II

(Muut kuin lainsäätämisjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset)

ASETUKSET

KOMISSION ASETUS (EU) N:o 260/2014,

annettu 24 päivänä tammikuuta 2014,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla annetun asetuksen (EY) N:o 440/2008 muuttamisesta sen mukauttamiseksi tekniikan kehitykseen

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta 18 päivänä joulukuuta 2006 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 ([1]) ja erityisesti sen 13 artiklan 3 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Komission asetuksessa (EY) N:o 440/2008 ([2]) vahvistetaan asetuksen (EY) N:o 1907/2006 soveltamiseksi käytettävät testimenetelmät, joilla määritellään aineiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja myrkyllisyys ympäristölle.

(2) On tarpeen muuttaa asetusta (EY) N:o 440/2008 OECD:n hiljattain hyväksymien uusien ja ajan tasalle saatettujen vaihtoehtoisten testimenetelmien sisällyttämiseksi siihen ensisijaisen tärkeänä pidettynä asiana, jotta koetarkoituksiin käytettävien eläinten määrää voitaisiin vähentää tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivin 2010/63/EU ([3]) ja kokeisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelua koskevien jäsenvaltioiden lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 24 päivänä marraskuuta 1986 annetun neuvoston direktiivin 86/609/ETY ([4]) mukaisesti.

(3) Mukautukseen sisältyy kaksi menetelmää fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien määrittämiseksi mukaan lukien ajantasaistettu testimenetelmä vesiliukoisuutta varten ja uusi jakaantumiskerrointa koskeva testimenetelmä, joka liittyy hitaasti hajoavien, biokertyvien ja myrkyllisten (PBT) aineiden arviointiin, neljä uutta ja yksi ajantasaistettu menetelmä ekomyrkyllisyyden sekä vaiheiden ja käyttäytymisen ympäristössä määrittämiseksi, yhdeksän menetelmää myrkyllisyyden ja muiden terveysvaikutusten määrittämiseksi, mukaan lukien neljä myrkyllisyyttä sisäänhengitettynä koskevaa testimenetelmää, joihin sisältyy kolmen menetelmän ajantasaistus ja yksi uusi menetelmä käytettyjen eläinten määrän vähentämiseksi ja vaikutusten arvioinnin parantamiseksi, toistetuilla annoksilla tehtävän 28 vuorokauden oraalisen myrkyllisyystutkimuksen ajantasaistettu testimenetelmä, jotta menetelmään voidaan sisällyttää hormonaalisia vaikutuksia koskevan arvioinnin muuttujat, ajantasaistettu toksikokinetiikan testimenetelmä, joka liittyy toksikologisten tutkimusten laatimiseen ja ymmärtämiseen sekä ajantasaistetut kroonisia ja karsinogeenisiä ominaisuuksia ja niiden yhdistelmiä koskevat testimenetelmät.

(4) Sen vuoksi asetusta (EY) N:o 440/2008 olisi muutettava.

(5) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat asetuksen (EY) N:o 1907/2006 133 artiklalla perustetun komitean lausunnon mukaiset,

([1]) EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.
([2]) EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1.
([3]) EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.
([4]) EYVL L 358, 18.12.1986, s. 1.

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite tämän asetuksen liitteen mukaisesti.

2 artikla

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

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 24 päivänä tammikuuta 2014.

Komission puolesta

Puheenjohtaja

José Manuel BARROSO

LIITE

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite seuraavasti:

1) Korvataan luku A.6 seuraavasti:

”A.6 **VESILIUKOISUUS**

JOHDANTO

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

ALUSTAVAT HUOMIOT

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

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

MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

4. Aineen vesiliukoisuus on sen kyllästyspitoisuus vedessä määrätyssä lämpötilassa.

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

VERTAILUKEMIKAALIT

6. Testiainetta tutkittaessa ei tarvitse käyttää vertailukemikaaleja.

MENETELMIEN KUVAUS

Testiolosuhteet

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

Alustava testi

8. Noin 0,1 g näytettä (kiinteät aineet on ensin jauhettava) pannaan lasilla suljettuun, 10 ml:n asteikolla varustettuun mittasylinteriin, johon lisätään asteittain suurenevia määriä huoneenlämpöistä vettä. Jokaisen vedenlisäyksen jälkeen seosta ravistetaan 10 minuuttia ja tarkistetaan silmämääräisesti, ettei liuokseen ole jäänyt liukenemattomia hiukkasia. Jos näyte tai sen osa jää liukenematta 10 ml:n vedenlisäyksen jälkeen, koetta on jatkettava 100 ml:n mittasylinterissä. Likimääräinen liukoisuus ilmenee jäljempänä olevasta taulukosta 1 sen vesimäärän alta, jonka lisäyksen jälkeen näyte on täysin liuennut. Jos liukoisuus on huono, testiaineen liukeneminen voi kestää kauan, ja sitä varten on odotettava vähintään 24 tuntia. Jos testiaine ei ole liuennut 24 tunnin kuluttua, on odotettava kauemmin (enintään 96 tuntia), tai liuosta on yritettävä laimentaa, jotta voitaisiin päättää, käytetäänkö kolonnieluutio- vai pullomenetelmää.

