkeen testattavan aineen antamista jatketaan $F_1$-poikasille niiden täysikasvuisiksi kehittymisen, pariutumisen ja $F_2$-sukupolven tuottamisen ajan, kunnes $F_2$-sukupolvi vierotetaan. Testausmenetelmää on muunneltava, jos altistus tapahtuu hengitysteiden kautta.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testausmenetelmän kuvaus

*Valmistelevat toimenpiteet*

Ennen tutkimuksen aloittamista nuoret, terveet eläimet jaetaan satunnaisesti koe- ja kontrolliryhmiin. Parentaali (P)-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.

Koe-eläimet: Eläinlajin valinta

Suositeltavimmat lajit ovat rotta tai hiiri.

Koe-eläiminä on käytettävä terveitä P-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 voidaan tehdä luotettava arviointi testattavan aineen mahdollisista vaikutuksista P-sukupolven eläinten hedelmällisyyteen, tiineyteen ja

emon käyttäytymiseen sekä $F_1$-sukupolven kehitykseen syntymästä täysikasvuisiksi ja tämän sukupolven poikasten ($F_2$) kehitykseen kunnes ne vierotetaan.

*Koe-olosuhteet*

Ravintoa ja vettä on oltava vapaasti saatavilla. Synnytyksen lähestyessä kantavat naaraat on sijoitettava 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 haittavaikutusta vanhempiin tai poikasiin. Kun annos annetaan kapseleina tai ruokintaletkulla, se on määritettävä kunkin eläimen painon perusteella ja säädettävä viikottain 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. Jos suurimmalla annoksella tehty esitesti aiheuttaa emossa selviä myrkkyvaikutuksia, mutta ei vaikuta lisääntymiskykyyn, muita annostasoja ei ole tarpeen tutkia.

*Testin suorittaminen*

Testin aikataulu

Parentaalipolven (P) urosten päivittäinen altistus on aloitettava vierotuksen jälkeen 5-9 viikon iässä ja vähintään viiden vuorokauden koeolosuhteisiin sopeuttamisen jälkeen. Rottia altistetaan 10 viikon ajan ennen pariuttamisaikaa (hiiriä kahdeksan viikon ajan). Urokset lopetetaan ja tutkitaan pariuttamisajan päätyttyä. 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 päätyttyä ja jatkua ainakin kahden viikon ajan ennen pariutumista. P-naaraiden päivittäisen altistuksen on jatkuttava koko kolmen viikon pariuttamisajan ja tiineysajan aina $F_1$-poikasten vierotukseen asti. Altistusaikataulun muutoksia voidaan harkita testattavasta aineesta saatavilla olevien tietojen, kuten metabolisten vaikutusten tai biokertyvyyden perusteella.

$F_1$-eläinten altistus alkaa vierotuksesta ja jatkuu eläinten lopettamiseen saakka.

Pariuttamismenettely

Tutkittaessa myrkkyjen vaikutusta hedelmällisyysin eläimet voidaan 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. Siittiöiden muodostumiseen tarvittavan ajan vuoksi $F_1$-poikasia ei saa pariuttaa ennen 11 viikon ikää hiirillä ja 13 viikon ikää rotilla. Pariutettaessa $F_1$-poikasia $F_2$-sukupolven tuottamiseksi valitaan kustakin poikueesta sattumanvaraisesti yksi uros ja yksi naaras ristisiitokseen saman annosryhmän toisesta poikueesta peräisin olevan poikasen kanssa. Ne $F_1$-naaraat ja urokset, joita ei valittu siitokseen, lopetetaan vierotuksen jälkeen.

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 vierotukseen 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. Samalla tavoin mukautetaan $F_2$-poikueet.

*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 viikottain. Raskaudenaikainen ravinnonkulutus voidaan tarvittaessa mitata päivittäin. Synnytyksen jälkeinen ja imetyksen aikainen ravinnon kulutus (ja veden kulutus kun testattava aine annetaan juomavedessä) mitataan samana päivänä kuin poikue punnitaan. Parentaalieläimet (P ja $F_1$) on punnittava ensimmäisenä altistuspäivänä ja sen jälkeen viikottain. Nämä huomiot on kirjattava jokaisesta täysikasvuisesta koe-eläimestä erikseen.

Tiineysajan pituus on laskettava tiineyden 0-päivästä. Kukin poikue on tutkittava mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen ja 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 viikottain tutkimuksen päättymiseen saakka, jolloin eläimet punnitaan yksitellen. Emojen ja poikasten fyysiset poikkeavuudet ja käyttäytymishäiriöt kirjataan.

*Patologia*

Ruumiinavaus

Kaikki P- ja $F_1$- sukupolven täysikasvuiset eläimet lopetetaan, kun niitä ei enää tarvita lisääntymiskyvyn arvioimiseen. $F_1$-poikaset, joita ei valittu siitokseen sekä kaikki $F_2$-poikaset lopetetaan vierotuksen jälkeen.

Tutkimuksen kuluessa kuolleet tai lopetetut parentaalieläimet (P ja $F_1$) tutkitaan mikroskooppisesti rakenteellisten poikkeavuuksien tai patologisten muutosten toteamiseksi. Huomiota kiinnitetään erityisesti sukupuolielimiin. Kuolleet tai huonokuntoiset poikaset tutkitaan poikkeavuuksien toteamiseksi.

Histopatologia

Kaikkien P- ja $F_1$-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 siitokseen käytettyjen suurimman annoksen saaneiden ja kontrollieläinten (P ja F1) osalta sekä, jos mahdollista, tutkimuksen aikana kuolleiden eläinten osalta. Elimet, joissa näillä eläimillä esiintyy poikkeavuuksia, on myös tutkittava kaikkien muiden ryhmien osalta. Näissä tapauksissa on kaikki näkyviä patologisia muutoksia osoittavat kudokset tutkittava mikroskooppisesti. Kuten pariuttamismenettelyä selostavassa kohdassa esitetään, lisääntymiskyvyttömiksi epäiltyjen eläinten sukupuolielimet voidaan tutkia mikroskooppisesti.

## 2 TULOKSET

*Tulosten käsittely*

Tulokset voidaan esittää taulukkomuodossa, josta ilmenevät kuhunkin testiryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä kokeen alussa, 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 elinkelpoisuusindeksit,

— eläinten kuolinaika tutkimuksen kuluessa ja tutkimuksen päättyessä elossa olevat,

— taulukko, josta ilmenee kunkin poikueen paino, poikasten keskipaino ja kunkin poikasen paino lopetushetkellä,

— lisääntymistä, poikasia ja syntymän jälkeistä kasvua koskevat myrkky- ja muut vaikutukset,

— kunkin oireen toteamispäivä ja kehittyminen,

— siitokseen valittujen P-ja $F_1$-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 KIRJALLISUUS

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# MYRKKYKINETIIKKA

## 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 jotakin sopivaa annostelutapaa käyttäen. Ainetta voidaan antaa tutkimuksen tavoitteiden mukaan joko yhtenä tai useina annoksina määrätyn ajan kuluessa yhdelle tai usealle koe-eläinryhmälle. Tutkimuksen jälkeen määritetään tutkimuksen tavoitteiden mukaisesti aine ja/tai metaboliitit ruumiin nesteistä, kudoksista ja/tai eritteistä.

Tutkimukset voidaan suorittaa joko "merkitsemättömillä" tai "merkityillä" ainemuodoilla. Kun merkintää käytetään, se on tehtävä niin, että yhdisteestä saadaan mahdollisimman monipuolista tietoa.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Nuoria, terveitä täysikasvuisia eläimiä sopeutetaan koetiloihin vähintään viisi päivää ennen kokeen alkua. Koe-eläimet jaetaan satunnaisesti koeryhmiin. Erityistapauksissa voidaan käyttää hyvin nuoria, kantavia tai aiemmin käsiteltyjä eläimiä.

*Koeolosuhteet*

Koe-eläimet

Myrkkyjen kinetiikkaa tutkivissa testeissä voidaan käyttää yhtä tai useampaa koe-eläinlajia sen mukaan, mitä lajeja on käytetty tai käytetään muissa samaa ainetta koskevissa myrkyllisyystutkimuksissa. Jyrsijöitä käytettäessä niiden paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskipainosta.

Lukumäärä ja sukupuoli

Imeytymis- ja eritystesteissä kutakin annostasoa kohden on oltava neljä koe-eläintä. Sukupuoli on valinnainen, mutta tietyissä olosuhteissa voi olla tarpeen tutkia kumpaakin sukupuolta. Jos vasteessa on sukupuolten välisiä eroja, on testattava neljä eläintä kumpaakin sukupuolta. Kun testiin käytetään muita lajeja kuin jyrsijöitä, eläinten lukumäärä voi olla pienempi.

Kun tutkitaan aineen jakautumista kudoksiin, alkuryhmän kokoa suunniteltaessa on otettava huomioon kunakin ajankohtana lopetettavien eläinten määrä sekä tutkittavien ajankohtien lukumäärä.

Kun tutkitaan metaboliaa, ryhmän koko sovitetaan tutkimuksen tarpeiden mukaiseksi.

Moniannostutkimuksissa, joiden kuluessa suoritetaan useina ajankohtina tutkimuksia, ajankohtien lukumäärä ja suunniteltu eläimen/eläinten lopettaminen on otettava huomioon ryhmän kokoa suunniteltaessa siten, että ryhmässä on oltava vähintään kaksi eläintä. Ryhmän on oltava kooltaan sellainen, että siitä voidaan hyväksyttävästi määrittää testattavan aineen imeytyminen, tasanne ja poistuminen (tarvittaessa) sekä/tai metaboliitit.

Annostasot

Kerta-annosta käytettäessä annostasoja on oltava vähintään kaksi; myrkkyvaikutukseton alhainen annos ja korkea annos, joka saattaa aiheuttaa myrkkykineettisten parametrien muutoksia, tai jonka tuloksena on myrkkyvaikutuksia.

Toistuvaa annostelua käytettäessä alhainen annos on yleensä riittävä, mutta tietyissä olosuhteissa korkea annos voi olla tarpeen.

Annostelutapa

Myrkkykineettiset tutkimukset on tehtävä käyttäen samaa annostelutapaa ja samaa liuotinta kuin muissa myrkyllisyystutkimuksissa on käytetty tai suunnitellaan käytettäväksi. Testattavaa ainetta annetaan koe-eläinryhmille määrätyn pituisen ajan kuluessa yleensä suun kautta ruokintaletkulla tai ravinnon yhteydessä, ihon kautta tai hengitysteiden kautta. Testattavan aineen laskimonsisäistä annostusta voidaan käyttää muilla antotavoilla todetun imeytymisen vertailuun. Lisäksi laskimonsisäisen annostelun avulla saadaan nopeasti tietoja aineen jakautumisesta.

Liuottimen mahdollinen vaikutus testattavaan aineeseen on otettava huomioon. Huomiota on myös kiinnitettävä ruokintaletkulla ja ravinnon yhteydessä annetun testattavan aineen imeytymiseroihin ja ravinnon yhteydessä annetun annoksen tarkkaan määritykseen.

Eläinten tarkkailu

Eläimiä on tarkkailtava päivittäin ja myrkky- sekä muut kliiniset oireet, niiden alkaminen, vakavuusaste ja kesto on kirjattava.

*Testin suorittaminen*

Kun eläimet on punnittu, testattavaa ainetta annetaan valitulla tavalla. Tarvittaessa eläinten annetaan paastota ennen testattavan aineen antamista.

Imeytyminen

Imeytymisen nopeus ja laajuus voidaan määrittää usealla tavalla joko käyttämällä vertailuryhmiä(1) tai ilman niitä, kuten esimerkiksi:

— määrittämällä testattavan aineen määrä ja/tai metaboliitit eritteistä kuten virtsasta, sapesta, ulosteista, uloshengitetystä ilmasta ja ruumiiseen jäänyt osa,

— vertaamalla koe- ja kontrolliryhmien ja/tai vertailuryhmien biologista vastetta (esimerkiksi akuutin myrkyllisyyden tutkimukset),

— vertaamalla koe- ja vertailuryhmien munuaisten kautta erittynyttä ainetta ja/tai metaboliitteja,

— määrittämällä testattavan aineen ja/tai sen metaboliittien plasmataso/aikakäyrän alle jäävä pinta-ala ja vertaamalla vertailuryhmästä saatuihin tuloksiin.

(1) Tässä tarkoitettu vertailuryhmä saa testattavaa ainetta jotakin muuta tietä, joka takaa annoksen täydellisen käyttökelpoisuuden

Jakautuminen

Tällä hetkellä on käytettävissä kaksi jakautumisen analysointitapaa, joista voidaan käyttää jompaa kumpaa tai molempia:

— koko ruumiin autoradiografian avulla saadaan hyödyllisiä kvalitatiivisia tietoja,

— kvantitatiivisia tietoja saadaan lopettamalla eläimet eri aikoina altistuksen jälkeen ja määrittämällä kudosten ja elinten sisältämä testattavan aineen ja/tai metaboliittien pitoisuus ja määrä.

Eritys

Erityistutkimuksiin käytetään virtsaa, ulosteita, uloshengitettyä ilmaa sekä joissakin tapauksissa sappea. Näistä eritteistä määritetään testattava aine ja/tai metaboliitit useita kertoja altistuksen jälkeen, kunnes joko 95 % annetusta aineesta on erittynyt tai seitsemän päivää on kulunut sen mukaan, kumpi ehdoista täyttyy ensin.

Joissakin tapauksissa voi olla syytä tutkia testattavan aineen erittymistä imettävien koe-eläinten maitoon.

Metabolia

Aineenvaihduntamäärityksiä tehtäessä biologiset näytteet analysoidaan sopivaa menetelmää käyttäen. Metaboliittien rakenteet on selvitettävä ja todennäköiset aineenvaihduntatiet arvioitava aikaisempien myrkyllisyystutkimuksien avoimeksi jättämien seikkojen selvittämiseksi. Aineenvaihduntateiden selvittämiseksi voi olla tarpeen suorittaa tutkimuksia soluviljelmillä.

Biokemiallisten tutkimusten avulla voidaan saada lisäselvityksiä aineenvaihdunnan suhteesta myrkyllisuuteen. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi aineenvaihduntaentsyymien vaikutuksen määritys, endogeenisten proteiinittomien sulfhydryyliyhdisteiden poistuma ja aineen sitoutuminen makromolekyyleihin.

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään tutkimustyypin perusteella taulukkomuodossa, jota täydentää mahdollisuuksien mukaan graafinen esitys. Jokaisen testiryhmän osalta ilmoitetaan määritysten keskiarvo ja tilastollinen poikkeama suhteessa aikaan, annokseen, kudoksiin ja elimiin. Imeytymisaste ja eritteiden määrä ja kertymisnopeus on määrittää asianmukaisin menetelmin. Aineenvaihduntatutkimuksista on ilmettävä määritettyjen metaboliittien rakenne ja mahdolliset aineenvaihduntatiet.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimuksen laadusta riippuen tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— koe-eläinlaji, kanta, hankintapaikka, ympäristöolosuhteet, ravinto,

— selvitys aineen merkitsemistavasta,

— annostasot ja -välit,

— annostelutiet ja käytetyt liuottimet,

— myrkky- ja muut vaikutukset,

— testattavan aineen ja/tai metaboliittien määritystapa biologisista näytteistä ja uloshengitetystä ilmasta,

— taulukko, jossa esitetään määritystulokset sukupuolen, annoksen, annostustavan, ajan, kudosten ja elinten suhteen,

— imeytyminen ja erittyminen suhteessa aikaan,

— biologisten näytteiden metaboliittien määritys- ja tunnistamistavat,

— aineenvaihduntaa koskevat biokemialliset määritysmenetelmät,

— todennäköiset aineenvaihduntatiet,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 **Arviointi ja tulkinta**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

# MUTAGEENISUUSTESTAUS JA KARSINOGEENISTEN AINEIDEN SEULONTA

## GEENIMUTAATIOT - *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

## 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

*Saccharomyces cerevisiae* -hiivalla on joukko haploidisia ja diploidisia kantoja, joiden avulla voidaan mitata kemiallisten aineitten kykyä aiheuttaa geenimutaatioita ilman metabolista aktivaatiota tai metabolisen aktivaation jälkeen.

Testeissä on käytetty haploidisten kantojen mutaatioita, esim. punaisen, adeniinia vaativan kannan (*ade*-1, *ade*-2) mutaatiota kaksinkertaisen määrän adeniinia vaativaksi valkoiseksi kannaksi, ja selektiivisiä koejärjestelyitä, kuten kanavnaiini- ja sykloheksimidiresistenssin induktiota.

Laajimmin tutkitussa takaisinmutaatiojärjestelmässä käytetään haploidista XV 185-14C -kantaa, jolla on 'ochre'-nonsense- mutaatiot *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 ja *trp* 5-48, joiden takaisinmutaatiota saavat aikaan sellaiset emäsvaihdoksia aiheuttavat mutageenit, jotka aiheuttavat paikkaspesifisiä mutaatioita tai 'ochre'-suppressorimutaatioita. XV 185-14C -kannalla on myös *his* 1-7 -markkeri, missense-mutaatio, jonka takaisinmutaatiota saavat aikaan lähinnä muissa kohdissa tapahtuvat mutaatiot, ja *hom* 3-10 -markkeri, jonka takaisinmutaatiota saavat aikaan lukuraamiinsiirtomutageenit.

Diploidisista *S. cerevisiae* -kannoista ainoa laajassa käytössä oleva on $D_7$, joka on homotsygoottinen geenin *ilv* 1-92 suhteen.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Tutkittavat aineet ja kontrolliaineet tulee sekoittaa soveltuvaan kantaja-aineeseen juuri ennen testiä. Veteen liukenemattomia orgaanisia yhdisteitä tutkittaessa saa orgaanisen liuottimen, kuten etanolin, asetonin tai dimetyylisulfoksidin (DMSO) loppupitoisuus olla korkeintaan 2 tilavuus-%. Kantaja-aineen loppupitoisuus ei saa merkitsevästi vaikuttaa solujen elinkykyyn ja kasvuominaisuuksiin.

Metabolinen aktivaatio

Solut on altistettava tutkittaville aineille sekä ilman eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää että soveltuvan eksogeenisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla käsiteltyjen jyrsijöiden maksoista eristetty postmitokondriaalinen jae, johon on lisätty kofaktoreita. Myös muista lajeista, muista kudoksista tai muista postmitokondriaalisista jakeista peräisin olevat valmisteet tai muut menetelmät saattavat soveltua metaboliseen aktivaatioon.

*Koeolosuhteet*

Testikannat

Geenimutaatiotutkimuksissa yleisimmin käytetyt kannat ovat haploidinen XV 185-14C -kanta ja diploidinen $D_7$-kanta. Myös muut kannat saattavat soveltua tarkoitukseen.

Kasvatusalustat

Hiivojen kuolleisuuden määrittämiseen ja mutanttien määrien laskemiseen käytetään soveltuvia kasvatusalustoja.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Testissä on käytettävä rinnakkaisia altistamattomia, testattavan aineen liuottimelle altistettuja ja positiivisia kontrolliviljelmiä. Kunkin tutkittavan mutaation kohdalla on käytettävä soveltuvia positiivisia kontrolliaineita.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava vähintään viitenä eri pitoisuutena, joiden keskinäiset erot ovat sopivat. Myrkyllisillä aineilla korkein testattu pitoisuus ei saa aiheuttaa yli 5-10 %:n kuolleisuutta. Huonosti veteen liukenevilla aineilla liukoisuus määrää korkeimman tutkittavan pitoisuuden. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

Inkubaatio-olosuhteet

Maljoja inkuboidaan pimeässä 28 - 30 °C:n lämpötilassa 4 - 7 vrk:n ajan.

Spontaanimutaatioiden frekvenssi

Testissä on käytettävä jatkoviljelmiä, joiden spontaanimutaatioiden frekvenssi on normaalina pidettävällä tasolla.

Toistojen lukumäärä

Kussakin pitoisuudessa maljat tehdään ainakin kolmena kappaleena geenimutaation tuottamien prototrofien määrän laskemista ja solujen kuolleisuuden määrittämistä varten. Kokeissa, joissa käytetään alhaisen mutaatiofrekvenssin omaavia markkereita, kuten *hom* 3-10, rinnakkaisten maljojen määrää on lisättävä tilastollisesti käyttökelpoisten tulosten saamiseksi.

*Testin suorittaminen*

*S. cerevisiae* -solujen altistus suoritetaan tavallisesti nesteessä stationäärivaiheessa olevilla tai kasvavilla soluilla. Ensimmäinen koe on tehtävä kasvavilla soluilla, siten että $1 - 5 \times 10^7$ solua/ml altistetaan tutkittavalle aineelle ja seosta ravistellaan 18 tunnin ajan 28 - 37 °C:ssa; altistuksen aikana seokseen lisätään sopiva määrä metabolista aktivaatioseosta, tarpeen mukaan. Altistuksen jälkeen solut sentrifugoidaan, huuhdotaan ja kylvetään sopivalle kasvatusalustalle. Inkubaation jälkeen maljoilta lasketaan solujen kuolleisuus ja tapahtuneet geenimutaatiot. Jos ensimmäisen kokeen tulos on negatiivinen, tehdään toinen koe stationäärivaiheessa olevilla soluilla. Jos ensimmäisen kokeen tulos on positiivinen, tulos varmistetaan soveltuvalla erillisellä kokeella.