Taulukko 1

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

Kolonnieluutiomenetelmä

Periaate

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

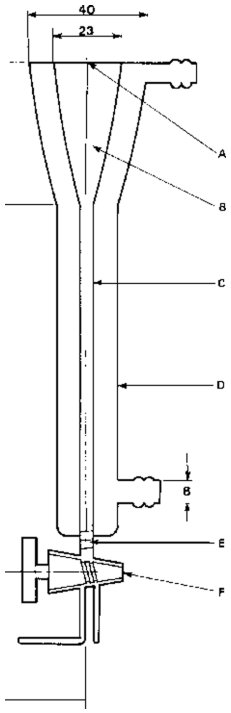
Laite

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

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

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

Kuva 1



Mitat millimetreinä

A. Lasihioksen liitäntä

B. Ylätila

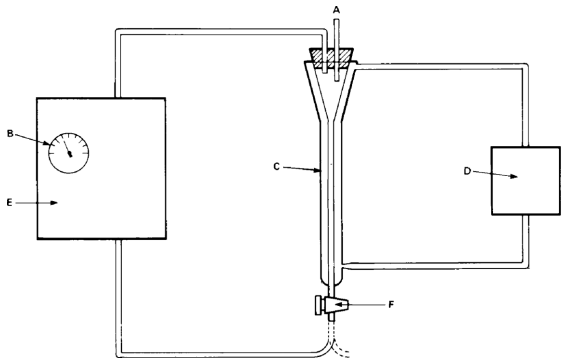
C. Sisätila 5

D. Ulkotila 19

E. Lasivillatulppa

F. Sulkuventtiili

Kuva 2



A. Paineen tasaus

B. Virtausmittari

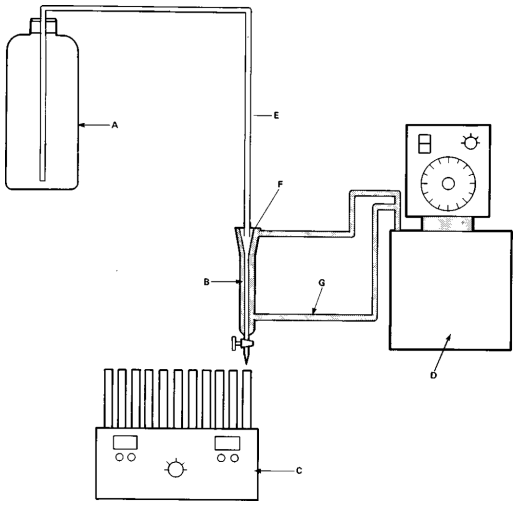
C. Mikrokolonni

D. Termostaatilla varustettu kiertopumppu

E. Kiertopumppu

F. Kaksitieventtiili näytteenottoa varten

Kuva 3



A. Tasausastia (esimerkiksi 2,5 litran pullo)

B. Kolonni

C. Fraktionkeräin

D. Termostaatti

E. Teflonputki

F. Lasihios

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

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

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

Mittauksen tekeminen kiertopumpun avulla

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

Mittauksen tekeminen tasausastian avulla

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

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

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

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

20. Jokaisen näytteen pH on mitattava ensisijaisesti erikoistestiliuskoja käyttämällä.

Pullomenetelmä

Periaate

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

Laite

22. Pullomenetelmää varten tarvitaan seuraavat osat:

— tavallisia laboratoriolaseja ja -instrumentteja

— laite, jolla liuoksia voidaan ravistaa säädetyissä vakiolämpötiloissa

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

— analyysilaitteet.

Mittauksen tekeminen

23. Alustavan testin avulla saadaan tieto halutun vesimäärän kyllästämiseen tarvittavasta ainemäärästä. Noin viisinkertainen määrä ainetta punnitaan kolmeen eri lasitulpalla varustettuun lasiastiaan (esimerkiksi sentrifugiputkiin tai pulloihin). Kuhunkin astiaan laitetaan analyysimenetelmän ja liukoisuusalueen mukaan valittu vesimäärä. Astiat suljetaan tiiviisti, ja niitä ravistetaan 30 °C:ssa. Tarkoitukseen käytetään ravistus- tai sekoitustapaa, jossa voidaan ylläpitää vakiolämpötilaa, esimerkiksi magneettisekoitusta termostaatilla varustetussa vesihauteessa). Vuorokauden kuluttua yksi astioista tasapainotetaan 24 tunnin aikana testilämpötilassa astiaa ajoittain ravistamalla. Astian sisältö lingotaan testilämpötilassa, ja testiaineen pitoisuus määritetään kirkkaasta vesifaasista sopivan analyyttisen menetelmän mukaisesti. Toista jäljellä olevaa astiaa käsitellään ensimmäisen 30 °C:ssa tapahtuneen tasapainotuksen jälkeen samalla tavoin kaksi vuorokautta ja toista astiaa kolme vuorokautta. Jos vähintään

kahdesta viimeksi käsitellystä astiasta mitatut pitoisuudet vaihtelevat enintään 15 prosenttia, testi hyväksytään. Jos astioista 1, 2 ja 3 saadut tulokset osoittavat nousevaa suuntausta, koko testi on toistettava pidempiä tasapainotusaikoja käyttäen.

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

25. Jokaisen näytteen pH on mitattava ensisijaisesti erikoistestiliuskoja käyttämällä.

Analyyttiset määritykset

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

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

Kolonnieluutiomenetelmä

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

Pullomenetelmä

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

Testiraportti

Kolonnieluutiomenetelmä

29. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

— alustavan testin tulokset

— kemiallinen identiteetti ja epäpuhtaudet (esipuhdistusvaihe, jos tarpeen)

— jokaisen näytteen pitoisuus, virtausnopeus ja pH

— jokaisen ajon vähintään viiden kyllästysalueelta otetun näytteen keskiarvot ja keskihajonnat

— kahden peräkkäisen ajon keskiarvo

— veden lämpötila kyllästysprosessin aikana

— analyysimenetelmä

— käytetyn kantaja-aineen luonne

— kantaja-aineen täyttö

— käytetty liuotin

— todisteet aineen mahdollisesta kemiallisesta epästabiliteetista testin aikana

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

Pullomenetelmä

30. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

— alustavan testin tulokset

— kemiallinen identiteetti ja epäpuhtaudet (esipuhdistusvaihe, jos tarpeen)

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

— jokaisen näytteen pH

— keskiarvo niistä eri astioista, joiden tulokset olivat yhteneviä

— testilämpötila

— analyyttinen menetelmä

— todisteet aineen mahdollisesta kemiallisesta epästabiliteetista testin aikana

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

KIRJALLISUUSVIITTEET

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

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

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

2) Lisätään luku A.23:

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

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 123 (2006). 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen (P_{ow}) arvot on määritetty tarkasti log P_{ow} 8,2 -arvoon asti hitaan sekoituksen menetelmällä (1). Näin ollen se on sopiva kokeellinen lähestymistapa erittäin hydrofobisten aineiden P_{ow}-arvon suoraan määrittämiseen.

2. Muita menetelmiä 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen (P_{ow}) määrittämistä varten ovat ravistuspullomenetelmä (2) sekä P_{ow}-arvon määrittäminen käänteisfaasi-HPLC:n retentiokäyttäytymisestä (3). Ravistuspullomenetelmä on altis virheille, mikä johtuu oktanolin mikropisaroiden siirtymisestä vesifaasiin. Suurenevien P_{ow}-arvojen yhteydessä näiden pisaroiden esiintyminen vesifaasissa johtaa siihen, että testiaineen pitoisuus vedessä arvioidaan liian suureksi Sen vuoksi tämän menetelmän käyttö on rajattu aineisiin, joiden log P_{ow} -arvo on pienempi kuin 4. Toinen menetelmä perustuu suoraan määritetyistä P_{ow}-arvoista saatuihin varmoihin tietoihin, jolloin HPLC-retentiokäyttäytymisen ja mitattujen P_{ow}-arvojen välinen suhde voidaan kalibroida. Saatavilla oli OECD:n ohjeluonnos ionisoituvien aineiden 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen määrittämiseen (4), mutta sitä ei tule enää käyttää.

3. Tämä testimenetelmä on kehitetty Alankomaissa. Tässä kuvattujen menetelmien tarkkuus on validoitu ja optimoitu laboratorioiden välisessä validointitutkimuksessa, johon osallistui 15 laboratoriota (5).

ALUSTAVAT HUOMIOT

Merkitys ja käyttö

4. Inerttien orgaanisten aineiden yhteydessä on löydetty erittäin merkittäviä suhteita 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimien (P_{ow}) ja niiden kaloihin kohdistuvan biokertyvyyden väliltä. Lisäksi on osoitettu, että P_{ow}-arvo korreloi kaloihin kohdistuvaan myrkyllisyyteen sekä kemikaalien imeytymiseen kiinteään ainekseen, kuten maaperään ja sedimentteihin. Viitteessä (6) on esitetty kattava yhteenveto näistä suhteista.