## 2 TULOKSET

Tulokset on esitettävä taulukkoina siten, että niistä käyvät ilmi pesäkkeiden lukumäärä, mutanttien lukumäärä, kuolleisuus ja mutaatiofrekvenssi. Kaikki tulokset on varmistettava erillisellä kokeella. Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetty kanta,

— koeolosuhteet: stationäärivaiheessa olevien tai kasvavien solujen käyttö, kasvatusalustojen koostumus, inkubaatiolämpötila ja inkubaatioaika, metabolinen aktivaatiojärjestelmä,

— altistusolosuhteet: altistuspitoisuudet, altistusmenetelmä ja altistuksen kesto, altistuslämpötila, positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— pesäkkeiden lukumäärä, mutanttien lukumäärä, kuolleisuus, mutaatiofrekvenssi, annos/vaste -suhde mikäli mahdollista, tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

MITOOTTINEN REKOMBINAATIO - *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

# 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

*Saccharomyces cerevisiae* -hiivalla esiintyy mitoottista rekombinaatiota sekä geenien välillä (tai yleisemmin ottaen geenin ja sentromeerin välillä) että geenien sisällä. Ensin mainittu ilmiö on nimeltään mitoottinen tekijäinvaihto ja siinä kaksi sisarkromatidia vaihtaa keskenään osia. Jälkimmäinen ilmiö on yleensä yksisuuntainen ja nimeltään geenikonversio. Tekijäinvaihtotutkimukset perustuvat yleensä heterotsygoottiseen kantaan ilmaantuvien resessiivisten homotsygoottisten pesäkkeiden tai maljasektoreiden laskentaan, kun taas geenikonversioiden tutkiminen perustuu prototrofisten revertanttien laskentaan auksotrofisilla heteroalleelisilla kannoilla, joilla on kaksi erilaista viallista alleelia samasta geenistä. Yleisimmin mitoottisen geenikonversion tutkimiseen käytettyjä kantoja ovat $D_4$ (heteroalleelinen *ade* 2 ja *trp* 5 -lokusten suhteen), $D_7$ (heteroalleelinen *trp* 5 -lokuksen suhteen), $BZ_{34}$ (heteroalleelinen *arg* 4 -lokuksen suhteen) ja JD1 (heteroalleelinen *his* 4 ja *trp* 5 -lokusten suhteen). Mitoottista tekijäinvaihtoa voidaan testata kannoilla $D_5$ ja $D_7$ (jälkimmäisellä voidaan havainnoida myös mitoottista geenikonversiota ja takaisinmutaatiota *ilv* 1-92 -lokuksessa), jotka kummatkin ovat heteroalleelisia *ade* 2 -lokuksen komplementtigeenien suhteen ja joissa mitoottinen tekijäinvaihdos ilmenee maljoilla punaisina tai vaaleanpunaisina homotsygoottisina sektoreina.

## 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

## 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Tutkittavat aineet sekä kontrolli- tai vertailuyhdisteet on sekoitettava soveltuvaan kantaja-aineeseen juuri ennen testiä. Veteen liukenemattomia orgaanisia yhdisteitä tutkittaessa saa orgaanisen liuottimen, kuten etanolin, asetonin tai dimetyylisulfoksidin (DMSO) loppupitoisuus olla korkeintaan 2 tilavuus-%. Kantaja-aineen loppupitoisuus ei saa merkitsevästi vaikuttaa solujen elinkykyyn ja kasvuominaisuuksiin.

Metabolinen aktivaatio

Solut on altistettava tutkittaville aineille sekä ilman eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää että soveltuvan eksogeenisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla käsiteltyjen jyrsijöiden maksoista eristetty postmitokondriaalinen jae, johon on lisätty kofaktoreita. Myös muista lajeista, muista kudoksista tai muista postmitokondriallisista jakeista peräisin olevat valmisteet tai muut menetelmät saattavat soveltua metaboliseen aktivaatioon.

*Koeolosuhteet*

Testikannat

Yleisimmin käytettyjä ovat diploidiset kannat $D_4$, $D_5$, $D_7$ ja $JD_1$. Myös muut kannat saattavat soveltua tarkoitukseen.

Kasvatusalustat

Hiivojen kuolleisuuden ja mitoottisen rekombinaatiofrekvenssin määrittämiseen käytetään soveltuvia kasvatusalustoja.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Testissä on käytettävä rinnakkaisia altistamattomia, testattavan aineen liuottimelle altistettuja ja positiivisia kontrolliviljelmiä. Kunkin tutkittavan rekombinaation kohdalla on käytettävä soveltuvia positiivisia kontrolliaineita.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava vähintään viitenä eri pitoisuutena, joiden keskinäiset erot ovat sopivat. Huomioon otettavia seikkoja ovat mm. aineen sytomyrkyllisyys ja liukoisuus. Alin pitoisuus ei saa lainkaan lisätä solujen kuolleisuutta. Myrkyllisillä aineilla korkein testattu pitoisuus ei saa aiheuttaa yli 5-10 %:n kuolleisuutta. Huonosti veteen liukenevilla aineilla liukoisuus määrää korkeimman tutkittavan pitoisuuden. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

Solut voidaan altistaa tutkittavalle aineelle joko stationäärivaiheessa tai kasvuvaiheessa, ja pisin altistusaika voi olla 18 tuntia. Pitkässä altistuksessa viljelmiä on kuitenkin seurattava mikroskoopilla mahdollisen itiönmuodostuksen varalta, sillä itiönmuodostus pilaa testin.

Inkubaatio-olosuhteet

Maljoja inkuboidaan pimeässä 28 - 30 °C:n lämpötilassa 4 -7 vrk:n ajan. Maljoja, joilta tutkitaan mitoottisen tekijäinvaihdoksen aikaansaamat punaiset ja vaaleanpunaiset homotsygoottiset sektorit, on inkuboinnin jälkeen säilytettävä jääkaapissa (noin 4 °C:ssa) yhdestä kahteen vuorokautta ennen laskemista, jotta pesäkkäiden väri ehtii kehittyä.

Spontaaninen mitoottinen rekombinaatiofrekvenssi

Testissä on käytettävä jatkoviljelmiä, joiden spontaaninen mitoottinen rekombinaatiofrekvenssi on normaalina pidettävällä tasolla.

Toistojen lukumäärä

Kussakin pitoisuudessa maljat tehdään ainakin kolmena kappaleena mitoottisen geenikonversion tuottamien prototrofien määrän laskemista ja solujen kuolleisuuden määrittämistä varten. Kokeissa, joissa lasketaan mitoottisen tekijäinvaihdon aikaansaamia resessiivisiä homotsygootteja, rinnakkaisten maljojen määrää on lisättävä riittävän pesäkemäärän saamiseksi.

*Testin suorittaminen*

*S. cerevisiae* -solujen altistus suoritetaan tavallisesti nesteessä stationäärivaiheessa olevilla tai kasvavilla soluilla. Ensimmäinen koe on tehtävä kasvavilla soluilla, siten että $1 - 5 \times 10^7$ solua/ml altistetaan tutkittavalle aineelle ja seosta ravistellaan 18 tunnin ajan 28 - 37 °C:ssa; altistuksen aikana seokseen lisätään sopiva määrä metabolista aktivaatioseosta, mikäli tarpeellista.

Altistuksen jälkeen solut sentrifugoidaan, huuhdotaan ja kylvetään sopivalle kasvatusalustalle. Inkubaation jälkeen maljoilta lasketaan solujen kuolleisuus ja tapahtuneet mitoottiset rekombinaatiot.

Jos ensimmäisen kokeen tulos on negatiivinen, tehdään toinen koe stationäärivaiheessa olevilla soluilla. Jos ensimmäisen kokeen tulos on positiivinen, tulos varmistetaan erillisellä kokeella.

## 2 TULOKSET

Tulokset on esitettävä taulukkoina siten, että niistä käyvät ilmi pesäkkeiden lukumäärä, rekombianttien lukumäärä, kuolleisuus ja rekombinaatiofrekvenssi.

Tulokset on varmistettava erillisellä kokeella.

Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetty kanta,

— koeolosuhteet: stationäärivaiheessa olevien tai kasvavien solujen käyttö, kasvatusalustojen koostumus, inkubaatiolämpötila ja inkubaatioaika, aineenvaihdunnallinen aktivaatiojärjestelmä,

— altistusolosuhteet: altistuspitoisuudet, altistusmenetelmä ja altistuksen kesto, altistuslämpötila, positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— pesäkkeiden lukumäärä, rekombinanttien lukumäärä, kuolleisuus, rekombinaatiofrekvenssi, annos/vaste -suhde mikäli mahdollista, tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta,

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

NISÄKÄSSOLUVILJELMÄLLÄ SUORITETTAVA GEENIMUTAATIOTESTI

## 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

Nisäkässoluviljelmiä voidaan käyttää kemiallisten aineiden aiheuttamien mutaatioiden toteamiseen. Yleisesti käytössä olevia solulinjoja ovat mm. hiiren lymfoomasolulinja L5178Y ja kiinanhamsterin solulinjat CHO ja V-79. Useimmat mutaatiotestit näillä solulinjoilla perustuvat tymidiinikinaasi (TK), hypoksantiiniguaniinifosforibosyylitransferaasi (HPRT)([1]) ja $Na^+/K^+$-ATP-aasi -lokusten mutaatioiden havainnointiin. TK- ja HPRT-testeillä voidaan todeta emäsparimutaatiot, lukuraaminsiirtomutaatiot ja pienet deleetiot, kun taas $Na^+/K^+$-ATP-aasi -testeillä havaitaan ainoastaan emäsparimutaatiot.

Solu, jolta $TK^+ \rightarrow TK^-$ -mutaation johdosta puuttuu tymidiinikinaasi-entsyymi (TK), on resistentti bromodeoksiuridiinille (BrdU), fluorodeoksiuridiinille (FdU) ja trifluorotymidiinille (TFT), koska tällöin ei ole olemassa SOS- entsyymiä, joka liittäisi nämä antimetaboliitit solun nukleotideihin; solu syntetisoi itse kaikki tarvitsemansa nukleotidit. Sen sijaan tymidiinikinaasin läsnäollessa solussa oleva BrdU, FdU ja TFT liittyvät nukleotidien rakennusosiksi, millä puolestaan on solun aineenvaihdunnan estävä sytotoksinen vaikutus. Näin ollen mutatoituneet solut kykenevät lisääntymään BrdU:n, FdU:n ja TFT:n läsnäollessa, kun taas normaalit, tymidiinikinaasia sisältävät solut eivät kykene. Samaan tapaan solut, joilta puuttuu HPRT-entsyymi, ovat resistenttejä 8-atsaguaniinille (AG) ja 6-tioguaniinille (TG). Solut, joiden $Na^+/K^+$-ATP-aasi -entsyymi on muuttunut, voidaan havaita niiden ouabaiiniresistenssin perusteella.

Sytotoksisuutta mitataan tarkastelemalla tutkittavan aineen vaikutusta soluviljelmän pesäkkeenmuodostuskykyyn (kloonaustehokkuuteen) tai kasvunopeuteen. Mutaatiofrekvenssi lasketaan siten, että tunnettu lukumäärä soluja kylvetään toisaalta mutanttien toteamiseksi selektiivistä antimetaboliittia sisältävälle alustalle ja toisaalta kuolleisuuden määrittämiseksi alustalle, joka ei sisällä selektiivistä antimetaboliittia. Sopivan inkubaatioajan kuluttua lasketaan pesäkkeet. Mutaatiofrekvenssi lasketaan mutanttipesäkkeiden lukumäärän ja kuolleisuuden perusteella.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Solut

Testiä varten on tarjolla useita eri solulinjoja, kuten L5178Y-, CHO- ja V-79 -linjojen subkloonit, joilla kaikilla on osoitettu herkkyys kemiallisille mutageeneille, hyvä kloonaustehokkuus ja alhainen spontaanimutaatiofrekvenssi. Solujen karyotyypin pysyvyys voidaan ajoittain tarkastaa, ja solut on tutkittava Mycoplasma-kontaminaation varalta. Myös muita solutyyppejä voidaan käyttää, jos niiden soveltuvuus kemiallisten mutageenien aiheuttamien geenimutaatioiden testaamiseen on tutkimuksin todettu.

([1]) Aikaisemmin HGPRT

Kasvatusalustat

Testissä on käytettävä soveltuvia kasvatusalustoja ja inkubaatio-olosuhteita (lämpötila, kasvatusastiat, $CO_2$- pitoisuus, kosteus yms.). Alustat ja seerumit on valittava käytettävän selektiojärjestelmän ja solutyypin mukaan.

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 tai kasvunopeuteen.

Metabolinen aktivaatio

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan eksogeenisen nisäkäsperäisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Jos käytetään solutyyppejä, joilla on itsessään kyky metaboloida vierasaineita, tämän metabolisen aktiivisuuden on oltava nopeudeltaan ja 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
  — hykantoni
— epäsuorasti vaikuttavat aineet:
  — 2-asetyyliaminofluoreeni
  — 7,12-dimetyylibentsantraseeni
  — N-nitrosodimetyyliamiini.

Testistä riippuen kokeessa voidaan lisäksi käyttää ylimääräistä positiivista kontrollia, joka kuuluu samaan kemiallisten aineitten ryhmään kuin tutkittava aine.

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.

*Testin suorittaminen*

Solumäärän viljelmää kohden on oltava suhteessa spontaanimutaatioiden frekvenssiin; yleisohjeena elinkykyisten solujen lukumäärän on oltava kymmenen kertaa spontaanimutaatiofrekvenssin käänteisluvun suuruinen.

Solujen altistusajan on oltava sopiva; useimmissa tapauksissa 2 - 5 tuntia riittää. 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 kuolleisuuden määrittämiseksi ja mutanttifenotyypin ilmaantumisen toteamiseksi.

Ekspressioajan on oltava riittävän pitkä, jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ekspressio on lähellä optimaalista. Ekspressioajan jälkeen mutanttien lukumäärä ja solujen kuolleisuus määritetään kasvattamalla niitä alustoilla, joista toiset sisältävät selektiivistä antimetaboliittia ja toiset eivät.

Kaikki tulokset varmistetaan erillisellä kokeella.

## 2 TULOKSET

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Sekä mutaatiomaljoista että kuolleisuuden määrittämiseen käytetyistä maljoista on ilmoitettava maljakohtaiset pesäkemäärät niin tutkittavalle aineelle altistettujen soluviljelmien kuin kontrollienkin osalta. Myös keskimääräinen pesäkeluku maljaa kohti ja keskipoikkeama on ilmoitettava. Mutaatiofrekvenssi on ilmaistava mutanttien osuutena eloonjääneistä soluista. Kuolleisuus ja kloonaustehokkuus on ilmaistava prosenttiosuutena kontrolliviljelmien pesäkeluvusta. Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetty solulinja, soluviljelmien lukumäärä, soluviljelmien ylläpitomenetelmät,

— koeolosuhteet: kasvatusalustojen koostumus, $CO_2$-pitoisuus, tutkittavan aineen pitoisuus, käytetty kantaja-aine, inkubaatiolämpötila, inkubaatioaika, ekspressioaika (soveltuvin osin tiedot solujen lukumäärästä, jatkoviljelmien lukumäärästä ja kasvatusalustan vaihtoajoista), altistuksen kesto, solutiheys altistuksen aikana, käytetty nisäkäsperäinen metabolinen aktivaatiojärjestelmä, positiiviset ja negatiiviset kontrollit, käytetty selektiivinen antimetaboliitti,

— annostuksen valinnassa käytetyt perusteet,

— eloonjääneiden ja mutatoituneiden solujen lukumäärän selvittämismenetelmä,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

DNA-VAURIO JA SEN KORJAANTUMINEN - UDS-TESTI NISÄKÄSSOLUVILJELMÄLLÄ

# 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

UDS-testissä (Unscheduled DNA Synthesis test) nisäkässolu altistetaan kemiallisille tai fysikaalisille tekijöille, minkä jälkeen näiden mahdollisesti vaurioittama DNA-segmentti leikkautuu irti ja poistuu kromosomista. Testi perustuu tritiumilla leimatun tymidiinin ($^3$H-TdR) sitoutumiseen nisäkässolun DNA:han solunjakautumissyklin S-vaiheen ulkopuolella. $^3$H-TdR:n sitoutuminen voidaan todeta altistettujen solujen DNA:sta autoradiografisesti tai nestetuikelaskennalla. Testissä altistetaan primaarisia rotan maksasoluja tai nisäkässoluviljelmä tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. UDS-testi voidaan myös suorittaa *in vivo*.

## 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

## 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Tutkittava aine ja kontrolli- tai vertailuaineet on sekoitettava kasvatusalustaan tai liuotettava tai sekoitettava soveltuvaan kantaja-aineeseen ja sen jälkeen edelleen kasvatusalustaan testiä varten. Kantaja-aineen loppupitoisuus ei saa vaikuttaa solujen elinkykyyn.

Testissä voidaan käyttää primaarisia rotan maksasoluviljelmiä, primaarisia ihmisen lymfosyyttiviljelmiä tai pysyviä solulinjoja (esim. ihmisen diploidisia fibroblasteja).

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

*Koeolosuhteet*

Soluviljelmien lukumäärä

Autoradiografiaa käytettäessä tarvitaan ainakin kaksi ja nestetuikelaskentaa käytettäessä kuusi (tai vähemmän, mikäli tämä on tieteellisesti perusteltua) soluviljelmää kutakin parametriyhdistelmää kohti.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Kuhunkin kokeeseen on sisällyttävä samanaikaisia positiivisia ja negatiivisia (altistamattomia ja/tai kantaja-aineelle altistettuja) kontrolleja sekä ilman metabolista aktivaatiota että metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

Rotan maksasoluilla suoritettavan testin positiivisia kontrolleja voivat olla esimerkiksi 7,12-dimetyylibentsantraseeni (7,12-DMBA) tai 2-asetyyliaminofluoreeni (2-AAF). Pysyvien solulinjojen osalta 4-nitrokinoliini-N-oksidi (4-NQO) on esimerkki positiivisesta kontrollista, jota voidaan käyttää ilman metabolista aktivaatiota autoradiografisesti tai nestetuikelaskennalla suoritettavissa testeissä; N-dimentyylinitrosamiini puolestaan on esimerkki positiivisesta kontrolliyhdisteestä, jota käytetään metabolisten aktivaatiojärjestelmien läsnäollessa.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava useana eri pitoisuutena, siten että käytetty pitoisuusalue mahdollistaa annos/vaste -suhteen selvittämisen. Korkeimmalla pitoisuudella on oltava jonkinasteinen sytomyrkkyvaikutus. Huonosti veteen liukenevilla aineilla pitoisuus määräytyy liukoisuuden mukaan. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

Solut

Soluviljelmien kasvatuksessa on käytettävä soveltuvia kasvatusalustoja, $CO_2$-pitoisuuksia, lämpötiloja ja kosteusarvoja. Pysyvät solulinjat on tarkastettava ajoittain *Mycoplasma*-kontaminaation varalta.

Metabolinen aktivaatio

Primaarisissa maksasoluviljelmissä ei käytetä metabolista aktivaatiojärjestelmää. Pysyvät solulinjat ja lymfosyytit altistetaan tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että soveltuvan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa.

*Testin suorittaminen*

Soluviljelmien perustaminen

Testissä käytettävät pysyvät solulinjat erotetaan kantaviljelmistä esim. trypsiinin avulla tai ravistelemalla, kylvetään kasvatusastioihin sopivaan tiheyteen ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

Rotan maksasoluista tehdään lyhytaikaisviljelmät antamalla vastaeroteltujen maksasolujen kiinnittyä kasvupinnalle soveltuvassa kasvualustassa.

Ihmisen lymfosyyttiviljelmät perustetaan soveltuvin menetelmin.

Soluviljelmien altistaminen tutkittavalle aineelle

Primaariset rotan maksasolut:

Vastaeristettyjä rotan maksasoluja altistetaan sopivan pituiseksi ajaksi tutkittavalle aineelle alustassa, joka sisältää $^3$H-TdR:ä. Altistuksen jälkeen kasvatusalusta poistetaan kasvatusastiasta, ja solut huuhdellaan, fiksoidaan ja kuivataan. Objektilasit kastetaan autoradiografiaemulsioon (vaihtoehtoisesti voidaan käyttää valmista 'stripping'-filmiä) ja valottumisajan jälkeen lasit kehitetään, värjätään ja lasketaan.