5. 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimen ja aineen muiden, ympäristömyrkyllisyyden ja kemian kannalta tärkeiden ominaisuuksien väliltä on määritetty monia erityyppisiä suhteita. Tämän vuoksi 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskertoimesta on tullut keskeinen parametri kemikaalien ympäristöriskien arvioinnissa sekä kemikaalien ympäristövaikutusten ennustamisessa.

Soveltamisala

6. Hitaan sekoituksen kokeen oletetaan vähentävän mikropisaroiden muodostumista 1-oktanolipisaroista vesifaasissa. Tämän vuoksi vesipitoisuutta, joka johtuu testiaineen tällaisiin pisaroihin liittyvistä molekyyleistä, ei arvioida liian suureksi. Näin ollen hitaan sekoituksen menetelmä sopii erityisesti sellaisten aineiden P_{ow}-arvon määrittämiseen, joiden oletetut log P_{ow} -arvot ovat vähintään 5, sillä tällaisten aineiden osalta ravistuspullomenetelmä (2) tuottaa helposti virheellisiä tuloksia.

MÄÄRITELMÄ JA YKSIKÖT

7. Aineen jakaantumiskerroin veden ja lipofiilisen liuottimen (1-oktanolin) välillä kuvastaa kemikaalin tasapainon jakaantumista kahden faasin välillä. Määritelmän mukaan veden ja 1-oktanolin välinen jakaantumiskerroin (P_{ow}) on testiaineen tasapainopitoisuuksien välinen suhde vedellä kyllästetyssä 1-oktanolissa (C_O) ja 1-oktanolilla kyllästetyssä vedessä (C_W).

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

Pitoisuuksien suhteena se on paljas luku. Yleensä se ilmoitetaan kymmenkantaisena logaritmina (log P_{ow}). P_{ow} on lämpötilasta riippuvainen, ja raportoiduissa tiedoissa on oltava myös mittauslämpötila.

MENETELMÄN PERIAATE

8. Jakaantumiskertoimen määritystä varten vesi, 1-oktanoli ja testiaine tasapainotetaan toistensa kanssa vakiolämpötilassa. Sen jälkeen määritetään testiaineen pitoisuudet kahdessa faasissa.

9. Kokeellisia vaikeuksia, jotka liittyvät mikropisaroiden muodostumiseen ravistuspullokokeen aikana, voidaan vähentää hitaan sekoituksen menetelmällä, jota tässä luvussa kuvataan. Hitaan sekoituksen menetelmässä vesi, 1-oktanoli ja testiaine tasapainotetaan termostaatilla varustetussa sekoitusreaktorissa. Faasien vaihtumista nopeutetaan sekoittamalla. Sekoittaminen saa aikaan rajatun turbulenssin, joka parantaa 1-oktanolin ja veden vaihtumista ilman, että mikropisaroita (1) muodostuu.

TESTIN SOVELTUVUUS

10. Koska muiden aineiden kuin testiaineen läsnäolo saattaa vaikuttaa testiaineen aktiivisuuskertoimeen, testiaine on testattava puhtaana aineena. 1-oktanoli-vesi-jakaantumiskerroinkoetta varten on käytettävä puhtainta kaupallisesti saatavilla olevaa ainetta.

11. Tätä menetelmää sovelletaan puhtaisiin aineisiin, jotka eivät dissosioidu tai assosioidu ja jotka eivät vaikuta merkittävästi pintojen väliseen toimintaan. Menetelmää voidaan käyttää tällaisten aineiden ja seosten 1-oktanoli-vesi-jakaantumissuhteen määrittämiseen. Kun menetelmää käytetään seosten yhteydessä, määritetyt 1-oktanoli-vesi-jakaantumissuhteet ovat ehdollisia, ja ne määräytyvät testatun seoksen kemiallisen koostumuksen ja vesifaasina käytetyn elektrolyytin koostumuksen mukaisesti. Lisävaiheita käyttämällä menetelmä soveltuu myös yhdisteiden dissosioimiseen tai assosioimiseen (12 kohta).

12. Koska dissosioituvien aineiden, kuten orgaanisten happojen ja fenoleiden, orgaanisten emästen ja organometallisten aineiden, 1-oktanoli-vesi-jakaantumiseen osallistuvassa vedessä ja 1-oktanolissa on monia tasapainotiloja, 1-oktanoli/vesi-jakaantumissuhde on ehdollinen, ja siihen vaikuttaa vahvasti elektrolyytin koostumus (7) (8). Sen vuoksi 1-oktanoli/vesi-jakaantumissuhteen määrittäminen edellyttää, että pH:ta ja elektrolyytin koostumusta seurataan kokeen aikana, ja niitä koskevat tiedot on raportoitava. Näiden jakaantumissuhteiden arvioinnissa on käytettävä asiantuntijoita. Sopivat pH-arvot on valittava dissosiaatiovakion (-vakioiden) arvoa käyttämällä, jotta jakaantumissuhde voidaan määrittää jokaista ionisaatiotilaa varten. Organometallisia yhdisteitä (8) käytettäessä on käytettävä ei-kompleksoivia puskureita. Kun otetaan huomioon nykyinen tietämys vesikemiasta (muodostumisvakiot, dissosiaatiovakiot), koeolosuhteet on valittava siten, että testiaineen spesifikaatio vesifaasissa voidaan arvioida. Ionivahvuuden on oltava sama kaikissa kokeissa, mikä saadaan aikaan käyttämällä taustaelektrolyyttiä.

13. Testattaessa aineita, joiden vesiliukoisuus on huono tai P_{ow}-arvo suuri, voi ilmetä ongelmia, sillä kun pitoisuudet vedessä ovat hyvin pieniä, niiden määrittäminen tarkasti on vaikeaa. Tässä testimenetelmäkuvauksessa annetaan myös ohjeita tämän ongelman ratkaisemiseen.

TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

14. Kemiallisten reagenssien on oltava analyysilaatua tai sitä puhtaampia. On suositeltavaa käyttää merkitsemättömiä, koostumukseltaan tunnettuja ja mieluiten vähintään 99-prosenttisen puhtaita testiaineita tai koostumukseltaan ja radiokemialliselta puhtaudeltaan tunnettuja radioaktiivisesti merkittyjä testiaineita. Jos merkkiaineiden puoliintumisajat ovat lyhyitä, on tehtävä hajoamiskorjauksia. Radioaktiivisesti merkittyjen testiaineiden yhteydessä on käytettävä kemiallisesti tarkkaa analyysimenetelmää, jotta voidaan varmistaa, että mitattu radioaktiivisuus liittyy suoraan testiaineeseen.

15. Arvio log P_{ow} -arvosta voidaan hankkia käyttämällä kaupallisesti saatavia ohjelmia, jotka on tarkoitettu log P_{ow} -arvon estimointiin, tai käyttämällä liukoisuuksien suhdetta kummassakin liuottimessa.

16. Testiaineesta on oltava seuraavat tiedot saatavilla ennen P_{ow}-arvon määrittämiseen tarkoitetun hitaan sekoituksen kokeen toteuttamista:

a) rakennekaava

b) sopivat analyysimenetelmät aineen pitoisuuden määrittämiseen vedessä ja 1-oktanolissa

c) ionisoituvien aineiden dissosiaatiovakio(t) (OECD:n ohje 112 (9))

d) vesiliukoisuus (10)

e) abioottinen hydrolyysi (11)

f) biologinen hajoavuus (12)

g) höyrynpaine (13).

MENETELMÄN KUVAUS

Välineet ja laitteet

17. Kokeeseen tarvitaan vakiolaboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

— magneettisekoittimia ja teflonpäällysteisiä magneettisekoitinsauvoja vesifaasin sekoittamista varten

— analyysivälineet, jotka soveltuvat testiaineen konsentraation määrittämiseen oletettuina pitoisuuksina

— sekoitusastia, jossa on hana pohjassa. Testiyhdisteen arvioidun log P_{ow} -arvon ja havaitsemisrajan (LOD:n) mukaan on harkittava samanmuotoisen, tilavuudeltaan yli litran suuruisen reaktioastian käyttämistä, jotta kemiallista erottelua ja analyysia varten saadaan riittävästi vettä. Tällöin vesiuutteen pitoisuudet ovat suurempia, jolloin analyyttinen määrittäminen on luotettavampaa. Lisäyksessä 1 on taulukko, jossa esitetään arviot tarvittavasta vähimmäismäärästä, yhdisteen havaitsemisraja, sen arvioitu log P_{ow} sekä sen vesiliukoisuus. Taulukko perustuu log P_{ow} -arvon ja oktanoli- ja vesiliukoisuuksien väliseen suhteeseen Pinsuwanin ja muiden mukaan (14):

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

kun

$SR = S_{oct}/S_w$ (yksikkönä molaarisuus);

sekä Lymanin (15) esittämään suhteeseen, joka liittyy vesiliukoisuuden ennustamiseen. Lisäyksessä 1 olevalla yhtälöllä laskettuja vesiliukoisuuksia on pidettävä alustavana arviona. Todettakoon, että käyttäjä voi laatia arvion vesiliukoisuudesta käyttämällä mitä tahansa suhdetta, jonka käyttäjä katsoo edustavan hydrofobisuuden ja liukoisuuden suhdetta paremmin. Esimerkiksi kiinteiden yhdisteiden osalta on suositeltavaa, että liukoisuuden ennustamisessa käytetään myös sulamispistettä. Kun käytetään muunnettua yhtälöä, on varmistettava, että oktanolissa liukoisuuden laskemisessa käytetty yhtälö on edelleen validi. Lisäyksessä 2 on kaaviokuva lasisesta sekoitusastiasta, jonka tilavuus on noin yksi litra. Lisäyksessä 2 olevan astian mittasuhteet ovat osoittautuneet suotuisiksi, ja ne on säilytettävä, jos käytetään erikokoista laitetta.

— On tärkeää, että lämpötila pidetään vakiona hitaan sekoituksen kokeen aikana jollakin tavalla.

18. Astioiden on oltava valmistettu inertistä materiaalista, jotta imeytyminen astian pintoihin on mahdollisimman vähäistä.

Testiliuosten valmisteleminen

19. P_{ow}-arvo on määritettävä puhtaimmalla 1-oktanolilla (vähintään + 99 prosenttia), jota on saatavilla kaupallisesti. 1-oktanolin puhdistaminen happo-, emäs- ja vesiuutolla ja sen jälkeinen kuivaaminen on suositeltavaa. 1-oktanolin puhdistamiseen voidaan käyttää myös tislausta. Puhdistettua 1-oktanolia käytetään testiaineiden standardiliuosten valmistamiseen. P_{ow}-arvon määrittämisessä käytettävän veden on oltava lasi- tai kvartsilaitteessa tislattua tai puhdistusjärjestelmästä hankittua. Myös HPLC-laatuista vettä voi käyttää. Tislattu vesi on suodatettava 0,22 mm:n suodattimen läpi, ja sokeanäytteillä on varmistettava, ettei konsentroiduissa uutteissa ole epäpuhtauksia, jotka voivat vaikuttaa testiaineeseen. Jos käytetään lasikuitusuodatinta, se on puhdistettava kuumentamalla sitä uunissa vähintään kolme tuntia 400 °C:ssa.

20. Molemmat liuottimet kyllästetään ennen koetta tasapainottamalla ne riittävän suuressa astiassa. Tämä tehdään sekoittamalla kaksifaasijärjestelmää hitaasti kahden päivän ajan.

21. Riittävä pitoisuus testiainetta valitaan ja liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä). 1-oktanoli-vesijakaantumiskerroin täytyy määrittää 1-oktanolin ja veden laimeissa liuoksissa. Sen vuoksi testiaineen pitoisuus saa olla kummassakin faasissa enintään 70 prosenttia sen liukoisuudesta, kun enimmäiskonsentraatio on 0,1 M (1). Kokeessa käytettävissä 1-oktanoliliuoksissa ei saa olla suspendoitunutta kiinteää testiainetta.

22. Riittävä pitoisuus testiainetta liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä). Jos log P_{ow} -arvon estimaatti on suurempi kuin viisi, on varmistettava huolella, ettei kokeessa käytetyissä 1-oktanoliliuoksissa ole suspendoitunutta kiinteää testiainetta. Tätä varten sovelletaan jäljempänä kuvattua menetelmää, joka koskee sellaisia kemikaaleja, joiden arvioitu log P_{ow} -arvo on suurempi kuin 5:

— Testiaine liuotetaan 1-oktanoliin (joka on kyllästetty vedellä).

— Liuoksen annetaan seistä riittävä aika, jotta suspendoitunut kiinteä aines saostuu. Testiaineen pitoisuutta seurataan saostumisen aikana.

— Kun 1-oktanoliliuoksesta mitattujen pitoisuuksien arvot ovat vakiintuneet, kantaliuos laimennetaan sopivalla määrällä 1-oktanolia.

— Laimennetun kantaliuoksen pitoisuus mitataan. Jos mitattu pitoisuus on yhdenmukainen laimennuksen kanssa, laimennettua kantaliuosta voidaan käyttää hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävässä kokeessa.

Näytteiden uutto ja analysointi

23. Testiaineen määrityksissä on käytettävä validoitua analyysimenetelmää. Tutkijoiden on esitettävä todisteet siitä, että pitoisuudet vedellä kyllästetyssä 1-oktanolissa ja 1-oktanolilla kyllästetyssä vesifaasissa ovat kokeen aikana käytettyjen analyysimenetelmien määritysrajaa suuremmat. Testiaineen saanto on analysoitava vesifaasista ja 1-oktanolifaasista ennen kokeen suorittamista niissä tapauksissa, joissa tarvitaan uuttomenetelmiä. Analyyttiset signaalit on korjattava nollakokeita varten, ja on syytä varmistaa, ettei yhdestä näytteestä peräisin oleva analyytti voi kontaminoida toista analyyttia.