Pysyvät solulinjat ja lymfosyytit:

*Autoradiografiset menetelmät:* Soluviljelmiä altistetaan sopivaksi ajaksi tutkittavalle aineelle, minkä jälkeen ne käsitellään $^3$H- TdR:llä. Altistus- ja käsittelyajat määräytyvät tutkittavan aineen luonteen, metaboliajärjestelmien aktiivisuuden ja solutyypin mukaan. Maksimaalisen S-vaiheen ulkopuolisen DNA- synteesin (unscheduled DNA-synthesis) havaitsemiseksi tulee $^3$H- TdR lisätä kasvatusalustaan yhtä aikaa kuin tutkittava aine tai muutama minuutti tutkittavalle aineelle altistuksen jälkeen. Tutkittavan aineen ja $^3$H-TdR:n väliset mahdolliset vuorovaikutukset vaikuttavat valintan näiden kahden menetelmän välillä. S- vaiheen ulkopuolisen DNA-synteesin ja semikonservatiivisen DNA-replikaation erottamiseksi toisistaan jälkimmäinen voidaan estää esimerkiksi käyttämällä kasvatusalustaa, josta puuttuu arginiini tai jonka seerumipitoisuus on alhainen tai joka sisältää hydroksiureaa.

*S-vaiheen ulkopuolisen DNA-synteesin mittaaminen nestetuikelaskennan avulla:* Ennen solujen altistamista tutkittavalle aineelle solunjakautumisen S-vaiheen alkaminen estetään edellä kuvatulla tavalla, minkä jälkeen altistaminen suoritetaan samoin kuin autoradiografiaa käytettäessä. Inkubaation jälkeen DNA eristetään soluista, ja DNA:n kokonaismäärä sekä sitoutuneen $^3$H-TdR:n määrä mitataan.

On huomattava, että semikonservatiivisen DNA-replikaation estäminen ei ole tarpeen stimuloimattomissa ihmisen lymfosyyttiviljelmissä.

*Analyysi*

Autoradiografinen määritys

S-vaiheessa olevat tumat jätetään laskennan ulkopuolelle määritettäessä viljeltyjen solujen S-vaiheen ulkopuolista DNA- synteesiä. Kutakin tutkittavan aineen pitoisuutta kohti on laskettava vähintään 50 solua. Objektilasit on kooditettava ennen laskemista. Kultakin lasilta lasketaan useita sattumanvaraisesti valittuja, selvästi toisistaan erillään olevia näkökenttiä. Sytoplasmaan sitoutunut $^3$H-TdR määritetään laskemalla kolme tuman suuruista sytoplasma-aluetta kustakin laskettavasta solusta.

Nestetuikelaskentaan perustuva määritys

Nestetuikelaskentaa käytettäessä on kutakin pitoisuutta ja kontrollia kohti oltava riittävä määrä rinnakkaisia soluviljelmiä. Kaikki tulokset on varmistettava erillisellä kokeella.

## 2 TULOKSET

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa.

### 2.1 Autoradiografinen määritys

$^3$H-TdR:n sitoutuminen sytoplasmaan ja tuman kohdalla olevien valottuneiden pisteiden lukumäärä on esitettävä erikseen.

$^3$H-TdR:n sytoplasmaattisen sitoutumisen ja tumassa olevien valottuneiden pisteiden lukumäärän jakautumia voidaan kuvata keskiarvolla, mediaanilla ja moodilla.

### 2.2 Nestetuikelaskentaan perustuva määritys

Ilmoitettaessa sitoutuneen $^3$H-TdR:n määrää nestetuikelaskentaan perustuvassa määrityksessä tulee yksikkönä olla dpm/µg DNA. Sitoutuneen $^3$H-TdR:n määrän jakautumaa kuvaamaan voidaan käyttää saatujen dpm/µg DNA -lukemien keskiarvoa ja keskihajontaa. Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetyt solut, solutiheys ja altistettujen jatkoviljelmien järjestysluku, soluviljelmien lukumäärä,

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät, kuten kasvatusalusta, lämpötila ja $CO_2$-pitoisuus,

— tutkittu aine, kantaja-aine, testissä käytetyt pitoisuudet ja pitoisuuksien valinnassa käytetyt perusteet,

— metabolisten aktivaatiojärjestelmien yksityiskohtainen kuvaus,

— altistusohjelma,

— positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— käytetty autoradiografiamenetelmä,

— solunjakautumisen S-vaiheen estämisessä käytetyt menetelmät,

— DNA:n eristämisessä ja kokonais-DNA:n määrittämisessä käytetyt menetelmät nestetuike-laskentaan perustuvassa testissä,

— annos/vaste -suhde mikäli mahdollista,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 **Arviointi ja tulkinta**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

SISARKROMATIDIVAIHDOSTESTI

# 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

Sisarkromatidivaihdostesti (Sister Chromatid Exchange, SCE) on lyhytaikainen testi kahdentuvan kromosomin sisarkromatidien kesken tapahtuvan DNA:n vaihtumisen toteamiseksi. Sisarkromatidivaihdoksessa tapahtuu DNA:n replikaatiotuotteiden vaihtumista kahden, ilmeisesti homologisen lokuksen välillä. Vaihtumistapahtumassa oletetaan DNA-ketjun katkeavan ja liittyvän uudelleen yhteen, vaikka ilmiön molekyylitason tapahtumia ei juuri tunneta. Sisarkromatidivaihdosten toteaminen edellyttää sisarkromatidien differentiaalileimausta, joka suoritetaan antamalla bromodeoksiuridiinin sitoutua kromosomaaliseen DNA:han kahden solusyklin ajan.

Nisäkässoluviljelmä altistetaan tutkittavalle aineelle tarpeen mukaan sekä ilman metabolista aktivaatiota että nisäkäsperäisen eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Soluviljelmää kasvatetaan kahden DNA:n replikaatiosyklin ajan alustassa, joka sisältää bromodeoksiuridiinia. Soluja käsitellään tämän jälkeen tumasukkulan muodostumisen inhibiittorilla (esim. kolkisiinilla) solujen pysäyttämiseksi mitoosin metafaasivaiheeseen (c-metafaasiin), minkä jälkeen solut kerätään ja niistä tehdään kromosomipreparaatit.

## 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

## 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

— Testissä voidaan käyttää primaarisia soluviljelmiä, (ihmisen lymfosyyttejä) tai pysyviä solulinjoja (esim. kiinanhamsterin ovariosoluja). Solulinjat on tarkastettava Mycoplasma-kontaminaation varalta.

— Testissä on käytettävä soveltuvia kasvatusalustoja ja inkubaatio-olosuhteita (esim. lämpötila, kasvatusastiat, $CO_2$- pitoisuus ja kosteus).

— Tutkittavat aineet voidaan sekoittaa kasvatusalustaan tai liuotettava tai sekoitettava soveltuviin kantaja-aineisiin ennen solujen altistamista. Kantaja-aineen loppupitoisuus kasvatusastiassa ei saa merkitsevästi vaikuttaa solujen elinkykyyn tai kasvunopeuteen, ja sen vaikutusta sisarkromatidivaihdosfrekvenssiin on seurattava kontrollikokeella, jossa altisteena on tutkittavan aineen kantaja-aine.

— Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että nisäkäsperäisen eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Jos käytetään solutyyppejä, joilla on itsessään kyky metaboloida vierasaineita, tämän metabolisen aktiivisuuden on oltava nopeudeltaan ja luonteeltaan tutkittavalle aineryhmälle soveltuva.

*Koeolosuhteet*

Soluviljelmien lukumäärä

Kutakin parametriyhdistelmää kohti on oltava ainakin kaksi rinnakkaista soluviljelmää.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Kuhunkin kokeeseen on sisällyttävä sekä suoraan vaikuttavia että metabolista aktivaatiota vaativia positiivisia kontrolleja; myös kantaja-ainekontrollia on käytettävä.

Seuraavat ovat esimerkkejä aineista, joita voidaan käyttää positiivisina kontrolleina:

— suoraan vaikuttava aine:

  — etyylimetaanisulfonaatti

— epäsuorasti vaikuttava aine:

  — syklofosfamidi

Tarvittaessa kokeessa voidaan lisäksi käyttää ylimääräistä positiivista kontrollia, joka kuuluu samaan kemiallisten aineitten ryhmään kuin tutkittava aine.

Altistuspitoisuudet

Tutkittava aine on testattava vähintään kolmena eri pitoisuutena, joiden keskinäiset erot ovat sopivat. Korkeimmalla pitoisuudella on oltava merkitsevä myrkkyvaikutus, mutta se ei saa silti estää riittävää solunjakautumista. Huonosti veteen liukenevilla aineilla pitoisuus määräytyy liukoisuuden mukaan. Vesiliukoisten myrkyttömien aineiden korkein tutkittava pitoisuus on päätettävä tapauskohtaisesti.

*Testin suorittaminen*

Soluviljelmien perustaminen

Testissä käytettävät pysyvät solulinjat erotetaan kantaviljelmistä esim. trypsiinin avulla tai ravistelemalla, kylvetään kasvatusastioihin sopivaan tiheyteen ja inkuboidaan 37 °C:ssa. Yksikerrosviljelmissä solujen lukumäärä kasvatusastiaa kohti on säädettävä siten, että viljelmien konfluenttisuus ei juuri ylitä 50 prosenttia solujen keräyshetkellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää suspensioviljelmiä. Ihmisen lymfosyyttiviljelmät perustetaan heparinisoidusta verestä soveltuvin menetelmin, ja viljelmiä inkuboidaan 37 °C:ssa.

Altistus

Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi tutkittavalle aineelle; useimmissa tapauksissa 1-2 tuntia voi olla riittävä, mutta tietyissä tapauksissa altistusaikaa voidaan pidentää aina kahteen täyteen solunjakautumissykliin saakka. 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 kahden solunjakautumissyklin ajan bromodeoksiuridiinin läsnäollessa. Vaihtoehtoisesti solut voidaan altistaa samanaikaisesti tutkittavalle aineelle ja bromodeoksiuridiinille siten, että kokonaisviljelyaika on kaksi solunjakautumissykliä.

Ihmisen lymfosyytit altistetaan niiden ollessa semisynkronisessa kasvuvaiheessa.

Solut analysoidaan niiden ollessa toisessa altistuksen alkamisen jälkeisessä jakautumisvaiheessa, kun on varmistettu, että solunjakautumissyklin herkimmät vaiheet ovat altistuneet tutkittavalle aineelle. Bromodeoksiuridiinia sisältävän DNA:n fotolysoitumisen minimoimiseksi kaikkia bromodeoksiuridiinia sisältäviä soluviljelmiä on käsiteltävä pimeässä tai heikossa hehkulampun valossa solujen keräämiseen saakka.

Solujen kerääminen

Soluja käsitellään tumasukkulan muodostumisen inhibiittorilla (esim. kolkisiinilla) 1-4 tuntia ennen solujen keräämistä. Jokaisen viljelmän solut kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaattien valmistamiseksi.

Kromosomipreparaattien valmistus ja värjäys

Kromosomipreparaatit valmistetaan normaalein sytogeneettisin menetelmin. Objektilasien värjäys sisarkromatidivaihdosten osoittamiseksi voidaan tehdä useilla eri menetelmillä (esim. fluoresenssi + Giemsa -värjäys).

Analyysi

Analysoitavien solujen lukumäärä perustuu kontrolliviljelmien spontaaniin sisarkromatidivaihdosfrekvenssiin. Yleensä kustakin viljelmästä lasketaan ainakin 25 hyvin levinneen metafaasin sisarkromatidivaihdokset. Objektilasit koodataan ennen analyysiä. Ihmisen lymfosyyteistä analysoidaan ainoastaan 46 sentromeeriä sisältävät metafaasit. Pysyvistä solulinjoista analysoidaan ainoastaan metafaasit, joiden sentromeerien lukumäärä on moodi ± 2. Tuloksissa on ilmaistava, onko sentromeerin kohdalla havaittu leiman vaihtuminen tulkittu sisarkromatidivaihdokseksi vai ei. Tulokset on varmistettava erillisellä kokeella.

## 2 TULOKSET

Tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Sisarkromatidivaihdosten lukumäärä kussakin metafaasissa ja sisarkromatidivaihdosten keskimääräinen lukumäärä kromosomia kohti kussakin metafaasissa on kirjattava erikseen kunkin altistetun viljelmän ja kontrolliviljelmän osalta. Tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— käytetyt solut, soluviljelmien ylläpitomenetelmät,

— koeolosuhteet: kasvatusalustojen koostumus, $CO_2$-pitoisuus, tutkitun aineen pitoisuus, käytetty kantaja-aine, inkubaatiolämpötila, altistusaika, käytetty tumasukkulan muodostumisen inhibiittori ja sen pitoisuus sekä käsittelyaika, käytetty nisäkäsperäinen aktivaatiojärjestelmä, positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— viljelmien lukumäärä parametriyhdistelmää kohti,

— kromosomipreparaattien valmistusmenetelmän yksityiskohtainen kuvaus,

— analysoitujen metafaasien lukumäärä (erikseen kustakin soluviljelmästä),

— sisarkromatidivaihdosten keskimääräinen lukumäärä solua kohti ja kromosomia kohti (erikseen kustakin soluviljelmästä),

— sisarkromatidivaihdosten laskentaperusteet,

— annostusten valinta perusteet,

— annos/vaste -suhde mikäli mahdollista,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

RESESSIIVI LETAALI -TESTI BANAANIKÄRPÄSELLÄ (*DROSOPHILA MELANOGASTER*)

# 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

Resessiivi letaali -testillä voidaan todeta pistemutaatiot ja pienet deleetiot banaanikärpäsen ituradan soluissa. Testillä havaitaan mutaatiot noin 800:ssa X-kromosomin lokuksessa, jotka muodostavat noin 80 % kaikista X-kromosomin lokuksista. X-kromosomi puolestaan edustaa noin yhtä viidesosaa banaanikärpäsen koko haploidisesta perintöaineksesta.

Banaanikärpäsen X-kromosomissa tapahtuvat mutaatiot ilmenevät mutanttigeeniä kantavien koiraiden fenotyypissä. Jos mutaatio on hemitsygoottisena letaali, mutaation tapahtuminen voidaan päätellä siitä, että jälkeläissukupolvesta puuttuu toinen niistä kahdesta koirastyypistä, jotka normaalisti esiintyvät heterotsygoottisen naaraan jälkeläisten joukossa. Resessiivi letaali -testissä näitä ilmiöitä hyödynnetään spesifisiä markkereita ja uudelleen järjestynyttä geenimateriaalia sisältävien kromosomien avulla.

## 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

## 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Kannat

Testissä voidaan käyttää hyvin kuvaillun villikannan koiraita ja Muller-5 -kannan naaraita. Myös muita sopivalla tavalla merkittyjä naaraskantoja, joilla on multippeleita inversioita X-kromosomeissa, voidaan käyttää.

Tutkittava aine

Tutkittava aine on liuotettava veteen. Veteen liukenemattomat aineet voidaan liuottaa tai sekoittaa soveltuviin kantaja-aineisiin (esim. etanolin ja Tween-60:n tai Tween-80:n seokseen) ja sen jälkeen laimentaa vedellä tai suolaliuoksella ennen kärpäsille antamista. Dimetyylisulfoksidin (DMSO:n) käyttöä kantaja-aineena tulee välttää.

Kärpästen lukumäärä

Testi on suunniteltava etukäteen määriteltyjen tilastollisten herkkyys- ja tehokkuusvaatimusten mukaisesti. Sopivalla kontrollikokeella todettu spontaanimutaatiofrekvenssi vaikuttaa suuresti analysoitavien altistettujen kromosomien lukumäärään.

Antotapa

Altistus voidaan toteuttaa antamalla altiste suun kautta, ruiskeena tai kaasu- tai höyryaltistuksena. Tutkittava aine voidaan syöttää sokeriliuoksessa. Tarvittaessa mukaan aineet voidaan liuottaa 0,7 % NaCl-liuokseen ja injektoida rintakehään tai vatsaan.

Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Testiin on sisällytettävä negatiivisia (kantaja-ainekontrolleja) ja positiivisia kontrolleja. Jos kuitenkin on käytettävissä laboratoriokohtaiset oletusarvot (laboratory historical control data), samanaikaisia negatiivisia kontrolleja ei tarvita.

Altistustasot

Testissä on käytettävä kolmea eri altistustasoa. Alustavassa tutkimuksessa voidaan tutkittavasta aineesta käyttää yhtä altistustasoa, jonka on oltava suurin siedetty pitoisuus tai pitoisuus, jolla on joitakin myrkkyvaikutuksia. Myrkyttömien aineitten kohdalla on käytettävä suurinta pitoisuutta, joka on käytännössä mahdollinen.

*Testin suorittaminen*

Villikoiraat (ikä 3-5 vrk) altistetaan tutkittavalle aineelle, minkä jälkeen niiden kunkin annetaan pariutua useiden Muller-5 -kannan tai jonkin muun asianmukaisesti (multippeleilla X- kromosomi-inversioilla) merkityn kannan nuorten naaraiden kanssa. Naaraat vaihdetaan uusiin joka toinen tai kolmas vuorokausi koko sukusolusyklin kattamiseksi. Naaraiden jälkeläisten laskennalla havaittavat letaalivaikutukset voidaan luokitella valmiisiin siittiöihin, keski- tai myöhäisasteen spermatideihin, varhaisasteen spermatideihin, spermatosyytteihin ja spermatogonioihin kohdistuneista altistusvaikutuksista johtuviksi.

Edellä kuvatusta risteytyksestä saatujen heterotsygoottisten $F_1$- polven naaraiden annetaan kunkin pariutua (so. yksi naaras kussakin kasvatuspullossa) saman jälkeläisparven koiraiden kanssa. $F_2$-polvessa kukin kärpäsviljelmä tarkastetaan villikoiraiden puuttumisen toteamiseksi. Jos jokin viljelmä näyttää saaneen alkunsa sellaisesta $F_1$-naaraasta, joka on edellisestä polvesta saanut letaalimutaation sisältävän X- kromosomin (eli viljelmässä ei havaita lainkaan koiraita, joilla olisi altistettu X-kromosomi), tällaisen naaraan naaraspuoliset, saman genotyypin omaavat jälkeläiset on testattava, jotta nähdään, toistuuko letaalivaikutus seuraavassa sukupolvessa.

## 2 TULOKSET

Tulokset on taulukoitava siten, että niistä ilmenee testattujen X-kromosomien lukumäärä, steriilien koiraiden lukumäärä sekä kullakin altistuspitoisuudella ja pariutumisjaksolla havaittujen letaalikromosomien lukumäärä kullakin altistetulla koiraalla. Tuloksissa on ilmaistava myös letaalimutaatioiden lukumäärien jakautuma koirasta kohti. Nämä tulokset on varmistettava erillisellä kokeella.

Resessiivinen letaali -testien tulosten merkitsevyys on arvioitava soveltuvin tilastollisin menetelmin. Resessiivisten letaalimutaatioiden kasaantuminen yhden koiraan kohdalle on otettava huomioon ja käsiteltävä soveltuvin tilastollisin menetelmin.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— kanta: käytetyt banaanikärpäskannat, hyönteisten ikä, altistettujen koiraiden lukumäärä, steriilien koiraiden lukumäärä, perustettujen $F_2$-viljelmien lukumäärä, jälkeläisiä tuottamattomien $F_2$-viljelmien lukumäärä, kussakin sukusolusyklin vaiheessa letaalimutaation saaneiden kromosomien lukumäärä,

— altistettavien ryhmien koon määrittelyssä käytetyt perusteet,

— koeolosuhteet: altistus- ja näytteenotto-ohjelman yksityiskohtainen kuvaus, altistustasot, tiedot myrkyllisyydestä, negatiiviset (liuotinkontrollit) ja mahdolliset positiiviset kontrollit,

— käytetyt letaalimutaation kriteerit,

— altistus/vaste -suhde, jos mahdollista,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

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. C3H10T½, 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*

Solut

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.

Kasvatusalusta

Kasvatusalustojen ja koeolosuhteiden on sovelluttava käytettävälle transformaatiotestille.

Tutkittava aine

Tutkittavat aineet voidaan sekoittaa kasvatusalustaan tai liuotettava tai sekoitettava 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.

*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.

DOMINOIVA LETAALITESTI JYRSIJÖILLÄ

## 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

Dominoivat letaalivaikutukset aiheuttavat alkio- tai sikiökuolemia. Kun kemialliselle aineelle altistus aiheuttaa dominoivia letaalivaikutuksia, on syytä olettaa että aineella on testattavan lajin sukusoluihin kohdistuvia vaikutuksia. Dominoivia letaalivaikutuksia pidetään yleisesti kromosomivaurioista (rakenteellisista ja numeerisista poikkeamista) johtuvina. Sikiökuolemat voivat myös johtua toksisista vaikutuksista, mikäli naaraat on altistettu.

Tässä testissä altistetaan tavallisesti urokset testattavalle yhdisteelle ja pariutetaan altistamattomien ennen pariutumattomien naaraiden kanssa. Sukusolujen eri asteita voidaan tutkia erikseen jaksottamalla pariuttamisvälit. Kuolleiden munasolujen lisääntyminen testiryhmän naarasta kohden verrattuna kontrolliryhmän naaraisiin, osoittaa munasolun kohdun seinämään kiinnittymisen jälkeen tapahtuneet menetykset. Ennen sitä tapahtuneet menetykset voidaan arvioida laskemalla munasarjojen keltarauhaset tai vertaamalla kiinnittyneiden munasolujen kokonaismäärää naarasta kohden testiryhmässä ja kontrolliryhmässä. Dominoiva kokonaisletaalivaikutus on ennen ja jälkeen kiinnittymisen kuolleitten munasolujen yhteismäärä. Se lasketaan vertaamalla elävien kohdun seinämään kiinnittyneiden munasolujen määrää testiryhmän naarasta kohden vastaavasti kontrolliryhmän naarasta kohden. Tietyin väliajoin tapahtuva määrän väheneminen voi johtua solujen (spermatosyyttien ja spermatogonioiden) kuolemasta.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Jos mahdollista, testattavat aineet olisi liuotettava tai seostettava isotoniseen suolaliuokseen. Veteen liukenemattomat kemikaalit liuotetaan sopivia liuottimia käyttäen. Liuottimella ei saa olla testattavaan kemikaaliin kohdistuvia vaikutuksia eikä myrkkyvaikutuksia. Käyttöliuoksen on oltava vastavalmistettua.

*Koe-olosuhteet*

Antotapa

Testattava yhdiste annetaan tavallisesti yhtenä annoksena. Toistuvaa annostelua voidaan käyttää, jos aineen tiedossa olevat myrkkyvaikutukset edellyttävät sitä. Tavanomaiset antotavat ovat suun kautta ruokintaletkulla ja vatsaontelonsisäinen ruiske. Muitakin antotapoja voidaan käyttää.

Koe-eläimet

Rotta tai hiiri on suositeltavin eläinlaji. Terveet, täysin sukukypsät eläimet jaetaan satunnaisesti tutkimus- ja kontrolliryhmiin.

Lukumäärä ja sukupuoli

Altistettujen urosten lukumäärästä päätettäessä on otettava huomioon määritettävänä olevan biologisen ominaisuuden spontaani vaihtelu. Lukumäärän on perustuttava ennalta määritettyyn toteamisherkkyyteen ja merkitsevyyteen. Tyypillisessä testissä on uroksia kussakin annosryhmässä oltava niin monta, että 30-50 naarasta tulee kantavaksi kunkin pariutumisajan kuluessa.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Kuhunkin testiin on yleensä liitettävä positiivinen ja negatiivinen (liuotin) kontrolli. Jos kokeen suorittavassa laboratoriossa on käytettävissä äskettäin tehtyjen kokeiden positiivisia kontrollituloksia, näitä voidaan käyttää meneillään olevan testin positiivisen kontrollin asemesta. Positiivia kontrolliaineita on käytettävä alhaisina annoksina (esimerkiksi MMS:ää vatsaontelon sisäisesti 10 mg/kg) osoittamaan testiherkkyyttä.

Annostasot

Tavallisesti käytetään kolmea annostasoa. Korkeimman annoksen olisi aiheutettava altistetuissa koeeläimissä myrkkyoireita tai lisääntymiskyvyn alenemista. Eräissä tapauksissa pelkästään korkein kerta-annos saattaa olla riittävä.

Raja-annostesti

Myrkyttömiä aineita käytetään 5 g/kg, kun annoskertoja on yksi tai 1 g/kg/päivä kun annostelu on toistuvaa.

*Testin suorittaminen*

Altistustapoja on useita. Testattavan aineen antaminen kerta-annoksena on yleisimmin käytetty tapa. Muitakin tapoja voidaan käyttää.

Yksittäiset urokset pariutetaan peräkkäin yhden tai kahden altistamattoman ja astuttamattoman naaraan kanssa määräajoin altistuksen jälkeen. Naaraita on pidettävä uroksen luona vähintään yhden estrussyklin ajan tai kunnes pariutumisen on todettu tapahtuneen emättimessä esiintyvän sperman tai emätintulpan perusteella.

Altistustapa määrää altistamisen jälkeen tapahtuvien pariutumisten määrän. Pariutumisia olisi oltava niin monta, että kaikista sukusoluasteista saadaan näytteet altistuksen jälkeen.

Naaraat lopetetaan tiineyden puolenvälin jälkeen ja kohdusta lasketaan kuolleet ja elävät sikiöt. Munasarjoista voidaan laskea keltarauhasten määrä.

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenee urosten ja kantavien naaraiden sekä hedelmöittymättömien naaraiden lukumäärä. Jokaisen pariutumisen tulos esitetään kunkin yksittäisen uroksen ja naaraan osalta. Naaraiden osalta kirjataan pariutumisviikko, uroksen saama annostaso, elävien ja kuolleiden alkioiden luku.

Dominoivaa kokonaisletaalivaikutusta määritettäessä testiryhmän ja kontrolliryhmän kunkin naaraan elävien alkioiden määrää vertaillaan keskenään. Testiryhmän kuolleiden alkioiden suhde eläviin verrattuna kontrolliryhmän vastaavaan suhteeseen analysoidaan munasolun kohdun seinämään kiinnittymisen jälkeen tapahtuneiden menetysten määrittämiseksi.

Jos aineisto on käsitelty siten, että tuloksina ilmoitetaan varhaiset ja myöhäiset kuolemat, tämä on ilmoitettava taulukoissa selvästi. Jos menetykset ennen kohdun seinämään kiinnittymistä on arvioitu, tämä on ilmoitettava. Ennen kiinnittymistä tapahtuneet menetykset voidaan määrittää keltarauhasten ja munasolujen määrän välisenä erona tai kiinnittymisten määränä kohtua kohden kontrolliryhmän pariutumistuloksiin verrattuna.

Tulosten merkitsevyys arvioidaan soveltuvin tilastollisin menetelmin.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— koe-eläinten laji, kanta, ikä ja paino, eläinten lukumäärä sukupuolta kohden koe-ja kontrolliryhmissä,

— testattava aine, liuotin, käytetyt annostasot ja annostasojen valintaperusteet, negatiiviset ja positiiviset kontrollit, tiedot myrkyllisyydestä,

— altistustie ja annostelutapa,

— pariutumisaikataulu,

— pariutumisen toteamistapa,

— eläinten lopettamisaika,

— dominoivien letaalitekijöiden määritysperusteet,

— annos/vastesuhde, jos sovellettavissa,

— tilastollinen arviointi,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

NISÄKKÄIDEN SUKUSOLUJEN SYTOGENETIIKKA *IN VIVO*

## 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

Tämä *in vivo* -sytogeneettisuustesti määrittää spermatogonioiden rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet. Testi käsittää spermatogonioiden mitoosin kromatidi- ja kromosomiaberraatioanalyysin.

Testissä tutkitaan testattavalle aineelle altistettujen ja määräajoin lopetettujen nisäkkäiden kiveksistä tehtyjä preparaatteja. Eläimille annetaan ennen lopetusta jotakin tumasukkulan muodostumisen inhibiittoria, esimerkiksi kolkisiinia, solujen pysäyttämiseksi mitoosin metafaasivaiheeseen (c-metafaasiin). Kromosomeista tehdään ilmakuivatut preparaatit, jotka värjätään ja analysoidaan mikroskooppisesti.

Spermatogoniokantasolujen käsittelyn jälkeen suoritettu spermatosyyttien diakineesimetafaasi I:n translokaatiomultivalenttianalyysi saattaa antaa hyödyllisiä lisätietoja.

### 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

### 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Testattavat kemikaalit liuotetaan isotoniseen suolaliuokseen. Jos ne ovat liukenemattomia, ne liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin. Testattavia yhdisteitä käytetään vastavalmistettuina liuoksina. Jos käytetään liuotinta helpottamaan annostelua, sillä ei saa olla testattavaan yhdisteeseen kohdistuvia vaikutuksia eikä myrkkyvaikutuksia.

Antotapa

Testattavat yhdisteet on yleensä annettava yhtenä annoksena. Toistuvaa annostelua voidaan käyttää, mikäli aineen tiedossa olevat myrkkyvaikutukset edellyttävät sitä. Toistuvaa annostusta voidaan käyttää ainoastaan, mikäli testattava yhdiste ei aiheuta huomattavia sytotoksisia spermatogonioiden erilaistumisvaikutuksia.

Tavanomaiset antotavat ovat annostelu suun kautta ja vatsaontelonsisäinen ruiske. Muitakin antotapoja voidaan käyttää.

Koe-eläimet

Yleensä käytetään hiiriä ja kiinanhamstereita. Muitakin nisäkäslajeja voidaan käyttää.

Testissä käytetään sukukypsiä uroksia, jotka jaetaan satunnaisesti tutkimus- ja kontrolliryhmiin.

Eläinten lukumäärä

Kutakin koe- ja kontrolliryhmää varten tarvitaan vähintään viisi urosta.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Kuhunkin testiin on yleensä liitettävä positiivinen ja negatiivinen (liuotin) kontrolli.

Positiivisia kontrolliaineita on käytettävä kyllin alhaisena annoksena (esimerkiksi mitomysiini C:tä vatsaontelon sisäisesti 0,3 mg/kg) osoittamaan testiherkkyyttä.

Annostasot

Testattavaa yhdistettä annetaan kerta-annoksena, joka on joko suurin siedetty annos tai joka aiheuttaa joitakin sytomyrkyllisyysoireita. Jos tämä annos aiheuttaa runsaasti solukuolemia, sen ohella on käytettävä pienempää annosta sytotoksisuuden osoittamiseksi. Jos annos/vastesuhteen määritys on tarpeen, tarvitaan vähintään kolme annostasoa (esimerkiksi heikon positiivisen vasteen varmistamiseksi). Myrkyttömiä kemikaaleja testattaessa on käytettävä mahdollisimman suurta kerta- tai toistuvaa annosta.

*Testin suorittaminen*

Eläimet altistetaan testattavalle yhdisteelle yleensä vain kerran. Korkeimman annoksen ryhmässä käytetään kolmea altistuksen jälkeistä näytteenottoaikaa. Keskimmäinen näytteenottoaika on 24 tuntia. Koska testattava yhdiste saattaa vaikuttaa solusyklin kinetiikkaan, käytetään yhtä aikaisempaa ja yhtä myöhempää 6-48 tunnin aikavälillä olevaa näytteenottoaikaa. Muiden annosryhmien näytteet on otettava erityisen herkkänä ajankohtana tai, kun se ei ole tiedossa, 24 tunnin kuluttua altistuksesta.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää toistuvaa annostelua, jolloin eläimet on lopetettava 24 tunnin kuluttua viimeisen annoksen antamisesta. Lisänäytteitä voidaan ottaa 6-24 tunnin aikavälillä.

Kivespreparaatti

Spermatogoniomitoosianalyysiä varten eläimille annetaan jotakin tumasukkulan muodostumisen inhibiittoria, esimerkiksi kolkisiinia, vatsaontelonsisäisenä ruiskeena. Sopivan ajan kuluttua eläimet lopetetaan. Hiirellä tämä aika vaihtelee kolmesta viiteen tuntiin, kiinanhamsterilla se voi olla yli viisi tuntia.

Preparaatit valmistetaan ilmakuivatusmenetelmällä. Lajista riippuen normaalimenetelmää voidaan joutua muuntelemaan. Solunäytteet käsitellään hypotonisella liuoksella ja fiksoidaan. Solut levitetään objektilaseille ja värjätään. Lasit koodataan ennen mikroskooppitutkimusta.

Analyysi

Rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet tutkitaan vähintään 100:sta hyvin levinneestä, täysimääräiset sentromeerit sisältävästä mitoosimetafaasista. Mahdollisten sytotoksisten vaikutusten selvittämiseksi voidaan lisäksi määrittää spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin näytteestä, jossa on 100 jakautuvaa solua eläintä kohden.

## 2 TULOKSET

Tulokset esitetään taulukkomuodossa. Kunkin kontrolli- ja koe-eläimen osalta esitetään erikseen kaikki poikkeamatyypit. Analysoitujen solujen ja poikkeavien solujen kokonaismäärät ilmoitetaan kutakin ryhmää kohden. Kaikista parametreistä annetaan keskiarvo ja keskipoikkeama. Mikäli spermatogonioiden mitoosien suhteen keskiarvo ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin on määritetty, se esitetään taulukkomuodossa kunkin koe- ja kontrolliryhmän osalta.

Tulosten merkitsevyys arvioidaan soveltuvin tilastollisin menetelmin.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— kokeessa käytettyjen urosten laji, kanta, ikä ja paino,

— eläinten lukumäärä koe- ja kontrolliryhmissä,

— koeolosuhteet, tarkka selostus altistustavasta, annostasot, käytetty tumasukkulan muodostumisen inhibiittori,

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohden kussakin ryhmässä,

— kunkin koe- ja kontrollieläimen osalta poikkeamien tyyppi ja lukumäärä,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

HIIREN SPOT-TESTI

# 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

Tässä hiirellä tehdyssä *in vivo* -testissä kehittyvät sikiöt altistetaan kemikaaleille. Kehittyvien sikiöiden kohdesolut ovat melanoblasteja ja kohdegeenit niitä, jotka säätelevät karvapeitteen karvojen pigmentaatiota. Kehittyvät sikiöt ovat heterotsygootteja useiden karvapeitteen värigeenien osalta. Melanoblastin tällaisen geenin dominoivan alleelin mutaatio tai (jonkin geneettisen tapahtuman aiheuttama) poistuma aiheuttaa resessiivisen fenotyypin ilmenemisen siitä syntyvissä soluissa, ja se näkyy värimuutostäplänä kehityksen lopputuloksena olevan hiiren turkissa. Täplikkäiden poikasten määrä ja mutaatioiden yleisyys kirjataan ja sitä verrataan ainoastaan liuottimelle sikiöasteella altistettuihin poikasiin. Hiiren spot-testillä voidaan määrittää sikiösolujen oletetut somaattiset mutaatiot.

## 1.5 Laatukriteerit

Ei ole.

## 1.6 Testin kuvaus

*Testin valmistelu*

Jos mahdollista, testattavat kemikaalit liuotetaan isotoniseen suolaliuokseen. Veteen liukenemattomat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin. Liuottimella ei saa olla testattavaan yhdisteeseen kohdistuvia vaikutuksia eikä myrkkyvaikutuksia. Testattavia yhdisteitä on käytettävä vastavalmistettuina liuoksina.

Koe-eläimet

T-kantaa olevat hiiret (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) pariutetaan joko HT-kantaa (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) tai C57 BL-kantaa (nonagouti, a/a) olevien hiirten kanssa. Muitakin sopivia risteytyksiä, esimerkiksi NMRI-kantaa (nonagouti, a/a; albino, c/c) ja DBA-kantaa (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), voidaan käyttää edellyttäen, että ne tuottavat nonagoutijälkeläisiä.

Lukumäärä ja sukupuoli

Riittävä määrä tiineitä naaraita altistetaan siten, että kutakin annostasoa kohden saadaan tarpeellinen määrä elossa olevia poikasia. Määrä riippuu altistetuissa hiirissä havaittujen täplien lukumäärästä ja kontrollitulosten kattavuudesta. Negatiivinen tulos voidaan hyväksyä ainoastaan, kun korkeimmalla annoksella käsiteltyjen naaraiden poikasia on tutkittu vähintään 300.

Negatiivisten ja positiivisten kontrollien käyttö

Tulokset kontrollitesteistä, joissa hiirille on annettu ainoastaan liuotinta (negatiivinen kontrolli) on oltava käytettävissä. Samasta laboratoriosta peräisin olevat aikaisempien kontrollitutkimusten tulokset voidaan yhdistää testin herkkyyden lisäämiseksi edellyttäen, että ne ovat yhtenäiset. Kokeen

suorittavassa laboratoriossa olisi oltava käytettävissä positiivisia kontrollituloksia sellaisella kemikaalilla tehdyistä kokeista, jonka tiedetään tässä testissä osoittavan mutageenisuutta, ellei nyt testattavana oleva kemikaali osoittaudu mutageeniseksi.

Antotapa

Ainetta annetaan tiineille naaraille tavallisesti suun kautta ruokintaletkulla tai vatsaontelonsisäisenä ruiskeena. Altistus voidaan tarvittaessa tehdä hengitysteiden kautta ja muitakin antotapoja voidaan käyttää.

Annostasot

Testissä käytetään vähintään kahta annostasoa, joista toinen aiheuttaa myrkkyoireita tai pienentää poikueen kokoa. Myrkyttömiä kemikaaleja testattaessa on käytettävä mahdollisimman suurta annosta.

*Testin suorittaminen*

Kerta-annos annetaan yleensä raskauden 8., 9. tai 10. päivänä. Raskauden 1. päivä on emätintulpan havaitsemispäivä. Nämä päivät vastaavat 7,25, 8,25 ja 9,25 päivää hedelmöityksestä. Näiden päivien aikana voidaan antaa toistuvia annoksia.

Analyysi

Poikaset koodataan ja niiden täplikkyys tutkitaan 3-4 viikon ikäisinä. Täplät eritellään kolmeen ryhmään:

a) valkeat täplät 5 mm:n alueella vatsan keskiviivasta, joiden oletetaan aiheutuvan solukuolemista (WMVS);

b) keltaiset, agouti-tyyppiset täplät nisien ja sukupuolielinten yhteydessä, kaulassa, kainaloiden ja nivusten alueella ja otsan keskiosassa, joiden oletetaan aiheutuvan erilaistumisvirheistä (misdifferentiation, MDS); sekä

c) pigmentoidut ja valkeat sattumanvaraisesti karvapeitteessä esiintyvät täplät, joiden oletetaan aiheutuvan somaattisista mutaatioista (RS).

Kaikki kolme ryhmää kirjataan, mutta ainoastaan viimeinen, RS, on geneettisesti merkitsevä. MDS- ja RS-täplät voidaan erottaa toisistaan tutkimalla näytekarvat fluoresoivalla mikroskoopilla.

Poikasten selvästi näkyvät morfologiset poikkeamat on kirjattava.

## 2 TULOKSET

Tuloksina ilmoitetaan tutkittujen poikasten kokonaismäärä sekä niiden poikasten määrä, joissa esiintyy yksi tai useampia oletetusta somaattisesta mutaatiosta johtuvia täpliä. Altistus- ja kontrollitulosten vertailu suoritetaan jollakin soveltuvalla menetelmällä. Tulokset esitetään myös poikuekohtaisesti.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— risteytyksessä käytetyt kannat,

— tiineiden naaraiden lukumäärä koe- ja kontrolliryhmissä,

— poikueiden keskikoko koe- ja kontrolliryhmissä syntymähetkellä ja vierotuksen tapahtuessa,

— testattavan kemikaalin annostaso(t),

— käytetty liuotin,

— tiineyspäivä, jolloin annos annettiin,

— annostelutapa,

— poikasten kokonaismäärä sekä koe- ja kontrolliryhmissä esiintyneiden WMVS-, MDS- ja RS-ryhmän täplikkäiden poikasten lukumäärä,

— näkyvät morfologiset poikkeamat,

— RS-ryhmän osalta annos/vastesuhde, jos mahdollista,

— tulosten tilastollinen käsittely,

— tulosten pohdinta,

— tulosten tulkinta.

3.2 **Arviointi ja tulkinta**

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

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.

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/vaste -suhteen 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 vierotetaan ja naaraspuoliset lopetetaan, elleivät ne kuulu tutkimuksen piiriin.

Translokaation heterotsygoottisuustesti

Jompaa kumpaa 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.

*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-autosomitranslokaatiot 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 vierotusajankohtana ilmoitetaan jokaista pariutumisjaksoa kohden.

$F_1$-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 rakennemuutostyyppien 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.

### 3.2 Arviointi ja tulkinta

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## 4 LÄHDELUETTELO

Ks. Yleisjohdanto, osa B.

## OSA C: YMPÄRISTÖMYRKYLLISYYDEN MÄÄRITYSMENETELMÄT

### YLEISJOHDANTO: OSA C

Jäljempänä selostettujen testausmenetelmien tarkoituksena on direktiivin 79/831/EEC liitteessä VIII lueteltujen ympäristömyrkyllisten ominaisuuksien määrittäminen. Ilmoituksen tekijöiden on hyvä tietää, ettei seuraavien liitteessä VIII olevalla 1. tasolla määrättyjen ominaisuuksien määritysmenetelmiä ei selosteta tekstissä:

— pidennetty myrkyllisyystutkimus *Daphnia magnalla*,

— testi kehittyneemmällä kasvilla,

— pidennetty myrkyllisyystutkimus kaloilla,

— laji kohtainen kertyvyystesti.

Kun näiden ominaisuuksien määrittämiseksi tarvittavat testausmenetelmät valmistuvat, ne julkaistaan uutena mukautuksena tekniikan kehitykseen. Ennen niiden julkaisemista ilmoituksen tekijöiden on käytettävä soveltuvia, kansainvälisesti tunnettuja menetelmiä, jotka on annettava asianomaisille viranomaisille tiedoksi.