24. Vesifaasin uutto orgaanisella liuottimella ja uutteen esikonsentrointi on todennäköisesti tarpeen ennen analyysia, koska hydrofobisten testiaineiden pitoisuudet ovat melko pienet vesifaasissa. Samasta syystä mahdollisten nollanäytteiden pitoisuuksia täytyy pienentää. Siinä on käytettävä erittäin puhtaita liuottimia, ensisijaisesti sellaisia, jotka on tarkoitettu jäämien analysointiin. Myös työskentely huolellisesti esipuhdistetuilla (esimerkiksi liuotinpesulla tai korkeassa lämpötilassa kuumentamalla) lasivälineillä voi auttaa välttämään ristikontaminaatiota.

25. Estimaatti log P_{ow} -arvosta voidaan hankkia estimointiohjelman tai asiantuntija-arvion avulla. Jos arvo on suurempi kuin kuusi, nollakokeen korjauksia ja analyyttien siirtymistä on seurattava tiiviisti. Vastaavasti myös silloin, kun log P_{ow} -arvo on suurempi kuin kuusi, standardin (surrogaatin) käyttäminen saannon korjaamisessa on pakollista suurten esikonsentrointikertoimien saavuttamiseksi. Saatavilla on kaupallisia ohjelmia log Pow -arvon estimointiin ([1]), esimerkiksi Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) ja ACD log P (19). Erilaisia estimointitapoja on kuvattu viitteissä (20–22).

([1]) Näiden tietojen tarkoituksena on vain helpottaa käyttäjän työtä. Muita vastaavia tietokoneohjelmia voi käyttää, jos voidaan osoittaa, että ne antavat samat tulokset.

26. Testiaineen pitoisuuden määrittämisessä 1-oktanolissa ja vedessä käytettävät määritysrajat (LOQ) selvitetään hyväksytyillä menetelmillä. Pääsääntö on se, että määritysraja voidaan määrittää sellaiseksi pitoisuudeksi vedessä tai 1-oktanolissa, joka tuottaa signaali-kohinasuhteeksi kymmenen. On valittava sopiva uutto- ja esikonsentrointimenetelmä, ja myös analyyttiset saannot on täsmennettävä. On valittava myös sopiva esikonsentrointikerroin, jotta analyyttisen määrityksen perusteella saadaan vaaditun kokoinen signaali.

27. Analyysimenetelmän parametrien ja oletettujen pitoisuuksien perusteella määritetään likimääräinen näytekoko, jota yhdisteen pitoisuuden tarkka määrittäminen edellyttää. On vältettävä käyttämästä sellaisia vesinäytteitä, jotka ovat liian pieniä riittävän analyyttisen signaalin tuottamiseksi. Toisaalta myös liian suurten vesinäytteiden käyttämistä on vältettävä, koska muuten voi jäädä liian vähän vettä käytettäväksi vaadittujen analyysien vähimmäismäärän toteuttamiseksi (n = 5). Lisäyksessä 1 vähimmäisnäytemäärä on ilmoitettu astian tilavuuden, testiaineen havaitsemisrajan ja testiaineen liukoisuuden funktiona.

28. Testiaineiden kvantifiointi tehdään vertailemalla kunkin yhdisteen kalibrointikäyriä. Analysoitujen näytteiden pitoisuuksien on oltava standardien pitoisuusalueella.

29. Sellaisten testiaineiden osalta, joiden log P_{ow} -estimaatti on suurempi kuin kuusi, surrogaattistandardi on lisättävä vesinäytteeseen ennen uuttoa, jotta voidaan kirjata vesinäytteiden uuton ja esikonsentroinnin aikana tapahtuvat hävikit. Jotta saanto voidaan korjata tarkasti, surrogaateilla on oltava hyvin samankaltaiset tai identtiset ominaisuudet kuin testiaineella. Tähän tarkoitukseen on käytettävä ensisijaisesti (vakaita) kyseisten aineiden isotooppimerkittyjä analogeja (esimerkiksi deuteroituja tai ^{13}C-leimattuja). Jos leimattuja vakaita isotooppeja, kuten ^{13}C:ta tai ^{2}H:ta ei voida käyttää, on osoitettava luotettavien kirjallisuustietojen perusteella, että surrogaatin fysikaaliskemialliset ominaisuudet ovat hyvin samanlaiset kuin testiaineen. Vesifaasin neste-neste-uuton aikana voi muodostua emulsioita. Sitä voidaan vähentää lisäämällä suolaa ja antamalla emulsion seistä yön yli. Näytteiden uuttoon ja esikonsentrointiin käytetyt menetelmät on ilmoitettava.

30. 1-oktanolifaasista otetut näytteet voi tarvittaessa laimentaa sopivalla liuottimella ennen analyysia. Lisäksi on suositeltavaa käyttää surrogaattistandardeja saannon korjaamiseen sellaisten aineiden yhteydessä, joiden saantokokeet osoittivat, että kokeissa esiintyy suurta vaihtelua (suhteellinen keskihajonta > 10 %).

31. Analyysimenetelmä on kuvattava yksityiskohtaisesti. Tähän sisältyvät uuttomenetelmä, esikonsentrointi ja laimennuskertoimet, instrumenttiparametrit, kalibrointirutiini, kalibrointialue, testiaineen saanto vedestä analysoituna, saannon korjaamiseksi lisätyt surrogaattistandardit, nollanäytteet, havaitsemisraja ja määritysrajat.

Testin suorittaminen

Optimaaliset 1-oktanolin ja veden tilavuuden suhteet

32. Valittaessa veden ja 1-oktanolin tilavuuksia on otettava huomioon määritysraja l-oktanolissa ja vedessä, vesinäytteisiin sovelletut esikonsentrointikertoimet, 1-oktanolista ja vedestä kerättyjen näytteiden määrä sekä odotuksenmukaiset pitoisuudet. Kokeeseen liittyvistä syistä 1-oktanolin tilavuus hitaan sekoituksen menetelmässä on valittava siten, että 1-oktanolikerros on riittävän paksu (> 0,5 cm), jotta 1-oktanolifaasista voidaan ottaa näyte häiritsemättä sitä.

33. Tyypilliset faasien tilavuudet, joita käytetään sellaisten yhdisteiden määrityksissä, joiden log P_{ow} -arvot ovat vähintään 4,5, ovat 20–50 ml 1-oktanolia ja 950–980 ml vettä yhden litran astiassa.

Testiolosuhteet

34. Testin aikana reaktioastiaa säädellään termostaatilla, jotta lämpötilan vaihtelu voidaan pitää pienempänä kuin 1 °C. Testi on tehtävä 25 °C:n lämpötilassa.

35. Koejärjestelmä on suojattava päivänvalolta joko tekemällä koe pimeässä huoneessa tai peittämällä reaktioastia alumiinifoliolla.

36. Koe on tehtävä pölyttömässä ympäristössä (mikäli mahdollista).

37. 1-oktanoli-vesi-järjestelmää sekoitetaan, kunnes tasapainotila saavutetaan. Pilottikokeessa tasapainotilan saavuttamiseen kuluvaa aikaa arvioidaan toteuttamalla hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävä koe ja ottamalla säännöllisesti näytteitä vedestä ja 1-oktanolista. Näytteet on otettava vähintään viiden tunnin mittaisen ajanjakson aikana.

38. Jokainen P_{ow}-arvo on määritettävä käyttämällä vähintään kolmea toisistaan riippumatonta hitaan sekoituksen menetelmällä tehtävää koetta.

Tasapainotilan saavuttamisajan määrittäminen

39. Tasapainotila oletetaan saavutetuksi, kun 1-oktanolin ja veden pitoisuussuhde aikaan nähden neljän aikapisteen pituisella ajanjaksolla tuottaa tulokseksi kulmakertoimen, joka ei eroa merkittävästi nollasta, kun p = 0,05. Tasapainotilan saavuttamisessa vähimmäisaika on yksi päivä, ennen kuin näytteenoton voi aloittaa. Pääsääntö on se, että sellaisista aineista, joiden log P_{ow} -estimaatti on pienempi kuin viisi, voidaan ottaa näytteitä toisena ja kolmantena päivänä (päivät 2 ja 3). Tavallista hydrofobisempien yhdisteiden kohdalla tasapainotilan saavuttaminen saattaa kestää kauemmin. Yhdisteellä, jonka log P_{ow} -arvo oli 8,23 (dekaklorobifenyyli), tasapainotilan saavuttaminen kesti 144 tuntia. Tasapainotilaa arvioidaan ottamalla jokaisesta astiasta toistuvasti näytteitä.

Kokeen aloittaminen

40. Kokeen alussa reaktioastia täytetään 1-oktanolilla kyllästetyllä vedellä. Termostaatilla säädetyn lämpötilan saavuttamiseen on varattava riittävästi aikaa.

41. Haluttu määrä testiainetta (joka on liuotettu tarvittavaan määrään vedellä kyllästettyä 1-oktanolia) lisätään reaktioastiaan varovasti. Tämä on tärkeä vaihe kokeessa, koska on vältettävä sekoittamasta näitä kahta faasia siten, että syntyy pyörteisyyttä. Sitä varten 1-oktanolifaasi voidaan pipetoida hitaasti koeastian seinää vasten lähellä veden pintaa. Se valuu hitaasti lasiseinää pitkin ja muodostaa kalvon vesifaasin yläpuolelle. 1-oktanolin dekantointia suoraan pulloon on aina vältettävä, sillä 1-oktanolipisaroita ei saa tippua suoraan veteen.

42. Sekoittamisen aloituksen jälkeen sekoitusnopeutta on lisättävä hitaasti. Jos sekoitusmoottoreita ei voida säätää asianmukaisesti, on harkittava muuntajan käyttöä. Sekoitusnopeutta on mukautettava siten, että veden ja 1-oktanolin yhtymäkohtaan muodostuu vortex-ilmiö, jonka syvyys on vähintään 0,5 cm ja enintään 2,5 cm. Sekoitusnopeutta on pienennettävä, jos vortex-ilmiön syvyys ylittää 2,5 cm. Muutoin 1-oktanolipisaroista saattaa muodostua vesifaasiin mikropisaroita, jolloin testiaineen pitoisuus vedessä arvioidaan liian suureksi. Laboratorioiden välisen validointitutkimuksen (5) löydösten perusteella enimmäissekoitusnopeudeksi suositellaan 2,5 cm:ä. Se on kompromissi, jolla varmistetaan nopea tasapainottuminen ja rajoitetaan 1-oktanolin mikropisaroiden muodostumista.

Näytteenotto ja näytteiden käsittely

43. Sekoitin on kytkettävä pois päältä ennen näytteenottoa, ja nesteiden liikkeen on annettava pysähtyä. Kun näytteet on otettu, sekoitin käynnistetään uudelleen hitaasti edellä kuvatun mukaisesti, ja sekoitusnopeutta lisätään vähitellen.

44. Vesifaasin näyte otetaan reaktioastian pohjassa olevan venttiilin kautta. Poista aina hanoissa oleva kuollut tilavuus vettä (lisäyksessä 2 kuvatussa astiassa noin 5 ml). Hanoissa olevaa vettä ei sekoiteta, joten se ei ole tasapainossa bulkin kanssa. Merkitse vesinäytteiden tilavuus ylös ja varmista, että poisheitetyssä vedessä olleen testiaineen määrä otetaan huomioon massatasetta laskettaessa. Haihtumishäviöt on minimoitava antamalla veden virrata hitaasti erotussuppiloon siten, ettei siitä aiheudu vesi-/1-oktanolikerrokseen kohdistuvaa häiriötä.

45. 1-oktanolinäytteet hankitaan ottamalla pieni alikvootti (noin 100 µl) 1-oktanolikerroksesta 100 mikrolitran lasikuitu-metalliruiskulla. Näyte on otettava varovasti siten, ettei rajakohta rikkoudu. Näytenesteen tilavuus merkitään muistiin. Pieni alikvootti riittää, koska 1-oktanolinäyte laimennetaan.

46. Näytteen käsittelyssä on vältettävä tarpeettomia siirtovaiheita. Sitä varten näytteen tilavuus on määritettävä gravimetrisesti. Vesinäytteiden osalta se voidaan tehdä keräämällä vesinäyte erotussuppiloon, jossa jo on tarvittava määrä liuotinta.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

47. Nykyisen testimenetelmän mukaan P_{ow}-arvo määritetään tekemällä tutkittavalla yhdisteellä kolme hitaan sekoituksen koetta (kolme kokeellista yksikköä), joissa käytetään identtisiä olosuhteita. Tasapainotilan saavuttamisen osoittamisessa käytettävän regression on perustuttava vähintään neljän peräkkäisistä aikapisteistä tehtyjen Co-/Cw-määrityksen tuloksiin. Näin voidaan laskea varianssi kustakin kokeellisesta yksiköstä saadun keskiarvon epävarmuuden mittana.

48. P_{ow}-arvoa voidaan luonnehtia kustakin kokeellisesta yksiköstä saatujen tietojen varianssilla. Tämän tiedon avulla lasketaan P_{ow}-arvo yksittäisten kokeellisten yksikköjen tulosten painotettuna keskiarvona. Sitä varten painona käytetään kokeellisten yksikköjen tulosten varianssin käänteislukua. Tällä tavalla tiedot, joiden variaatio (joka ilmaistaan varianssina) on suuri ja jotka ovat siten vähemmän luotettavia, vaikuttavat tulokseen vähemmän kuin tiedot, joiden varianssi on pieni.

49. Samalla tavalla lasketaan painotettu keskihajonta. Se kuvaa P_{ow}-mittauksen toistettavuutta. Jos painotetun keskihajonnan arvo on pieni, se tarkoittaa, että P_{ow}-arvon määrittämisen toistettavuus oli hyvä yhdessä laboratoriossa. Tietojen muodollista tilastollista käsittelyä selostetaan jäljempänä.