# LEVÄN INHIBITIOTESTI

## 1 MENETELMÄ

### 1.1 Johdanto

Tämän testin tarkoituksena on tutkia tietyn aineen vaikutusta yksisoluisen viherlevälajin kasvuun. Suhteellisen lyhytaikaisilla testeillä voidaan määrittää useisiin sukupolviin kohdistuvat vaikutukset. Tätä menetelmää voidaan soveltaa useiden yksisoluisten levälajien tutkimiseen, jolloin tutkimusselostukseen on liittävä kuvaus testausmenetelmästä.

Tämä menetelmä soveltuu parhaiten koeolosuhteissa todennäköisesti veteen jäävien vesiliukoisten aineiden tutkimiseen.

Väliaineeseen rajoitetusti liukenevien aineiden kvantitatiivinen $EC_{50}$-määritys (ks. jäljempänä olevat määritelmät) saattaa osoittautua mahdottomaksi.

Menetelmällä voidaan testata aineita, joilla ei ole suoraa vaikutusta levän kasvun määrityksiin.

Seuraavat tiedot helpottavat testin suorittamista:

— vesiliukoisuus,

— höyrynpaine,

— rakennekaava,

— aineen puhtaus,

— kemiallinen stabiilisuus vedessä ja valossa,

— aineen kvantitatiivinen määritysmenetelmä vedessä,

— $pK_a$-arvo,

— n-oktanoli/vesi-jakautumiskerroin,

— aikaisemman biologista hajoamista koskevan testin tulokset.

### 1.2 Määritelmät ja yksiköt

Solutiheys: solujen määrä millilitraa kohden;

Kasvu: solutiheyden lisääntyminen koeajan kuluessa;

Kasvunopeus: solutiheyden lisääntyminen aikayksikön puitteissa;

$EC_{50}$:llä tarkoitetaan tässä testissä testattavan aineen pitoisuutta, joka aiheuttaa 50 % alenemisen joko kasvussa tai kasvunopeudessa suhteessa kontrolliin;

NOEC:lla (no observed effect concentration, suurin vaikutukseton pitoisuustaso): tarkoitetaan tässä testissä korkeinta testipitoisuutta, jolloin mitattu/mitatut parametri(t) eivät osoita merkittävää kasvua estävää vaikutusta suhteessa kontrolliarvoihin.

### 1.3 Vertailuaineet

Vertailuaineella voidaan suorittaa testaus epätyydyttävien koeolosuhteiden toteamiseksi. Vertailuainetta käytettäessä tulokset on liittävä tutkimusselostukseen. Vertailuaineena voidaan käyttää kaliumdikromaattia.

### 1.4 Testin periaate

Eksponentiaalisesti kasvavat viherleväviljelmät altistetaan testattavan aineen eri pitoisuuksille useiden sukupolvien ajan tietyissä olosuhteissa. Kasvun estyminen suhteessa kontrolliviljelmään määritetään tietyltä ajalta.

1.5 **Laatukriteerit**

1.5.1 **Testin kelpoisuusedellytykset**

Kontrolliviljelmien solutiheyden on lisäännyttävä vähintään 16-kertaiseksi kolmen vuorokauden kuluessa.

Testattavan aineen häviäminen vedestä biomassaan ei välttämättä aiheuta testin hylkäämistä.

1.6 **Testin kuvaus**

1.6.1 *Testin valmistelu*

1.6.1.1 Laitteet ja materiaalit

— Tavanomainen laboratoriovarustus,

— Sopivan suuruisia koepulloja (esimerkiksi 250 ml erlenmeyerpullot ovat sopivia, kun testattavan liuoksen määrä on 100 ml),

— Viljelylaitteet: kaappi tai kammio, jossa on 21-25 °C ± 2 °C:n vakiolämpötila ja jatkuva tasainen aallonpituudeltaan 400-700 nm:n valaistus. (Suositeltava kvanttivuo on 0,72 × $10^{20}$ fotonia/$m^2$s ± 20 %. Tämä virta vastaa 120 µE/$m^2$s ja se saadaan aikaan tavallisilla valkeilla loistelampuilla (valon lämpötila noin 4 200 K), jotka tuottavat noin 8 000 luxia (pallomaisella kollektorilla mitattuna).

— Solutiheyden mittauslaite, esimerkiksi elektroninen hiukkaslaskija, laskulaitteella varustettu mikroskooppi, fluorimetri, spektrofotometri, kolorimetri. (*Huom.* Jotta spektrofotometrillä pystyttäisiin mittaamaan alhaisia solutiheyksiä, voi olla tarpeen käyttää kyvettejä, joissa on vähintään 4 cm:n valoaukko).

1.6.1.2 Levän elatusaine

Suositellaan seuraavaa elatusainetta käytettäväksi:

| | | |
|---|---|---|
| $NH_4Cl$: | 15 | mg/l, |
| $MgCl_2.6H_2O$: | 12 | mg/l, |
| $CaCl_2.2H_2O$: | 18 | mg/l, |
| $MgSO_4.7H_2O$: | 15 | mg/l, |
| $KH_2PO_4$: | 1,6 | mg/l, |
| $FeCl_3.6H_2O$: | 0,08 | mg/l, |
| $Na_2EDTA.2H_20$: | 0,1 | mg/l, |
| $H_3BO_3$ | 0,185 | mg/l, |
| $MnCl_2.4H_2O$: | 0,415 | mg/l, |
| $ZnCl_2$ | $3 \times 10^{-3}$ | mg/l, |
| $CoCl_2.6H_2O$: | $1,5 \times 10^{-3}$ | mg/l, |
| $CuCl_2.2H_2O$: | $10^{-5}$ | mg/l, |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$: | $7 \times 10^{-3}$ | mg/l, |
| $NaHCO_3$: | 50 | mg/l, |

Kun tämä elatusaine on tasapainotettu ilman kanssa, sen pH on noin 8.

Edellä esitetty suositus ei sulje pois muiden elatusaineiden käyttöä, jos tärkeiden aineosien osalta noudatetaan seuraavia rajoja:

| | | |
|---|---|---|
| P: | ≤ | 0,7 mg/l, |
| N: | ≤ | 10 mg/l, |
| kelatoivat aineet: | ≤ | $10^{-3}$ mmol/l, |
| kovuus (Ca + Mg): | ≤ | 0,6 mmol/l. |

Suositeltu elatusaine ja liitteessä 1 mainittu elatusaine täyttävät nämä edellytykset.

1.6.1.3 Testissä käytetyt organismit

Lajin valinta:

Viljely- ja koekäyttöön suositellaan nopeakasvuista, helposti viljeltävää viherlevälajia. Seuraavat lajit ovat sopivia:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

— *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,

— *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Jos käytetään muita lajeja, kanta on ilmoitettava.

1.6.1.4 Tutkimussuunnitelma

Solutiheys testin alussa

Käytettäessä *Selenastrum capricornutum* ja *Scenedesmus subspicatus* -lajeja suositeltava viljelmien solutiheys testin alkaessa on noin $10^4$ solua/ml. Muita lajeja käytettäessä biomassan olisi oltava vastaavaa luokkaa.

Testattavan aineen pitoisuus

Vaikutuksia todennäköisesti tuottava pitoisuusväli määritetään raja-annostestien tulosten perusteella. Testissä käytetään vähintään viittä pitoisuutta geometrisessa sarjassa. Alimmalla pitoisuudella ei saisi olla havaittavaa vaikutusta levän kasvuun. Korkeimman pitoisuuden olisi hidastettava kasvua vähintään 50 % suhteessa kontrolliin ja mieluimmin estettävä kasvu kokonaan.

Toistot ja kontrollit

Koe on tehtävä mieluimmin kolmena kappaleena kullakin pitoisuustasolla ja kontrolleja olisi oltava mieluimmin kaksi kertaa tämä määrä. Tutkimussuunnitelmaa voidaan perustelluista syistä muuttaa siten, että pitoisuustasojen määrää lisätään ja toistojen määrää vähennetään.

Kun testattava aine liuotetaan liuotinta käyttäen, tutkimussuunnitelmaan on lisättävä kontrolliviljelmiä, joissa on liuotinta yhtä paljon kuin suurimman pitoisuuden saavassa koeviljelmässä.

1.6.2 *Testin suorittaminen*

Tämä osa sisältää helposti ja huonosti liukenevien aineiden sekä haihtuvien aineiden tutkimusohjeita.

1.6.2.1 Helposti veteen liukenevien aineiden testaus

Testiviljelmät, jotka sisältävät testattavaa ainetta tiettynä pitoisuutena sekä tarvittavan määrän leväinokulaattia, valmistetaan levän elatusainesuodoksesta, testattavan aineen varastoliuoksesta ja leväsuspensiosta.

Viljelmäpulloja ravistellaan ja ne asetetaan viljelylaitteeseen. Testin aikana levä on pidettävä suspensiona ja helpotettava $CO_2$:n siirtymistä esimerkiksi ravistelemalla, sekoittamalla tai ilmastamalla. Viljelmät on pidettävä 21-25 °C ± 2 °C:n lämpötilassa.

Kunkin pullon solutiheys määritetään vähintään 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua kokeen alkamisesta. Levän elatusainesuodosta käytetään taustamääritykseen hiukkaslaskureita käytettäessä ja nollakokeena spektrofotometriä käytettäessä.

pH määritetään testin alkaessa ja 72 tunnin kuluttua.

Liuoksien pH-arvo saa normaalisti vaihdella korkeintaan yhden yksikön verran testin aikana.

1.6.2.2 Huonosti veteen liukenevien aineiden testaus

Kun testattavan aineen vesiliukoisuus on kokeessa käytettävän suurimman pitoisuuden luokkaa, koeliuosten valmistus poikkeaa vain vähän edellä esitetystä menettelytavasta. Kedellästetty liuos voi toimia testattavan aineen varastoliuoksena. Vaihtoehtoisesti voidaan määrätyn pitoinen testattava aine liuottaa levän elatusaineeseen ennen leväsuspension lisäämistä.

Varastoliuokset voidaan valmistaa dispergoimalla huonosti veteen liukenevat aineet mekaanisesti tai käyttämällä liuottimia, joilla on alhainen myrkkyvaikutus levään, kuten orgaanisia liuottimia, emulgoivia tai dispergoivia aineita. Liuottimen pitoisuus saa olla korkeintaan 100 ml/l ja tutkimussuunnitelmaan on lisättävä kontrolliviljelmiä, joissa on liuotinta yhtä paljon kuin suurimman pitoisuuden saavassa koeviljelmässä.

1.6.2.3 Haihtuvien aineiden testaus

Tällä hetkellä ei ole olemassa yleisesti hyväksyttyä haihtuvien aineiden testausmenetelmää. Kun aineella on taipumus höyrystyä, voidaan käyttää suljettuja pulloja, joissa on runsaasti ilmatilaa. Tälle menetelmälle on vaihtoehtoja (ks. lähdeluettelon 1 kohta).

Liuokseen jäävän aineen määrä on pyrittävä määrittämään ja suljetussa systeemissä testatuista haihtuvista kemikaaleista saatuja tuloksia on tulkittava suurin varauksin.

## 2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Koe- ja kontrolliviljelmistä määritetyt solutiheydet, testattavan aineen pitoisuudet sekä määritysajat ilmoitetaan taulukkomuodossa. Kunkin testattavan pitoisuuden ja kontrolliviljelmien solutiheyden keskiarvo esitetään suhteessa aikaan, jotta saadaan kasvukäyrät.

Seuraavaa kahta tapaa tulisi käyttää pitoisuus/vaikutus- suhteen määrittämiseksi.

2.1 **Kasvukäyrien kattamien pinta-alojen vertailu**

Kasvukäyrien kattamat pinta-alat voidaan laskea seuraavan kaavan mukaisesti:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

jossa

A = pinta-ala,
$N_0$ = nimellinen solumäärä/ml ajan hetkellä $t_0$,
$N_1$ = määritetty solumäärä/ml ajan hetkellä $t_1$,
$N_n$ = määritetty solumäärä/ml ajassa $t_n$,
$t_1$ = ensimmäinen määritysajankohta kokeen alkamisen jälkeen,
$t_n$ = n:s määritysajankohta kokeen alkamisen jälkeen.

Kunkin ainepitoisuuden aiheuttama kasvun hidastumisprosentti ($I_A$) lasketaan vertailukasvukäyrän ($A_c$) pinta-alan ja kunkin ainepitoisuuden ($A_t$) kasvukäyrän pinta-alan erona seuraavasti:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

$I_A$-arvot ja vastaava pitoisuudet merkitään puolilogaritmipaperille tai puolilogaritmiprobitti-paperille. Probittipaperia käytettäessä, pisteet yhdistetään silmämääräisesti suoraksi viivaksi, ja kun arvojen jakautuman oletetaan olevan log-normaalinen, laskettu regressioviiva voidaan piirtää.

$EC_{50}$-arvo saadaan kohdasta, jossa (regressio) viiva leikkaa abskissan kanssa yhdensuuntaisen viivan kohdassa $I_A$ = 50 %. Jotta tämä arvo tulisi yksiselitteisesti ilmoitetuksi tämän laskentamenetelmän puitteissa, symbolia $E_bC_{50}$ ehdotetaan käytettäväksi. Suhteessa tähän menetelmään, jossa määritykset määrätään tehtäväksi 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua, symboliksi tulee $E_bC_{50}$ (0-72 h).

Muitakin EC-arvoja, kuten $E_bC_{10}$, saadaan $I_A$ vastaan log-pitoisuus -käyrältä.

2.2 **Kasvunopeuden vertailu**

Nopeakasvuisten viljelmien keskimääräinen ominaiskasvunopeus (μ) voidaan laskea seuraavasti

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Vaihtoehtoisesti keskimääräinen ominaiskasvunopeus voidaan johtaa lnN vastaan aika -käyrän regressioviivan kaltevuudesta.

Keskimääräisen ominaiskasvunopeuden prosentuaalisesta vähenemisestä kutakin testattavan aineen pitoisuutta kohden, verrattuna kontrolliviljelmän keskiarvoon, piirretään käyrä suhteessa pitoisuuden logaritmiin. Tuloksena olevasta käyrästä saadaan niiden $EC_{50}$-arvot. Jotta tämä arvo tulisi yksiselitteisesti ilmoitetuksi tästä menetelmästä johdetuksi, symbolia $E_rC_{50}$ ehdotetaan käytettäväksi. Määritysajankohdat on esitettävä; jos arvo on määritetty esimerkiksi 24 ja 48 tunnin kuluttua, symboliksi tulee $E_rC_{50}$ (24-48 h).

*Huom.* Ominaiskasvunopeus on logaritminen termi, ja kasvunopeuden pienet muutokset voivat johtaa suuriin biomassan muutoksiin. $E_bC$- ja $E_rC$-arvot eivät sen vuoksi ole numeerisesti vertailtavia.

## 3 RAPORTOINTI

3.1 **Tutkimusselostus**

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä:

— testattava aine: kemialliset tunnusmerkit,

— testattavat organismit: alkuperä, laboratorioviljely, kannan numero, viljelymenetelmä,

— koeolosuhteet:

  — testin aloitus- ja lopetuspäivä sekä kestoaika,

  — lämpötila,

  — elatusaineen koostumus,

— viljelylaitteet,

— liuosten pH-arvot kokeen alussa ja lopussa (jos pH-arvon yhden yksikön ylittäviä vaihteluita todetaan, tästä olisi annettava selitys),

— liuotin ja testattavan aineen liuotusmenetelmä sekä liuottimen pitoisuus koeliuoksissa,

— valon teho ja laatu,

— testatut pitoisuudet (määritetyt tai nimelliset).

— tulokset:

— kunkin koepullon solutiheys kunakin määritysaikana sekä tiheyden määritysmenetelmä,

— solutiheyksien keskiarvot,

— kasvukäyrät,

— pitoisuus/vaikutussuhdekäyrä,

— EC-arvot ja niiden laskutapa,

— NOEC,

— muut havaitut vaikutukset.

## 4 LÄHDELUETTELO

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 201*, Decision of the Council C(81) 30 Final.

2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, *Verfahrensvorschlag 'Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge* Scenedesmus subspicatus', in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Lisäys*

## ESIMERKKI LEVÄN VILJELYMENETELMÄSTÄ

### Yleistä

Seuraavalla menetelmällä suoritetun viljelyn tarkoituksena on tuottaa leväviljelmiä myrkyllisyystutkimuksia varten.

Sopivia menetelmiä käyttäen on varmistuttava siitä, että leväviljelmät eivät ole saaneet bakteeritartuntaa (ISO 4833). Toivottavaa on, että viljelmissä ei ole pieneliöitä, mutta ehdoton edellytys on, että viljelmissä on ainoastaan yhtä levälajia.

Kaikki toimenpiteet on suoritettava steriileissä olosuhteissa, jotta viljelmiin ei joudu bakteereja tai muita leviä.

### Laitteet ja materiaalit

Ks. 1.6.1 kohta: Testin valmistelu ja testissä käytetyt organismit.

### Levien viljelymenetelmät

*Ravintoliuosten (elatusaineen) valmistus*

Kaikista elatusaineen ravintosuoloista tehdään varastoliuoskonsentraatit, joita säilytetään pimeässä ja kylmässä. Nämä liuokset steriloidaan suodattamalla tai autoklaavissa.

Elatusaine valmistetaan lisäämällä tarvittava määrä kutakin varastoliuosta steriiliin tislattuun veteen. On varottava infektioiden syntymistä. Kiinteään elatusaineeseen lisätään 0,8 % agaria.

*Varastoviljelmät*

Varastoviljelmät ovat pieniä säännöllisesti uuteen elatusaineeseen siirrettäviä leväviljelmiä, joilla testi aloitetaan. Ellei näitä viljelmiä käytetä säännöllisesti, ne sivellään agarputkien pintaan ja siirretään uuteen elatusaineeseen vähintään kerran kahdessa kuukaudessa.

Varastoviljelmiä kasvatetaan asianmukaista elatusainetta sisältävissä erlenmeyerpulloissa (tilavuus noin 100 ml). Mikäli levää inkuboidaan 20 °C:n lämpötilassa jatkuvassa valossa, viljelmät on siirrettävä viikottain.

Levää siirrettäessä osa "vanhaa" viljelmää siirretään steriileillä pipeteillä tuoretta elatusainetta sisältävään pulloon, siten että nopeakasvuisen lajin ollessa kyseessä alkupitoisuus on noin 100 kertaa vanhan viljelmän solutiheyttä pienempi.

Levälajin kasvunopeus voidaan määrittää kasvukäyrästä. Jos tämä on tiedossa, on mahdollista arvioida miten paljon levää on siirrettävä uuteen elatusaineeseen. Tämä on tehtävä ennenkuin viljelmän kuolinvaihe alkaa.

*Esiviljelmä*

Esiviljelmästä saadaan koeviljelmiin sopivaa leväinokulaattia. Esiviljelyolosuhteet ovat samat kuin koeolosuhteet ja esiviljelmä käytetään sen ollessa täydessä kasvuvauhdissa, yleensä kolmen päivän inkubointiajan jälkeen. Jos leväviljelmissä esiintyy epämuodostuneita tai epänormaaleja soluja, viljelmät on heitettävä pois.

# 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 klooriasetamidia.

### 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 substraattin 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),

— 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 Koeastiat

Noin litran vetoisiin lasiastioihin (jotka peitetään muovikannella, lautasella tai rei'itetedellä 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*

Testissä käytettävät pitoisuudet

Testattavan aineen pitoisuudet ilmoitetaan aineen painona suhteessa perussubstraatin kuivapainoon (mg/kg).

Raja-annostesti

Raja-annostestillä voidaan määrittää pitoisuusrajat, jotka aiheuttavat 0 - 100 % kuolleisuuden. Näiden rajojen perusteella määrätään varsinaisessa testissä käytettävät pitoisuudet.

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 altistamattoman 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 käytettävään 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 heksaaniin, 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.

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 edelläolevien 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),

— $LC_{50}$-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/vaste -käyrä,

— 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 ss.

3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 ss.

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 Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden' in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*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 kalsium-karbonaatilla) ja sen ionijohtavuuden alhainen (alle 6 mmhos tai 0,5 % suolapitoisuus).<br>Substraatin on oltava kosteaa, mutta ei märkää.<br>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.

# 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 käytetedellä 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.

### 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),

$C_{BA}$ = 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 vesiliuoksta 1-4 litran vetoiseen, sekoittajalla ja ilmastajalla varustettuun lasiastiaan. Seosta sekoitetaan ja ilmastetaan 20-25 °C 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).

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/l, 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.

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. Vastaava 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.

Haihtunut nestemäärä korvataan ennen kutakin näytteenottoa lisäämällä tarvittava määrä ionisoimatonta tai tislattua vettä. Suositeltavaa on merkitä nesteen taso astian kylkeen ennen testin aloittamisesta. Uusi merkintä tehdään kunkin näytteenotton 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.