Tulosten käsittely

Tasapainotilan saavuttamisen osoittaminen

50. Testiaineen pitoisuuden suhteen logaritmi 1-oktanolissa ja vedessä (log (C_O/C_w)) lasketaan jokaiselta näytteenottokerralta. Kemiallisen tasapainotilan saavuttaminen osoitetaan esittämällä tämä suhde aikaan nähden. Tässä esitystavassa tasanne, joka perustuu vähintään neljään peräkkäiseen aikapisteeseen, osoittaa, että tasapainotila on saavutettu ja että yhdiste on liuennut 1-oktanoliin. Jos näin ei ole, testiä on jatkettava, kunnes neljä peräkkäistä aikapistettä antavat tulokseksi kulmakertoimen, joka ei eroa nollasta huomattavasti p-tason ollessa 0,05, mikä tarkoittaa sitä, että log C_o/C_w ei riipu ajasta.

Log P_{ow} -arvon laskeminen

51. Kokeellisen yksikön log P_{ow} -arvo lasketaan log C_o/C_w -arvon painotettuna keskiarvona log C_o/C_w -käyrän osalle siihen aikaan nähden, jonka osalta tasapainotila on osoitettu saavutetuksi. Painotettu keskiarvo lasketaan painottamalla tietoja varianssin käänteisluvulla, jotta tietojen vaikutus lopputulokseen on käänteisessä suhteessa tietojen epävarmuuteen.

Log P_{ow} -arvon keskiarvo

52. Eri kokeellisten yksiköiden log P_{ow} -arvojen keskiarvo lasketaan yksittäisten kokeellisten yksikköjen tulosten, joita on painotettu niiden variansseilla, keskiarvona.

Keskiarvo lasketaan seuraavan kaavan mukaan:

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

jossa

$\log P_{OW,i}$ = yksittäisen kokeellisen yksikön i log P_{ow} -arvo

$\log P_{OW,Av}$ = yksittäisten log P_{ow} -arvojen painotettu keskiarvo

w_i = kokeellisen yksikön I log P_{ow}-arvolle osoitettu tilastollinen paino.

Log $P_{OW,i}$ -arvon varianssin käänteislukua käytetään muodossa w_i ($w_i = \mathrm{var}\ (\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Log P_{ow} -arvojen keskiarvon virhe arvioidaan yksittäisten kokeellisten yksiköiden tasapainotilan saavuttamisen vaiheessa määritetyn log C_o/C_w -arvon toistettavuutena. Se ilmaistaan log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) -arvon painotettuna keskihajontana, joka taas on log $P_{OW,Av}$ -arvoon liittyvän virheen mitta. Painotettu keskihajonta voidaan laskea painotetusta varianssista ($\mathrm{var}_{\log Pow,Av}$) seuraavasti:

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

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\mathrm{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Symboli n tarkoittaa kokeellisten yksiköiden lukumäärää.

Testiraportti

54. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testiaine:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava (josta käy ilmi leiman sijainti käytettäessä radioaktiivista merkkiainetta) ja merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (katso 17 kohta)

— testiaineen puhtaus (epäpuhtaudet)

— merkkiaineella leimatun kemikaalin leiman puhtaus ja molaarinen aktiivisuus (tapauksen mukaan)

— alustava arvio log P_{ow} -arvosta sekä arvon johtamisesssa käytetty menetelmä.

Testiolosuhteet:

— testien suorituspäivämäärät

— lämpötila testin aikana

— 1-oktanolin ja veden tilavuudet testin alussa

— otettujen 1-oktanoli- ja vesinäytteiden tilavuudet

— 1-oktanolin ja veden jäljelle jääneet tilavuudet testiastioissa

— käytettyjen testiastioiden ja sekoitusolosuhteiden kuvaus (sekoitussauvan ja testiastian geometria, vortex-ilmiön korkeus millimetreinä ja sekoitusnopeus, jos saatavilla)

— testiaineen ja määritysrajan määrittämisessä käytetyt analyysimenetelmät

— näytteenottokertojen määrä

— vesifaasin ja käytettyjen puskuriliuosten pH, kun pH:ta on muutettu ionisoituneita molekyylejä varten

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— käytettyjen analyysimenetelmien toistettavuus ja herkkyys

— testiaineen määritetyt pitoisuudet 1-oktanolissa ja vedessä ajan funktiona

— massataseen osoittaminen

— lämpötila ja keskihajonta tai lämpötilan vaihteluväli kokeen aikana

— pitoisuussuhteen regressio ajan suhteen

— keskiarvo log $P_{ow,Av}$ ja sen keskivirhe

— tulosten pohdinta ja tulkinta

— esimerkkejä edustavan analyysin mittaustuloksista (kaikki mittaustulokset on tallennettava hyvää laboratorio-käytäntöä koskevien periaatteiden mukaisesti), mukaan luettuina surrogaattien saannot, sekä kalibroinnissa käytettyjen tasojen määrä (ja kalibrointikäyrän korrelaatiokerrointa koskevat kriteerit) ja laadunvarmistuksen/laadunvalvonnan tulokset

— jos saatavilla: koemenettelyn validointiraportti (merkitään kirjallisuusviitteisiin).

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499–512.

2) Tämän liitteen luku A.8 Jakaantumiskerroin.

3) Tämän liitteen luku A.8 Jakaantumiskerroin.

4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.

9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

10) Tämän liitteen luku A.6 Vesiliukoisuus.

11) Tämän liitteen luku C.7 Hajoaminen – Abioottinen hajoaminen: Hydrolyysi pH:n funktiona.

12) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys – Osat II–VII (menetelmät A–F).

13) Tämän liitteen luku A.4 Höyrynpaine.

14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.

15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2–1 ja 2–52.

16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.

22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

Lisäys 1

Laskentataulukko: sellaisten testiaineiden, joilla on erilaiset log P_{OW} -arvot vesifaasissa, havaitsemisessa tarvittavien vähimmäisvesimäärien laskeminen

Oletukset:

— Yksittäisten alikvoottien enimmäistilavuus = 10 prosenttia kokonaistilavuudesta, viisi alikvoottia = 50 prosenttia kokonaistilavuudesta.

— Testiaineiden pitoisuus = 0,7 × liukoisuus kummassakin faasissa. Jos pitoisuudet ovat alhaisempia, on käytettävä suurempia määriä.

— Havaitsemisrajan määrityksessä käytetty tilavuus = 100 ml.

— log P_{ow} vs. log S_w ja log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) edustavat testiaineiden suhteita riittävästi.

Estimaatti S_w

log P_{ow}	Kaava	log S_w	S_w (mg/l)
4	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	0,496	3,133E+00
4,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	0,035	1,084E+00
5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 0,426	3,750E-01
5,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 0,887	1,297E-01
6	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 1,348	4,487E-02
6,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 1,809	1,552E-02
7	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 2,270	5,370E-03
7,5	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 2,731	1,858E-03
8	(–)0,922 × log P_{ow} + 4,184	– 3,192	6,427E-04

Estimaatti S_{oct}

log P_{ow}	Kaava	S_{oct} (mg/l)
4	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,41	3,763E+04
4,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,42	4,816E+04
5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,43	6,165E+04
5,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,44	7,890E+04
6	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,45	1,010E+05
6,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,46	1,293E+05
7	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,47	1,654E+05
7,5	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,48	2,117E+05
8	log P_{ow} = 0,88log SR + 0,49	2.710E+05

Testiaineen kokonaismassa (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

Testiaineen kokonaismassa (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Tilavuuksien laskeminen

H_2O-faasiin tarvittava vähimmäistilavuus kussakin LOD-pitoisuudessa

log K_{ow}	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
LOD:n yhteydessä käytetty tilavuus (l)	0,1					

Laskentaohjeet

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 1 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 2 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 5 litran tasapainotusastia.