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.

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.

*Lisäys*

ARVIOINTIESIMERKKI

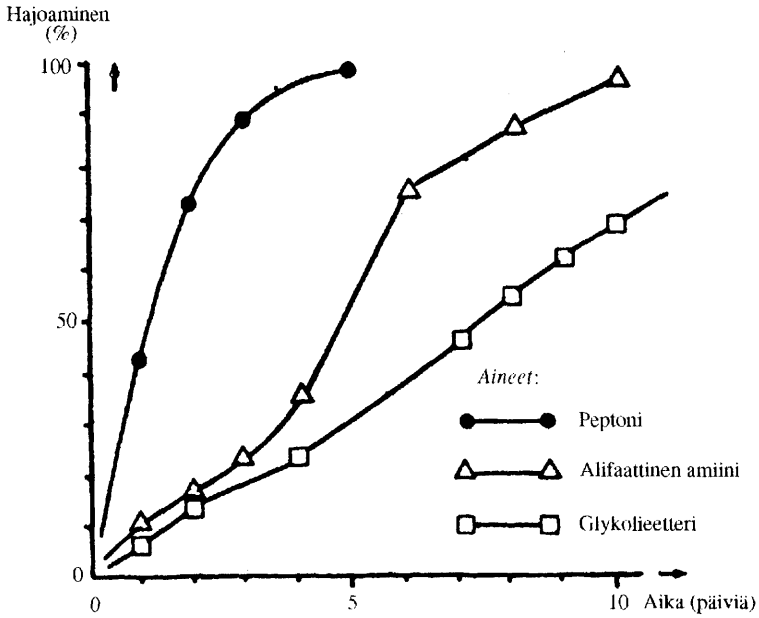
| | |
|---|---|
| **Orgaaninen yhdiste:** | 4-Etoksibentsoehappo |
| Teoreettinen testipitoisuus: | 600 mg/l |
| Teoreettinen DOC: | 390 mg/l |
| **Inokulaatti:** | Jätteenpuhdistuslaitoksen nimi |
| Pitoisuus: | 1 gramma kuivamateriaalia/litra |
| Adaptaatioaste: | ei adaptoitunut |
| **Analyysi:** | DOC-määritys |
| **Näytteen koko:** | 3 ml |
| **Kontrolliaine:** | Dietyleeniglykoli |
| **Yhdisteen myrkyllisyys:** | Ei myrkyllisiä vaikutuksia alle 1 000 mg/l<br>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.

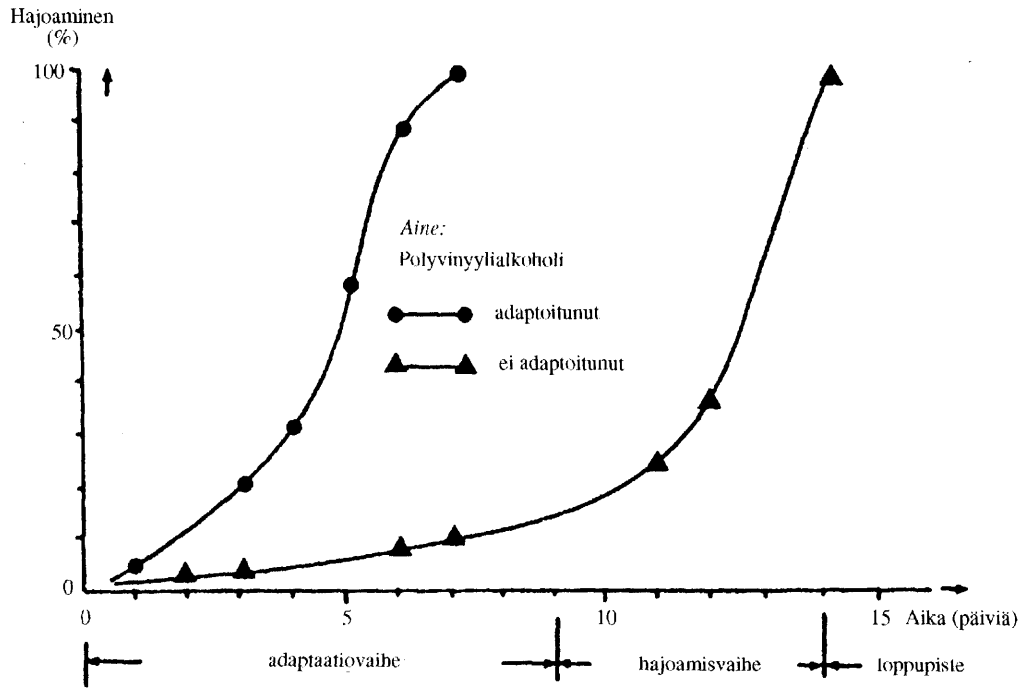
*Kuva 1*

**Esimerkkejä biologisista hajoamiskäyrist**




*Kuva 2*

**Esimerkkejä lietteen adaptaatiosta**



# BIOLOGINEN HAJOAMINEN

## AKTIIVILIETTEEN SIMULOINTITESTIT

## 1 MENETELMÄ

### 1.1 Johdanto

#### 1.1.1 *Yleishuomautukset*

Tällä menetelmällä voidaan tutkia vain sellaisia orgaanisia aineita, jotka testissä käytetyn pitoisuuden osalta täyttävät seuraavat edellytykset:

— ne ovat siinä määrin vesiliukoisia, että kokeessa käytetty liuos voidaan valmistaa,

— niiden höyrynpaine on mitätön koeolosuhteissa,

— ne eivät estä bakteeritoimintaa.

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.

#### 1.1.2 *Lopullisen hajoamisen määrittäminen (DOC/COD-analyysi)*

Menetelmän tarkoituksena on määrittää lopullinen hajoaminen mittaamalla aineen ja mahdollisten metaboliittien poistuma simuloidussa aktiivilietelaitoksessa, kun pitoisuus vastaa > 12 mg DOC/l (tai noin 40 mg COD/l) optimaalisen arvon ollessa 20 mg DOC/l. (DOC = Dissolved Organic Carbon, liuennut orgaaninen hiili; COD = Chemical Oxygen Demand, kemiallinen hapenkulutus).

Testattavan aineen orgaanisen hiilen määrä (tai kemiallinen hapenkulutus) on määritettävä.

#### 1.1.3 *Biologisen primaarihajoamisen määritys (ominaisanalyysi)*

Menetelmän tarkoituksena on määrittää ominaisanalyysin avulla aineen biologinen primaarihajoaminen simuloidussa aktiivilietelaitoksessa mittaamalla aineen ja mahdollisten metaboliittien poistuma aktiivilietelaitosmallissa, kun pitoisuus on noin 20 mg/l (pienempää tai suurempaa pitoisuutta voidaan käyttää, mikäli analyyttisen menetelmän ja myrkyllisyysnäkökohtien sen salliessa). Näin voidaan arvioida aineen biologinen primaarihajoaminen (alkuperäisen kemiallisen rakenteen häviäminen).

Tämän menetelmän tarkoituksena *ei ole* testattavan aineen mineralisoitumisen määrittäminen.

Käytettävissä on oltava tarkoituksenmukainen analyyttinen menetelmä testattavan aineen määrityksiä varten.

### 1.2 Määritelmät ja yksiköt

#### 1.2.1 *DOC/COD-analyysi*

Aineen poistuma saadaan seuraavasti:

$$DR = \frac{T - (E - E_O)}{T} \times 100\ \% \qquad [1(a)]$$

jossa:

DR = DOC (tai COD) -poistuma prosentteina annetun testattavan aineen keskimääräisen retentioajan puitteissa

T = testattavan aineen pitoisuus sisääntulovedessä mg DOC/l (tai mg COD/l),

E = koeyksikön poistovirran DOC (tai COD)-pitoisuus mg DOC/l (tai mg COD/l),

$E_O$ = nollakokeen poistovirran DOC (tai COD)-pitoisuus mg DOC/l (tai mg COD/l).

Hajoaminen ilmoitetaan DOC (tai COD) -poistumaprosentteina testattavan aineen annetun retentioajan puitteissa.

1.2.2 *Ominaisanalyysi*

Testattavan aineen prosentuaalinen poistuma vesifaasista ($R_w$) annetun retentioajan puitteissa lasketaan seuraavasti:

$$R_w = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

jossa:

$C_1$ = aineen pitoisuus testiyksikön sisäänvirtauksessa (mg ainetta/l, määritettynä ominaisanalyysillä),

$C_o$ = aineen pitoisuus testiyksikön ulosvirtauksessa (mg ainetta/l, määritettynä ominaisanalyysillä).

1.3 **Vertailuaineet**

Uutta ainetta tutkittaessa vertailuaineista saattaa joissakin tapauksissa olla hyötyä. Sopivia vertailuaineita ei kuitenkaan vielä voida suositella.

1.4 **Testin periaate**

Lopullisen hajoamisen määrittämiseksi kahta aktiivilietekoeyksikköä käytetään rinnakkain (OECD:n toteamiskoe tai huokoiset astiayksiköt). Testattavaa ainetta lisätään toisen yksikön sisääntuloveteen (synteettiseen tai kotitalousjäteveteen) toisen saadessa pelkkää jätevettä. Ominaisanalyysillä määritetään biologinen primaarihajoaminen ainoastaan yhden yksikön tulo- ja poistovedestä.

DOC (tai COD) -pitoisuudet mitataan poistovirroista tai aineen pitoisuudet määritetään ominaisanalyysillä.

Testattavaan aineeseen kuuluvaa DOC-määrää ei mitata vaan se ainoastaan ilmoitetaan.

Kun DOC (tai COD)-määritykset suoritetaan, koe- ja kontrollipoistovirtojen keskipitoisuuksien eron oletetaan johtuvan hajoamattomasta koemateriaalista.

Ominaisanalyysejä tehtäessä voidaan alkuperäismolekyylipitoisuuden muutokset mitata (biologinen primaarihajoaminen).

Yksiköitä voidaan käsitellä "yhdistettyinä yksikköinä" käyttämällä ristiinymppäystä.

1.5 **Laatukriteerit**

Aineen alkupitoisuus määräytyy käytetyn analyyttisen menetelmän ja sen asettamien rajoitusten mukaan.

1.6 **Testin kuvaus**

1.6.1 *Testin valmistelu*

1.6.1.1 Laitteet

Testissä käytetään kahta samaa tyyppiä olevaa yksikköä, paitsi ominaisanalyysejä tehtäessä. Kahta laitetyyppiä voidaan käyttää:

OECD:n toteamiskoe:

Laitteen osat ovat (Lisäys 1) synteettisen jäteveden säiliö (A), annostelupumppu (B), ilmastusastia (C), erotusastia (D), paineilmapumppu (E) aktiivilietteen kierrättämiseksi ja käsitellyn poistovirran keräämisastia (F).

A- ja F-astioiden on oltava lasia tai sopivanlaatuista muovia ja vähintään 24 litran vetoisia. Pumpun (B) on pumpattava synteettistä jätevettä jatkuvana virtana ilmastusastiaan. Pumppaus voidaan tehdä usealla tavalla, mutta virtaus ja pitoisuus on varmistettava. Normaalin testin aikana erotusastia (D) on niin

korkealla, että ilmastusastiassa on kolme litraa seosta. Sintrattu ilmastuskuutio (G) sijaitsee C-astiassa kartion kärjen yläpuolella. Ilmastuslaitteen puhaltaman ilman määrää voidaan valvoa virtausmittarilla. Paineilmapumppu (E) on asennettu siten, että aktiivilietteen kierrätys erottimesta ilmastusastiaan (C) on jatkuvaa ja säännöllistä.

"Huokoinen astia"

Huokoinen astia on huokoista polyeteenilevyä (paksuus 2 mm, suurin huokoskoko 95 µm), josta tehdään 14 cm:n läpimittainen, 45° kartiokulmapohjainen sylinteri (Lisäyksen 2 kuvat 1 ja 2). Huokoinen astia pannaan 15 cm:n läpimittaiseen läpäisemättömään muoviastiaan, jossa on aukko 17,2 cm:n korkeudella. Huokoisen astian tilavuus määräytyy aukon sijainnin mukaan (3 litraa). Sisäastian reunassa on jäykkä muovirengas, jonka ansiosta sisä- ja ulkoastian väliin jää 0,5 cm tilaa poistovirtaa varten.

Huokoiset astiat voidaan kiinnittää lämpösäädellyn vesihauteen jalustaan. Sisäastian pohjassa on hajottimilla varustettu ilmastusputki.

A- ja F-astioiden on oltava lasia tai sopivanlaatuista muovia ja vähintään 24 litran vetoisia. Pumpun (B) on pumpattava synteettistä jätevettä jatkuvana virtana ilmastusastiaan. Pumppaus voidaan tehdä usealla tavalla, mutta virtaus ja pitoisuus on varmistettava.

Huokoisia vara-astioita on pidettävä saatavilla käytössä tukkeutuneiden astioiden korvaamiseksi. Tukkeutuneet astiat puhdistetaan upottamalla ne vuorokaudeksi hypokloriittiliuokseen ja pesemällä ne sen jälkeen huolellisesti vesijohtovedellä.

1.6.1.2 Suodatus

Kalvosuodatinlaite ja kalvosuodattimia, joiden huokoskoko on 0,45 µm. Kalvosuodattimet ovat sopivia, mikäli ne eivät vapauta hiiltä eivätkä adsorboi ainetta suodatuksen aikana.

1.6.1.3 Jätevesi

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää synteettistä ravinneliuosta tai kotitalousjätevettä.

Esimerkki synteettisestä ravinneliuoksesta

Kukin aineosa liuotetaan litraan vesijohtovettä:

| | |
|---|---|
| Peptoni: | 160 mg, |
| Lihauute: | 110 mg, |
| Urea: | 30 mg, |
| NaCl: | 7 mg, |
| $CaCl_2.2H_2O$: | 4 mg, |
| $MgSO_4.7H_2O$: | 2 mg, |
| $K_2HPO_4$: | 28 mg. |

Kotitalousjätevesi

Tuoretta jätevettä on hankittava päivittäin pääasiallisesti kotitalouksien jätevettä käsittelevän laitoksen esiselkeytyssäiliön ylivuotoputkesta.

1.6.1.4 Testattavan aineen varastoliuos

Testattavasta aineesta on valmistettava esimerkiksi 1-prosenttinen liuos, jota lisätään testiyksikköön. Aineen pitoisuuden on oltava tiedossa, koska sen perusteella lasketaan, kuinka paljon jäteveteen tai toisen pumpun avulla suoraan yksikköön on liuosta lisättävä, jotta saadaan testissä käytetty pitoisuus.

1.6.1.5 Inokulaatti

*Huomautus:* Kun käytetään kotitalousjätevettä, bakteeripitoisuudeltaan alhaisen inokulaatin käyttö ei ole tarkoituksenmukaista, mutta aktiivilietettä voidaan käyttää.

Testissä voidaan käyttää monenlaisia inokulaatteja.

Seuraavassa kolme esimerkkiä sopivista inokulaateista:

a) Inokulaatti jälkiselkeytysvedestä:

Inokulaattina on käytettävä korkealaatuista jälkiselkeytysvettä puhdistamosta, jossa käsitellään pääasiassa kotitalouksista peräisin olevaa jätevettä. Näyte on pidettävä aerobisissa olosuhteissa näytteenotosta käyttöön asti. Inokulaatin valmistamiseksi näyte suodatetaan karkealla suodattimella ja ensimmäiset 200 ml heitetään pois. Suodos säilytetään aerobisissa olosuhteissa, kunnes se käytetään. Inokulaatti on käytettävä hankintapäivänä. Ymppäykseen tarvitaan vähintään 3 ml.

b) Yhdistetty inokulaatti

Jälkiselkeytysvedestä tehty inokulaatti:

Ks. edellä olevaa selostusta.

Mullasta tehty inokulaatti

Suspendoidaan 100 g puutarhamaata (viljavaa, ei steriiliä) 1 000 ml:aan klooritonta juomavettä (maalaadut, jotka ovat hyvin suurelta osalta savea, hiekkaa tai orgaanista hiiltä, eivät ole sopivia). Sekoituksen jälkeen suspension annetaan asettua 30 minuuttia. Kelluva neste suodatetaan karkean suodatinpaperin lävitse ja ensimmäiset 200 ml heitetään pois. Suodos ilmastetaan välittömästi ja ilmastusta jatketaan käyttöön asti. Inokulaatti on käytettävä hankintapäivänä.

Pintavedestä tehty inokulaatti

Inokulaatin seuraava osa tehdään mesosaprobisesta pintavedestä. Näyte suodatetaan karkean suodattimen lävitse ja ensimmäiset 200 ml heitetään pois. Suodos säilytetään aerobisissa olosuhteissa, kunnes se käytetään. Inokulaatti on käytettävä hankintapäivänä.

Yhtä suuri osa kutakin kolmea inokulaattia sekoitetaan hyvin ja lopullinen inokulaatti otetaan tästä seoksesta.

Ymppäykseen käytetään vähintään 3 ml.

c) Aktiivilieteinokulaatti

Pääasiallisesti kotitalousjätevettä puhdistavan laitoksen ilmastustankista otettua aktiivilietettä (enintään 3 litraa) voidaan käyttää inokulaattina (suspendoituneiden kiintoaineiden pitoisuus enintään 2,5 g/l).

1.6.2 *Testin suorittaminen*

Testi tehdään huoneenlämmössä, jonka on oltava 18-25 °C.

Tietyissä tapauksissa testi voidaan suorittaa tätä alemmassa lämpötilassa (ei alle 10 °C). Mikäli aine hajoaa, muita toimenpiteitä ei yleensä tarvita. Ellei aine hajoa, koe on tehtävä tasaisessa 18-25 °C:n lämpötilassa.

1.6.2.1 Esivaihe: lietteen muodostuminen/yksiköiden stabiloituminen

Lietteen kasvu/stabiloitumisajalla tarkoitetaan sitä aikaa, jonka kuluessa aktiivilietteessä olevat kiintoaineet ja toiminta yksiköt saavuttavat koeolosuhteiden vallitessa stationääritilan.

Esivaiheella tarkoitetaan aikaa testattavan aineen lisäämisestä siihen asti, kunnes sen poistuma saavuttaa tasanteen (suhteellisen vakioisen arvon). Tämä ajanjakso saa kestää enintään kuusi viikkoa.

Arviointiaika kestää kolme viikkoa siitä, kun testattavan aineen poistuma saavuttaa suhteellisen vakaioisen ja yleensä korkean arvon. Kun testataan sellaisia aineita, jotka ensimmäisten kuuden viikon kuluessa hajoavat huonosti tai eivät hajoa lainkaan, arviointiaika on seuraavat kolme viikkoa.

Täytetään aluksi yhteen testiin tarvittava yksikkö (yksiköt) tuloveteen sekoitetulla inokulaatilla.

Ilmastin (ja paineilmapumppu (E) OECD:n toteamiskoeyksiköissä) sekä annostuspumppu käynnistetään.

Veden, jossa ei ole testattavaa ainetta, täytyy kulkea ilmastusastian (C) läpi joko yhden litran tai puolen litran tuntinopeudella; tämä antaa retentioajan keskiarvoksi joko kolme tai kuusi tuntia.

Ilmastusnopeus on säädettävä siten, että C-astian sisältö pysyy suspensiona ja liuenneen hapen pitoisuus on vähintään 2 mg/l.

Vaahtoaminen on estettävä soveltuvin tavoin, mutta aktiivilietteen toimintaa estäviä vaahdonestoaineita ei saa käyttää.

Ilmastusastian (C) yläreunaan (ja OECD:n toteamiskoeyksiköissä erotusastian (D) pohjaan ja kierrätysputkeen) kertynyt liete on palautettava suspensioon vähintään kerran päivässä harjaamalla tai jollakin muulla tavalla.

Jos liete ei selkeydy, sitä voidaan sakeuttaa lisäämällä 5-prosenttista rautakloridiliuosta 2 ml:n annoksina tarpeen mukaan.

Poistovirta kerätään astiaan (E tai F) 20 tai 24 tunnin ajaksi, ja siitä otetaan huolellisen sekoituksen jälkeen näyte. Astian (E tai F) on oltava huolellisesti puhdistettu.

Kokeen kulku tarkistetaan mittaamalla kerätyn poistovirran suodoksesta kemiallinen hapenkulutus (COD) tai liuennut orgaaninen hiili (DOC) vähintään kahdesti viikossa. Sama mittaus suoritetaan tuloveden suodoksesta (käyttäen 0,45 µm huokoskoon kalvoa ja kaatamalla noin 20 ml ensiksi suodatettua nestettä pois).

COD- tai DOC-arvojen pienenemisen tulisi tasaantua, kun suurin piirtein säännöllinen päivittäinen hajoamistaso on saavutettu.

Ilmastustankissa olevan aktiivilietteen kuiva-ainepitoisuus on määritettävä kahdesti viikossa (grammoina litraa kohden). Tämä voidaan tehdä yksiköissä kahdella tavalla: aktiivilietteen kuiva-ainepitoisuus määritetään kahdesti viikossa ja sen ylittäessä 2,5 g/l ylimääräinen aktiiviliete heitetään pois, tai 500 ml liuosta heitetään pois kustakin huokoisesta astiasta päivittäin, jolloin lietteen keskimääräiseksi retentioajaksi tulee kuusi päivää.

Kun näiden kahden yksikön mitatut ja arvioidut parametrit (menetelmän tehokkuus (COD- tai DOC-poistumana ilmaistuna), lietteen pitoisuus, lietteen selkeytymisominaisuudet, poistovirtojen sameus jne.) ovat kyllin vakaita, testattava aine voidaan lisätä toisen yksikön sisääntuloveteen 1.6.2.2. kohdassa selostetulla tavalla.

Testattava aine voidaan vaihtoehtoisesti lisätä lietteen kasvuajan alkaessa (1.6.2.1), varsinkin jos lietettä käytetään inokulaattina.

1.6.2.2 Testin suorittaminen

Koeolosuhteet pidetään samoina kuin esivaiheen aikana ja koeyksikön tuloveteen lisätään testattavan aineen varastoliuosta (noin 1-prosenttista) niin paljon, että jäteveteen saadaan haluttu pitoisuus (noin 10-20 mg DOC/l tai 40 mg COD/l). Tämä voidaan tehdä sekoittamalla varastoliuosta jäteveteen päivittäin tai käyttämällä erillistä pumppua. Pitoisuutta voidaan lisätä asteittain, kunnes haluttu pitoisuus on saavutettu. Ellei testattava aine aiheuta aktiivilietteessä myrkkyvaikutuksia, korkeampiakin pitoisuuksia voidaan testata.

Nollakoeyksikköön syötetään pelkästään tulovettä ilman lisäaineita. Poistovedestä otetaan anlysoitavaksi riittävät näytteet, jotka suodatetaan kalvosuodattimilla (0,45 µm) ja noin 20 ml ensin saatua suodosta heitetään pois.

Suodokset on analysoitava samana päivänä. Muussa tapauksessa ne on säilöttävä jollakin sopivalla tavalla, esimerkiksi lisäämällä 0,05 ml 1- prosenttista elohopeakloridia ($HgCl_2$) suodoksen kutakin 10 mg:a kohden tai varastoimalla näytteet 2-4 °C:n lämpötilassa korkeintaan yhden vuorokauden tai alle -18 °C:n lämpötilassa tätä pidemmän ajan.

Esivaihe, jolloin testattava aine lisätään, saa kestää enintään kuusi viikkoa ja arviointiajan on oltava vähintään kolme viikkoa, jolloin käytettävissä on noin 14-20 määritystä lopullisen tuloksen laskemista varten.

Parittaiset yksiköt -menetelmä:

Yksiköt yhdistetään pareiksi vaihtamalla 1,5 l (lietepitoista) suspensiota aktiivilietteen ilmastusastiasta kahden yksikön välillä kerran päivässä. Jos testattava materiaali on voimakkaasti absorboivaa, otetaan selkeytysastioista 1,5 l pelkkää kelluvaa nestettä, joka siirretään toisen yksikön aktiivilieteastiaan.

1.6.2.3 Analyysi

Aineen käyttäytymistä voidaan seurata kahden analyysin avulla:

DOC ja COD:

DOC-pitoisuudet määritetään kahtena kappaleena hiilianalysaattorilla ja /tai COD-arvot lähdeluettelon 2 kohdan mukaisesti.

Ominaisanalyysi:

Testattavan aineen pitoisuudet määritetään jollakin analyyttisellä menetelmällä. Jos mahdollista, aineen absorboituminen lietteeseen on määritettävä erikseen.

## 2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

### 2.1 Pareiksi yhdistetyt yksiköt

Kun käytetään yksikköpareja, päivittäinen poistuma-aste, (daily degree of removal, DR) määritetään 1.2.1 kohdan mukaisesti.

Nämä päivittäiset poistumat, DR, korjataan muotoon DRc; ristiinymppäyksestä johtuvaksi aineen siirtymäksi, yhtälöllä (2) kolmen tunnin tai yhtälöllä (3) kuuden tunnin keskimääräisen retentioajan osalta.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad (2)$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad (3)$$

DRc-arvosarjan keskiarvo sekä keskipoikkeama lasketaan yhtälöllä (4)

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n - 1}} \quad (4)$$

jossa:

$S_{DRc}$ = DRc-arvosarjan keskipoikkeama,

$\overline{DRc}$ = DRc-arvon keskiarvo,

n = määritysten lukumäärä.

DRc-sarjan vieraat havainnot eliminoidaan soveltuvin tilastollisin menetelmin, esim. Nalimov (6), 95 %:n todennäköisyydellä, jonka jälkeen keskiarvo ja keskipoikkeama lasketaan uudelleen.

Lopullinen tulos lasketaan sen jälkeen yhtälöllä (5)

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}} S_{DRc} \quad (5)$$

jossa:

$t_{n-1};\alpha$ = E:n ja $E_O$:n n-arvoparien t:n taulukkoarvo ja tilastollinen luotettavuus P (P = 1 – α), jolloin P on 95 % (1).

Tuloksena ilmoitetaan keskiarvo sallituin poikkeamin 95 %:n todennäköisyydellä, vastaava keskipoikkeama ja DRc-arvosarjan arvojen lukumäärä vieraiden havaintojen eliminoinnin jälkeen sekä vieraiden havaintojen lukumäärä, esim.

DRc = 98,6 ± 2,3 % DOC-poistuma,

s = 4,65 % DOC-poistuma,

n = 18,

x = vieraiden havaintojen lukumäärä.

## 2.2 Toisiinsa yhdistämättömät yksiköt

Yksikköjen toimintaa voidaan valvoa seuraavasti:

$$\text{COD- tai DOC-poistumaprosentti} = \frac{\text{jäteveden COD tai DOC} - \text{poistovirran COD tai DOC}}{\text{jäteveden COD tai DOC}} \times 100$$

Nämä päivittäiset poistumat voidaan esittää graafisesti käyränä, jolloin esim. akklimatisaatio saadaan esiin.

### 2.2.1 *COD/DOC-määritysten käyttö*

Päivittäinen DR-poistuma lasketaan 1.2.1 kohdan mukaisesti.

DR-arvosarjan keskiarvo sekä keskipoikkeama lasketaan seuraavasti:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DR} - DR_i)^2}{n - 1}} \quad (6)$$

jossa:

$S_{DR}$ = $DR_i$-arvosarjan keskipoikkeama,

$\overline{DR}$ = $DR_i$-arvojen keskiarvo,

n = määritysten lukumäärä.

DRc-sarjan vieraat havainnot eliminoidaan soveltuvin tilastollisin menetelmin, esim. Nalimov (6), 95 %:n todennäköisyydellä, jonka jälkeen keskiarvo ja keskipoikkeama lasketaan uudelleen.

Lopullinen tulos lasketaan sen jälkeen yhtälöllä (7)

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}} S_{DR} \qquad (7)$$

jossa:

$t_{n-1}\alpha$; = E:n ja $E_o$:n n-arvoparien t:n taulukkoarvo ja tilastollinen luotettavuus P (P = 1 – α), jolloin P on 95 % (1).

Tuloksena ilmoitetaan keskiarvo sallituin poikkeamin 95 %:n todennäköisyydellä, vastaava keskipoikkeama ja DR-arvosarjan arvojen lukumäärä vieraiden havaintojen eliminoinnin jälkeen sekä vieraiden havaintojen lukumäärä, esim.

DR = (98,6 ± 2,3 %) DOC-poistuma,

s = 4,65 % DOC-poistuma,

n = 18,

x = vieraiden havaintojen lukumäärä.

2.2.2 *Ominaisanalyysin käyttö*

Testattavan aineen poistumaprosentti vesifaasista ($R_w$) lasketaan 1.2.2 kohdan mukaisesti.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat kohdat:

— lisäyksessä 3 oleva kaavake, joka sisältää tiedot koeolosuhteista,

— laitevalinta (OECD:n toteamiskoe vai huokoiset astiat),

— menetelmän valinta: pareittain yhdistetyt yksiköt vai yhdistämättömät yksiköt,

— jäteveden valinta: synteettinen vai kotitalousjätevesi - jälkimmäisessä tapauksessa näytteenottopaikka ja -aika,

— inokulaatin valinta sekä näytteenottopaikka ja -aika,

— selostus analyyttistä menetelmästä, mikäli ominaisanalyysejä tehtiin,

— COD- tai DOC-poistumakäyrät suhteessa aikaan esivaiheen ja arviointivaiheen osalta,

— testattavan aineen liuennut orgaaninen hiili (DOC) tai kemiallinen hapenkulutus (COD) varastoliuoksesta analysoituna,

— mikäli ominaisanalyysejä on tehty, testattavan aineen poistumaprosentti vesifaasista ($R_w$) käyränä suhteessa aikaan (esivaihe ja arviointivaihe),

— testattavan aineen DOC- tai COD-poistuman keskiarvo ja keskipoikkeama laskettuna arviointiajan tuloksista eli aikana, jolloin testattavan aineen poistuma oli pysyvä tai kokeen kulku vakaa,

— käyrä aktiivilietepitoisuudesta suhteessa aikaan,

— aktiivilietteeseen liittyvät huomautukset (liian lietteen poistaminen, tilavuuden kasvu, $FeCl_3$ jne.),

— aineen testipitoisuus,

— mahdollisen lieteanalyysin tulokset,

— kaikki testattavaa ainetta ja mahdollista vertailuainetta koskevat tiedot ja koetulokset,

— testausmenetelmään tehtyjen muutosten tieteelliset perustelut.

3.2 **Tulosten tulkinta**

Testattavan aineen alhainen poistuma saattaa olla seurausta sen mikro-organismeihin kohdistuvasta inhibitiosta. Tämä voi myös ilmetä lietteen liukenemisena ja häviämisenä, jolloin kelluva neste on sameaa, sekä COD (tai DOC) -poistumistehon alenemisena esitestissä.

Fysikaalis-kemiallisella adsorptiolla voi eräissä tapauksissa olla tietty vaikutus. Molekyyliin kohdistuvan biologisen toiminnan ja fysikaalis-kemiallisen adsorption väliset erot voidaan selvittää analysoimalla jätevesi riittävän desorption jälkeen.

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 inokulaattina perussarjan testissä (mieluimmin respirometritestissä).

Kun todetaan korkeita DOC- tai COD-poistumia, ne ovat seurausta biologisesta hajoamisesta, kun taas alhaisten poistumien ollessa kyseessä biologista hajoamista ei pystytä erottamaan eliminaatiosta. Jos esimerkiksi liukenevalla yhdisteellä on 98 %:n adsorptiovakio ja ylimääräisen lietteen hukka on 10 % päivässä, 40-prosenttinen eliminaatio on mahdollista; kun ylimääräisen lietteen hukka on 30 %, ylimääräiseen lietteeseen adsorboitumisesta ja sen mukana poistumisesta johtuva eliminaatio voi olla jopa 65 % (4).

Kun käytetään ominaisanalyysiä, huomiota on kiinnitettävä aineen rakenteen ja käytetyn ominaisanalyysin väliseen suhteeseen. Tässä tapauksessa ei todettua ilmiötä voida pitää aineen mineralisoitumisena.

## 4 LÄHDELUETTELO


1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 303 A*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Liite V C9 Hajoamistesti - Kemiallinen hapenkulutus, komission direktiivi 84/449/ETY, *Euroopan yhteisöjen virallinen lehti*, N:o L 251, 19.9.1984.

3) Painter, H. A., King, E. F., WRC *Porous-Pot method for assessing biodegradability*, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.

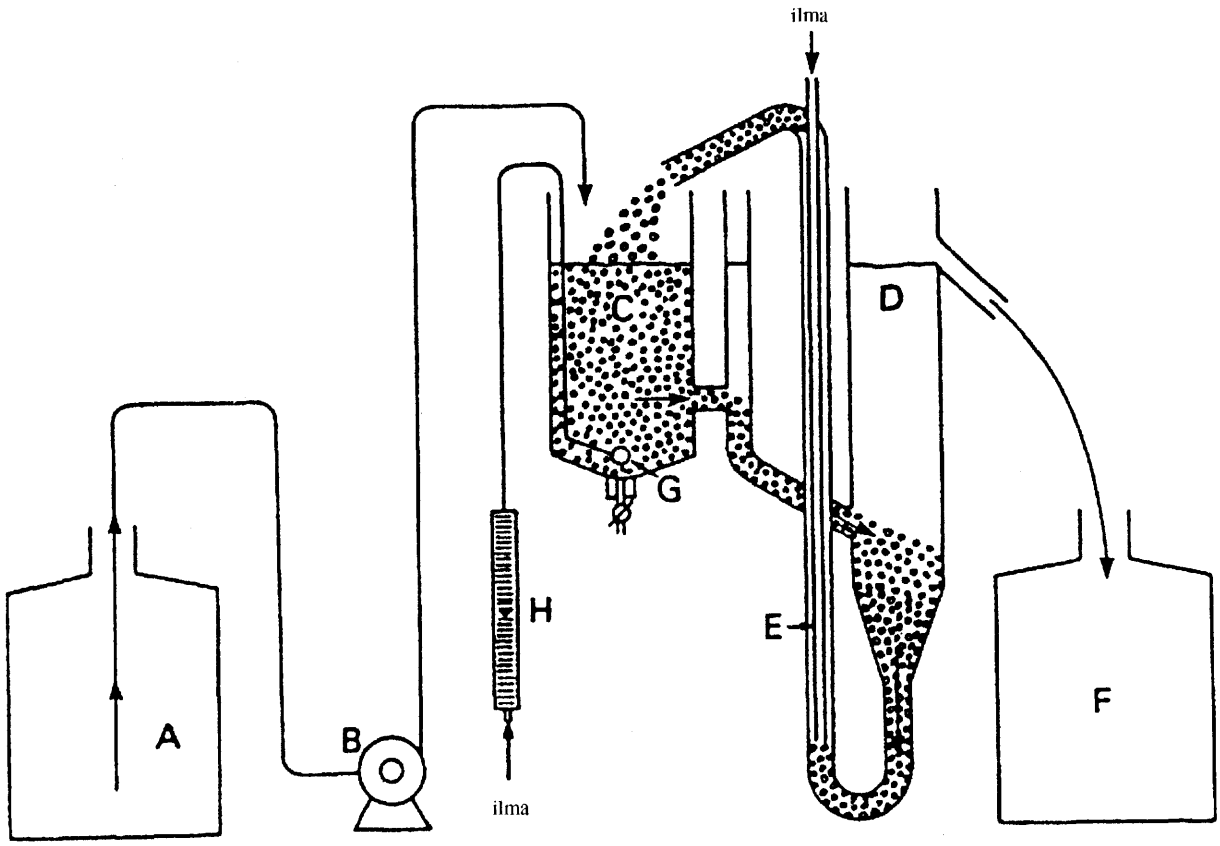
4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, ss. 161-171.

5) Pesuaineiden biologisesta hajoamisesta annettujen neuvoston direktiivien 82/242/ETY ja 82/243/ETY, *Euroopan yhteisöjen virallinen lehti*, N:o L 109, 22.4.1982, muuttamisesta annetut neuvoston direktiivit 73/404/ETY ja 73/405/ETY, *Euroopan yhteisöjen virallinen lehti*, No L 347, 17.12.1973.

6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), ss. 406-409.

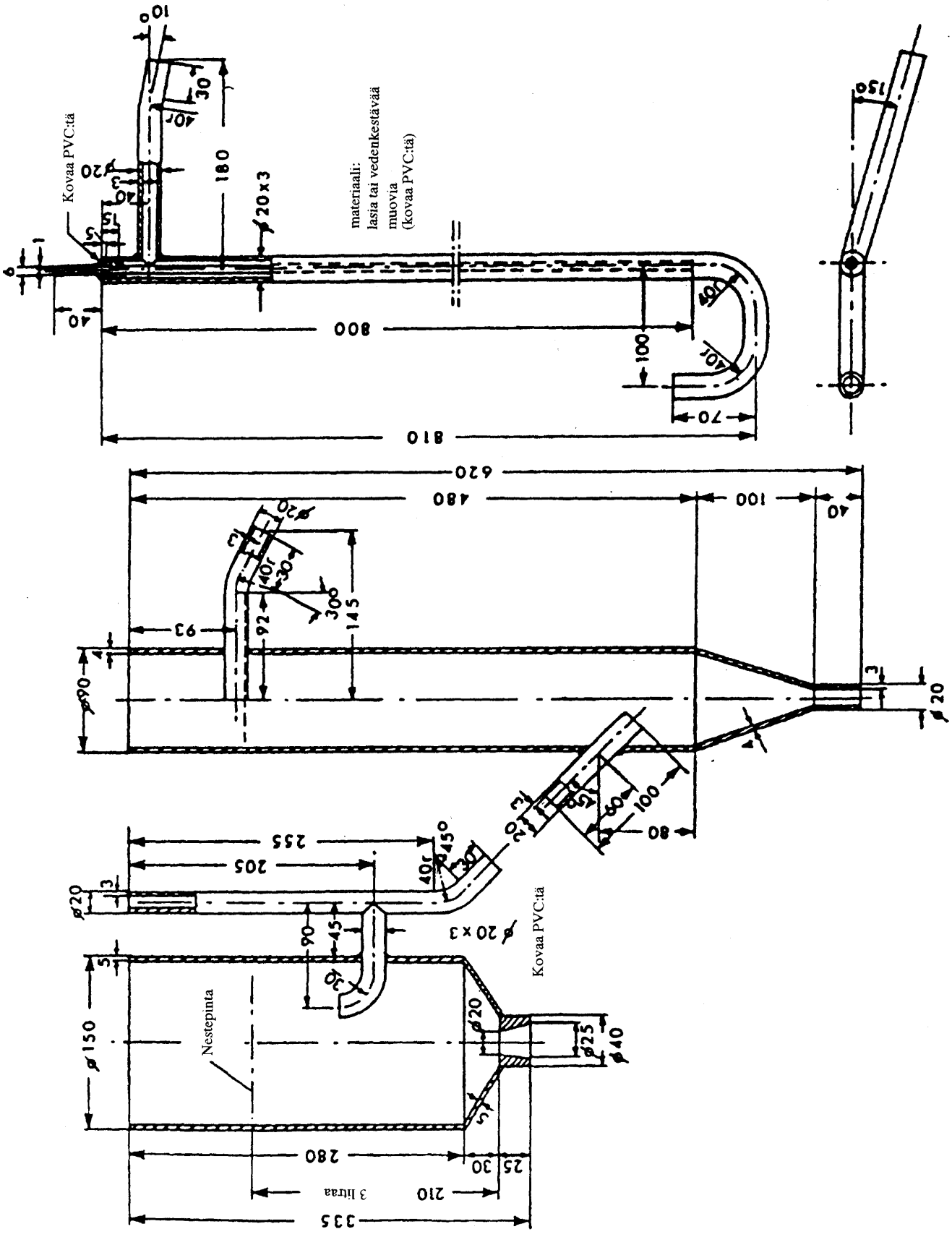
*Lisäys 1*

*Kuva 1*




A = säilytysastia;
B = annostelulaite;
C = ilmastuskammio (vetoisuus 3 l);
D = selkeytysastia;
E = ilmapumppu;
F = kokooja;
G = ilmastaja;
H = ilmavirtamittari (valinnainen).

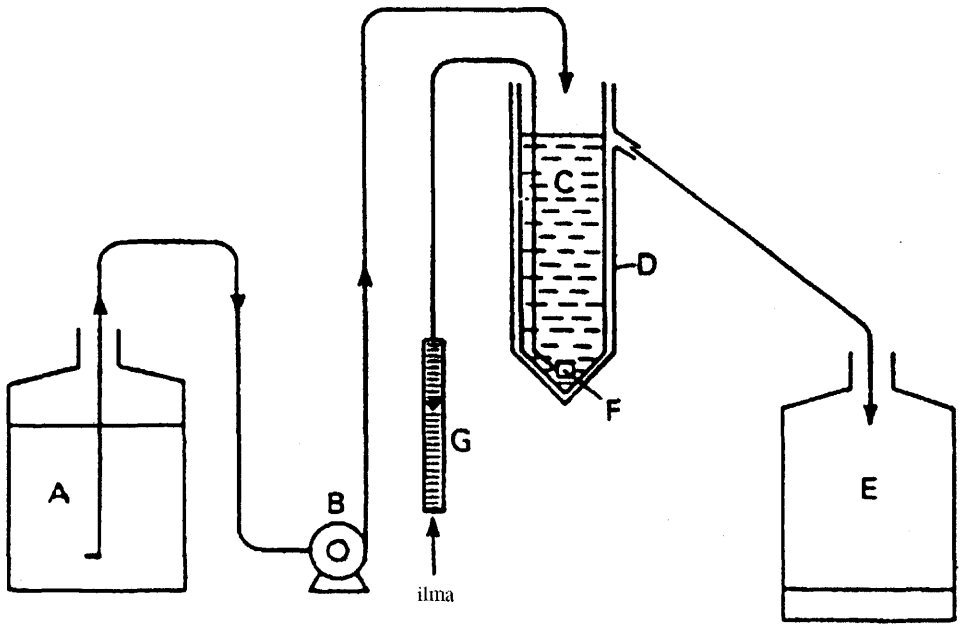
*Kuva 2*


Kovaa PVC:tä
materiaali:
lasia tai vedenkestävää
muovia
(kovaa PVC:tä)
Nestepinta
3 litraa
Kovaa PVC:tä

*Lisäys 2*

*Kuva 1*

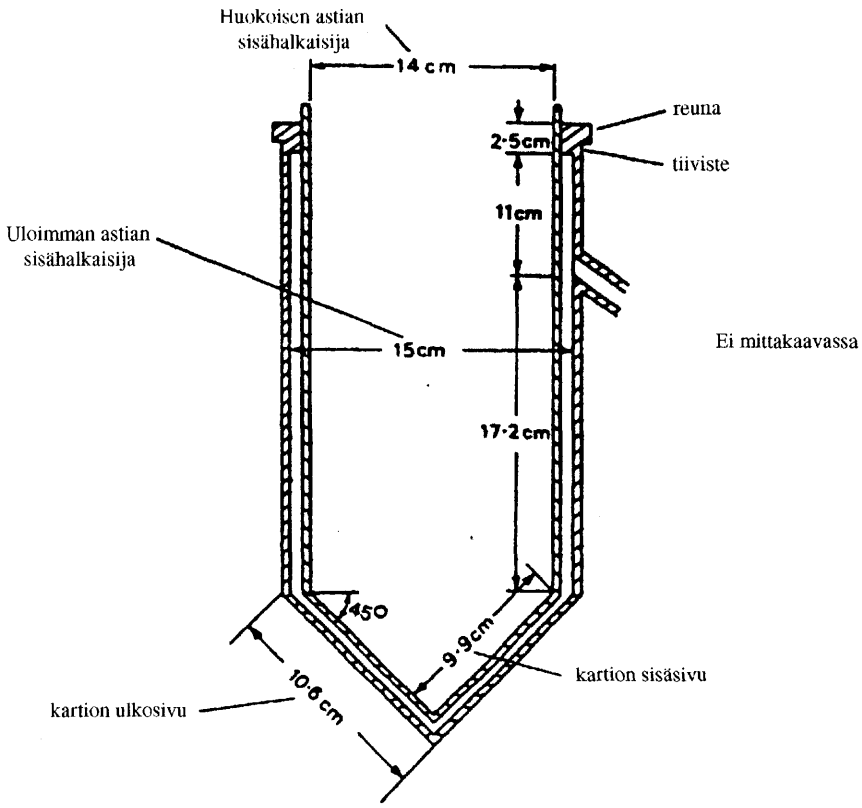
**Biologisen hajoamisen määrityslaitteisto**




A = säilytysastia;
B = annostelupumppu;
C = huokoinen ilmastusastia;
D = ulompi tiivis astia;
E = poistoveden keräysastia;
F = ilmastaja;
G = rotametri (valinnainen)

*Kuva 2*

**Kolmen litran huokoisen ilmastusastian yksityiskohdat**



*Lisäys 3*

**Aktiivilietteen simulointitestin suoritusolosuhteet**

*Jokainen ryhmä tarkistetaan*

*Laitteet*

OECD:n toteamiskoe ☐
Huokoiset astiat ☐

*Toimintatapa*

Yksittäinen yksikkö ☐
Parittaiset yksiköt ☐
Ei-parittaiset yksiköt ☐

*Ristiinymppäys*

Ei käytetä ☐
Aktiiviliete ☐
Kelluva neste ☐

*Keskimääräinen retentioaika*

Kolme tuntia ☐
Kuusi tuntia ☐

*Perusravinne*

Kotitalousjätevesi ☐
Synteettinen jätevesi ☐

*Inokulaatti*

Jälkiselkeytyspoistovesi ☐
Yhdistetty ☐
Aktiiviliete ☐

*Testattavan aineen lisäys*

Kokeen alusta alkaen ☐
Asteittain suureneva ☐
Lietteen muodostumisen jälkeen ☐

*Analyysi*

Ominaisanalyysi ☐
COD ☐
DOC ☐

# BIOLOGINEN HAJOAMINEN

## AKTIIVILIETTEEN SOLUHENGITYKSEN INHIBITIOTESTI

## 1 MENETELMÄ

### 1.1 Johdanto

Tässä kuvatun menetelmän avulla arvioidaan testattavan aineen vaikutus mikro-organismeihin määrittämällä soluhengitysaste tietyissä olosuhteissa, joissa testattavaa ainetta on läsnä eri suuruisina pitoisuuksina.

Tällä seulontamenetelmällä voidaan nopeasti määrittää aineet, jotka saattavat vaikuttaa haitallisesti aerobisiin mikrobikasvustoihin sekä määrittää testattavien aineiden biologisiin hajoamiskokeisiin sopivat pitoisuudet, joilla ei ole inhibitiovaikutusta.

Ennen varsinaista koetta voidaan tehdä raja-annostesti. Sen avulla määritetään varsinaisessa kokeessa käytettävien pitoisuuksien rajat.

Tutkimussuunnitelma sisältää kaksi kontrollia, joissa ei käytetä tutkittavaa ainetta, toinen koesarjan alussa ja toinen koesarjan lopussa. Jokainen aktiiviliete-erä tulee lisäksi tarkistaa vertailuaineen avulla.

Tämä menetelmä soveltuu parhaiten sellaisten aineiden tutkimiseen, jotka vesiliukoisuutensa ja alhaisen haihtuvuutensa ansiosta todennäköisesti jäävät veteen.

Rajoitetusti väliaineisiin liukenevien aineiden $EC_{50}$-määritys saattaa olla vaikeaa.

Hapenkulutukseen perustuvat tulokset saattavat olla harhaanjohtavia, mikäli testattavalla aineella on taipumusta osallistua hapettavaan fosforylaatioon.

Seuraavat tiedot helpottavat testin suorittamista:

— vesiliukoisuus,

— höyrynpaine,

— rakennekaava,

— aineen puhtaus.

*Suositus:*

Aktiiviliete saattaa sisältää patogeenejä ja sitä on sen vuoksi käsiteltävä varoen.

### 1.2 Määritelmät ja yksiköt

Soluhengitysasteella tarkoitetaan aerobisessa lietteessä olevien jäteveden mikro-organismien hapenkulutusta, joka yleensä ilmoitetaan muodossa mg $O_2$/mg lietettä tunnissa.

Kun lasketaan testattavan aineen tietyn pitoisuuden inhibitiovaikutus, soluhengitysaste ilmoitetaan prosentteina kahden kontrollin soluhengitysasteen keskiarvosta:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{procentuell hämming}$$

jossa:

$R_s$ = testatun aineen hapenkulutusaste koepitoisuuden,

$Rc_1$ = hapenkulutusaste, kontrolli 1,

$Rc_2$ = hapenkulutusaste, kontrolli 2.

Tässä menetelmässä $EC_{50}$:llä tarkoitetaan testattavan aineen pitoisuutta, jota käytettäessä hengitysaste on 50 % kokeessa käytetyn kontrollin soluhengitysasteesta.

1.3 **Vertailuaineet**

Vertailuaineena suositellaan käytettäväksi 3,5-dikloorifenolia, joka on tunnettu hengitysinhibiittori. Jokaisen aktiiviliete-erän $EC_{50}$ testataan tällä aineella, jotta voidaan varmistua siitä, että lietteen herkkyys ei ole epänormaali.

1.4 **Testin periaate**

Standardiannoksella synteettistä jätevesiravinnetta ravitun aktiivilietteen soluhengitysaste mitataan 30 minuutin ja/tai kolmen tunnin kontaktiajan kuluttua. Saman aktiivilietteen soluhengitysaste mitataan samoissa koeolosuhteissa, kun siihen on lisätty erisuuruisia pitoisuuksia testattavaa ainetta. Testattavan aineen tietyn pitoisuuden inhiboiva vaikutus ilmaistaan prosentteina kahden kontrollin soluhengitysasteen keskiarvosta. $EC_{50}$-arvo lasketaan eri pitoisuuksilla tehdyistä määrityksistä.

1.5 **Laatuvaatimukset**

Testitulokset ovat hyväksyttäviä, jos

— kahden kontrollin hengitysasteissa on korkeintaan 15 % ero,

— 3,5-dikloorifenolin $EC_{50}$-arvo (30 minuuttia ja/tai 3 tuntia) on välillä 5-30 mg/l.

1.6 **Testin kuvaus**

1.6.1 *Reagenssit*

1.6.1.1 Testattavasta aineesta tehdyt liuokset

Tutkimuksen alkaessa testattavasta aineesta tehdään tuore liuos käyttämällä varastoliuosta. Varastoliuoksen soveltuva pitoisuus on 0,5 g/l, kun testi suoritetaan alla selostettua menettelytapaa noudattaen.

1.6.1.2 Kontrolliaineliuos

3,5-dikloorifenoliliuos voidaan valmistaa esimerkiksi seuraavasti: liuotetaan 0,5 g 3,5-dikloorifenolia 10 ml:aan 1 M NaOH:a, laimennetaan noin 30 ml:aan tislatulla vedellä, liuokseen sekoitetaan 0,5 M $H_2SO_4$:a kunnes saostuminen alkaa - tähän tarvitaan noin 8 ml 0,5 M $H_2SO_4$:ää - ja lopuksi seoksesta tehdään litra liuosta lisäämällä tislattua vettä. Liuoksen pH on tällöin 7-8.

1.6.1.3 Synteettinen jätevesi

Synteettinen jätevesiravinneliuos valmistetaan liuottamalla seuraavat ainemäärät litraan vettä:

— 16 g peptonia,

— 11 g lihauutetta,

— 3 g ureaa,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g $K_2HPO_4$.

*Huomautus 1:* Tämä synteettinen jätevesi on 100-kertainen tiiviste OECD:n teknisessä raportissa "Proposed method for the determination of the biodegrability of surfactants used in synthetic detergents" (June 11, 1976) esitetystä jätevedestä, paitsi että se sisältää myös dikaliumvetyfosfaattia.

*Huomautus 2:* Ellei ravintoainetta käytetä välittömästi valmistuksen jälkeen, sitä säilytetään pimeässä 0-4 °C:n lämpötilassa enintään viikon ajan. Aineen koostumus ei saa muuttua säilytyksen aikana. Ravintoaine voidaan myös steriloida ennen säilytystä tai peptoni ja lihauute voidaan lisätä vasta juuri ennen testin suorittamista. Ennen käyttöä liuos sekoitetaan huolellisesti ja sen pH säädetään.

1.6.2 *Laitteet*

Mittauslaite: Mittauslaitetta ei ole tarkoin määrätty. Nesteen yläpuolella ei saisi kuitenkaan olla tilaa ja elektrodin olisi sovittava tiukasti mittapullon kaulaan.

Testiin tarvitaan tavanomaisia laboratoriovälineitä ja erityisesti jäljempänä lueteltuja laitteita:

— mittauslaite,

— ilmastuslaite,

— pH-elektrodi ja mittauslaite,

— $O_2$-elektrodi.

1.6.3 *Inokulaatin valmistus*

Testissä käytetään mikrobi-inokulaattia, joka on tehty pääasiassa kotitalousjätevesiä puhdistavan laitoksen aktiivilietteestä.

Suuret hiukkaset poistetaan antamalla laboratorioon tuodun lietteen selkeytyä jonkin aikaa, esim. 15 minuuttia, jonka jälkeen hienojakoisempi pintakerros otetaan talteen. Toinen tapa on sekoittaa lietettä sekoittimella muutaman sekunnin ajan.

Jos lietteessä arvellaan olevan inhiboivaa ainetta, liete pestään vesijohtovedellä tai isotonisella liuoksella. Sentrifugoinnin jälkeen kelluva neste poistetaan (tämä menettely toistetaan kolme kertaa).

Pieni määrä lietettä kuivataan ja punnitaan. Tämän perusteella voidaan laskea, paljonko märkää lietettä on sekoitettava veteen, jotta saadaan aktiivilieteliuos, jonka kiinteiden aineiden osuus on 2-4 g/l. Tämä taso edellyttää 0,8 - 1,6 gramman pitoisuutta litrassa testiliuosta, kun käytetään jäljempänä suositeltua menettelytapaa.

Ellei lietettä voida käyttää hankintapäivänä, lisätään edellä selostetulla tavalla valmistettuun aktiivilietteeseen 50 ml synteettistä jätevettä litraa kohden. Seosta ilmastetaan 20 ± 2 °C:n lämpötilassa yön yli ja pidetään ilmastettuna, kunnes se käytetään seuraavana päivänä. Ennen käyttöä pH määritetään ja pH-arvoksi säädetään 6-8. Kiinteiden aineiden osuus liuoksessa määritetään edellisessä kappaleessa selostetulla tavalla.

Jos samaa liete-erää käytetään useana peräkkäisenä päivänä (enintään neljänä päivänä), lietteeseen lisätään jokaisen käyttöpäivän iltana synteettistä jätevettä 50 ml litraa kohden.

1.6.4 *Testin suorittaminen*

| | |
|---|---|
| Kesto/kontaktiaika: | 30 minuuttia ja/tai kolme tuntia, jonka kuluessa tapahtuu ilmastus |
| Vesi: | juomavettä (tarpeen vaatiessa kloori poistettu) |
| Ilmansaanti: | puhdasta, öljytöntä ilmaa. Ilman virtaus 0,5 - 1 l/minuutti |
| Määrityslaite: | tasapohjainen pullo, esim. BOD-pullo |
| Happimittari: | piirturilla varustettu happielektrodi |
| Ravinneliuos: | synteettinen jätevesi (ks. edellä) |
| Testattava aine: | testissä käytetään testin alkaessa valmistettua tuoretta liuosta |
| Vertailuaine: | esim. 3,5-dikloorifenoli (vähintään kolme pitoisuutta) |
| Kontrollit: | inokuloitu näyte ilman testattavaa ainetta |
| Lämpötila: | 20 ± 2 °C. |

Jäljempänä esitettyä menettelytapaa voidaan noudattaa sekä testattavan aineen että vertailuaineen osalta kolmen tunnin kontaktiajan testissä.

Testiin tarvitaan useita astioita (esim. yhden litran dekantterilaseja).

Testissä on käytettävä vähintään viittä pitoisuutta, joiden vakioero on enintään 3,2.

Kokeen alkaessa eli ajassa '0' tehdään 300 ml liuosta liuottamalla 16 ml synteettistä jätevettä veteen. Tähän lisätään 200 ml mikrobi-inokulaattia ja näin saatu seos (500 ml) kaadetaan ensimmäiseen astiaan (ensimmäinen kontrolli $C_1$).

Koeastioita ilmastetaan jatkuvasti, jotta liuennut $O_2$ ei pääse laskemaan alle 2,5 mg/l, ja jotta juuri ennen soluhengityksen mittaamista $O_2$-pitoisuus olisi noin 6,5 mg/l.

Ajassa '15 minuuttia' (15 minuuttia on valinnainen, mutta käyttökelpoinen aika) edelläoleva toistetaan, paitsi että 100 ml testattavan aineen varastoliuosta lisätään 16 ml:aan synteettistä jätevettä. Sen jälkeen lisätään vettä, jotta saadaan 300 ml liuosta ja mikrobi-inokulaatti, jolloin määräksi tulee 500 ml. Seos kaadetaan astiaan numero kaksi ja ilmastetaan kuten edellä. Tämä toistetaan 15 minuutin välein muuttaen testattavan aineen varastoliuoksen määrää siten, että saadaan sarja astioita, joissa on testattavaa ainetta eri suuruisina pitoisuuksina. Lopuksi valmistetaan toinen kontrolli ($C_2$).

Kolmen tunnin kuluttua kirjataan pH; ensimmäisestä astiasta otettu hyvin sekoitettu näyte kaadetaan määrityslaitteeseen ja soluhengitysaste mitataan enintään 10 minuutin ajalta.

Sama toimenpide suoritetaan kunkin astian osalta 15 minuutin välein siten, että jokaisen astian kontaktiaika on kolme tuntia.

Jokainen mikrobi-inokulaattierä testataan vertailuaineella samalla tavoin.

Kun määritykset suoritetaan 30 minuutin kontaktiajan jälkeen, menettelytapaa täytyy muuttaa (esim. yksi happimittari ei riitä).

Jos kemiallisen hapenkulutuksen mittaus on tarpeen, valmistetaan koeastioita, jotka sisältävät testattavaa ainetta, synteettistä jätevesiravinnetta ja vettä, mutta ei aktiivilietettä.

Hapenkulutus määritetään ja kirjataan 30 minuutin ja/tai kolmen tunnin (kontaktiaika) ilmastuksen jälkeen.

## 2 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Soluhengitysaste lasketaan piirturilta väliltä 6,5 mg $O_2$/l - 2,5 mg $O_2$/l tai 10 minuutin ajalta soluhengitysasteen ollessa alhainen. Hengitysaste on määritettävä hengityskäyrän lineaarisesta kohdasta.

Elleivät kahden kontrollin soluhengitysasteet ole 15 % sisällä toisistaan tai vertailuaineen $EC_{50}$ (30 minuuttia ja/tai kolme tuntia) ole hyväksyttävä (5 - 30 mg/l käytettäessä 3,5-dikloorifenolia), testiä ei voida hyväksyä ja se on uusittava.

Prosentuaalinen inhibitio määritetään kunkin pitoisuuden osalta (ks. 1.2). Se esitetään pitoisuutta kohden log-normaali- (tai log-todennäköisyys-) paperilla ja johdetaan $EC_{50}$-arvo.

$EC_{50}$-arvojen 95 %:n luotettavuusrajat lasketaan standardimenetelmiä käyttäen.

## 3 RAPORTOINTI

### 3.1 Tutkimusselostus

Tutkimusselostuksen on, jos mahdollista, sisällettävä seuraavat tiedot:

— testattava aine: kemiallinen rakenne,

— testausmenetelmä: aktiivilietteen hankintapaikka, pitoisuus ja mahdollinen esikäsittely,

— koeolosuhteet:

  — seoksen pH ennen soluhengityksen määrittämistä,

  — koelämpötila,

  — kokeen kesto,

  — vertailuaine ja siitä määritetty $EC_{50}$,

  — abioottinen hapen yhteytys (mikäli esiintyy),

— tulokset:

  — kaikki määritystulokset,

  — inhibitiokäyrä ja $EC_{50}$-arvon laskutapa,

  — $EC_{50}$ mikäli mahdollista 95 %:n varmuusrajoin, $EC_{20}$ ja $EC_{80}$,

  — kaikki tarkkailutulokset ja tämän testausmenetelmän muutokset, joilla saattaa olla vaikutusta tuloksiin.

### 3.2 Tulosten tulkinta

$EC_{50}$-arvoa on pidettävä ainoastaan viitteenä testattavan aineen mahdollisista myrkyllisistä vaikutuksista, jotka kohdistuvat jäteveden puhdistukseen aktiivilietemenetelmällä tai jäteveden mikroorganismeihin, koska ympäristössä syntyviä monimutkaisia keskinäisiä vaikutuksia ei pystytä tarkoin simuloimaan laboratoriokokeissa. Ammoniakin hapettumista inhiboivien testattavien aineiden inhibitiokäyrät saattavat lisäksi olla epätyypillisiä. Niitä on tulkittava varovaisuutta noudattaen.

## 4 LÄHDELUETTELO

1) Kansaivälinen standardi ISO 8192-1986.

2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, s. 165.

3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, s. 245.

4) ETAD, (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method* No 103, selostettu myöskin seuraavissa:

5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, s. 80.

6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, s. 247.

7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Decision of the Council C(81) 30 final.

# 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 $C_{kokonais}$ -$C_{epäorgaaninen}$ erona.

Samanaikaisesti käytetedellä 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 bakteeritoimintaa,

— eivät merkitsevästi absorboidu käytetyssä testissä,

— eivät poistu testiliuoksesta vaahtoamisen vuoksi.

Testattavan aineen sisältämä orgaaninen hiili on määritettävä.

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),

$C_t$ = 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:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$\simeq \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

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.

## 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.

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.

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:tta.

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 ($D_{da}$ 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.

### 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.

*Lisäys 1*

**SCAS-testi: esimerkki tuloksista**

| Aine | $C_T$ (mg/l) | $C_t - C_c$ (mg/l) | Biologinen hajoamisprosentti, $D_{da}$ | Kokeen kesto (päiviä) |
|---|---|---|---|---|
| 4-asetyyliaminobentseenisulfonaatti | 17,2 | 2,0 | 85 | 40 |
| Tetrapropyleenibentseenisulfonaatti | 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 |

*Lisäys 2*

**Esimerkki koelaitteesta**