Edustaa alle 10:tä prosenttia vesifaasin kokonaistilavuudesta, 10 litran tasapainotusastia.

Ylittää 10 prosenttia myös 10 litran tasapainotusastian yhteydessä.

Yhteenveto tarvittavista tilavuuksista vesiliukoisuuden ja log P_{ow} -arvon funktiona

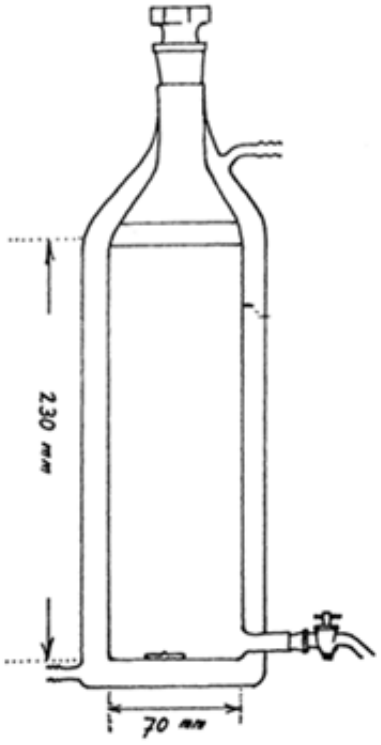
H_2O-faasiin tarvittava vähimmäistilavuus kussakin LOD-pitoisuudessa (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogrammaa/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
LOD:n yhteydessä käytetty tilavuus (l)		0,1					

Lisäys 2

Esimerkki lasisesta testiastiasta P_{OW} -arvon määrittämistä varten tarkoitettuun hitaan sekoituksen kokeeseen



”

3) Korvataan luku B.2 seuraavasti:

”B.2 **AKUUTTI MYRKYLLISYYS (HENGITETTYNÄ)**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 403 (2009) (1). Alkuperäinen akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskeva testiohje nro 403 (TG 403) hyväksyttiin 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.2 (joka vastaa tarkistettua testiohjetta nro 403) tarkoituksena on lisätä joustavuutta, vähentää eläinten käyttöä ja täyttää sääntelyvaatimukset. Tarkistetussa testimenetelmässä on kaksi erityyppistä tutkimusta: perinteinen LC_{50}-protokolla ja pitoisuus × aika (C × t) -protokolla. Eräs tämän testimenetelmän tärkeimpiä ominaisuuksia on se, että sillä voidaan tuottaa pitoisuus-vaste-suhde, joka vaihtelee ei-tappavasta tappavaan. Sen perusteella voidaan johtaa mediaani tappava pitoisuus (LC_{50}), ei-tappavan pitoisuuden raja (esimerkiksi LC01) ja kulmakerroin. Lisäksi sen avulla voidaan tunnistaa mahdollinen sukupuoleen liittyvä herkkyys. C × t -protokollaa on käytettävä silloin, kun on sellainen erityinen sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve, jonka vuoksi eläimiä on testattava eripituisia aikoja. Tällaisia tarkoituksia ovat esimerkiksi hätäavun suunnittelu [esimerkiksi akuutin altistuksen ohjearvojen (AEGL-arvojen), hätäavun suunnitteluohjeiden (ERPG) tai akuuttien altistumisraja-arvojen (AETL-arvojen) johtamiseksi], tai maankäytön suunnittelu.

2. Tämän testimenetelmän mukaisten tutkimusten toteuttamista ja tulosten tulkintaa koskevat ohjeet ovat akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

3. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

4. Tämän testimenetelmän avulla voidaan toteuttaa testattavan kemikaalin luonnehdinta ja määrällinen riskinarviointi, ja testikemikaalit voidaan myös lajitella ja luokitella asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (3) mukaisesti. Ohjeasiakirja GD 39 (2) sisältää ohjeita akuuttia testausta varten tarvittavan asianmukaisen testimenetelmän valintaan. Kun tarvitaan vain luokitukseen ja merkintöihin liittyvää tietoa, on suositeltavaa lukea tämän liitteen (4) luku B.52 [katso GD 39 (2)]. Tätä testimenetelmää B.2 ei ole varsinaisesti tarkoitettu erikoismateriaalien, kuten huonosti liukenevien isometristen tai kuituisten materiaalien taikka teollisesti valmistettujen nanomateriaalien testaukseen.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Ennen tämän testimenetelmän mukaista testausta testauslaboratorion on hankittava kaikki saatavilla olevat tiedot testikemikaalista, mukaan luettuina olemassa olevat tutkimukset (esimerkiksi tämän liitteen luku B.52 (4)). Niistä saatavat tiedot mahdollisesti tukevat lisätestien tekemättä jättämistä, jotta eläinten käyttö voidaan minimoida. Tietoihin, joista voi olla apua sopivimman lajin, kannan, sukupuolen, altistustavan ja asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testikemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa olevat käytöt ja ihmisten altistumisen mahdollisuus sekä saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista [katso GD 39 (2)].

6. Syövyttävien ja/tai ärsyttävien testikemikaalien testausta sellaisina pitoisuuksina, joiden oletetaan aiheuttavan kovia tuskia tai stressiä, on vältettävä, mikäli mahdollista. Mahdollista syövyttävää/ärsyttävää vaikutusta on arvioitava asiantuntija-arvioiden avulla, ja arvion on perustuttava ihmisistä ja eläimistä kertyneeseen kokemukseen (esimerkiksi ei-syövyttävillä/ärsyttävillä pitoisuuksilla tehdyt toistuvan annostelun tutkimukset), olemassa oleviin *in vitro* -tietoihin (esimerkiksi tämän liitteen luvut B.40 (5) ja B.40a (6) tai OECD:n ohje TG 435 (7)), pH-arvoihin, samankaltaisia aineita koskeviin tietoihin tai muihin asiaankuuluviin tietoihin, jotta voidaan selvittää, voidaanko lisätestit jättää tekemättä. Tiettyjä sääntelyvaatimuksia (esimerkiksi hätäavun suunnittelutarkoituksia) varten tätä testimenetelmää voidaan käyttää eläinten altistamiseen tällaisille materiaaleille, koska näin tutkimuksen johtajalla tai päätutkijalla on mahdollisuus valita tavoitepitoisuudet. Tavoiteltujen pitoisuuksien ei tule aiheuttaa vakavia ärsyttäviä tai syövyttäviä vaikutuksia, mutta niiden on kuitenkin oltava riittävät, jotta saavutetaan sellaisia pitoisuus-vastesuhteita, joilla voidaan täyttää testin sääntelyyn liittyvät ja tieteelliset tavoitteet. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja pitoisuuden valinnalle on esitettävä myös perustelut [katso GD 39 (2)].

TESTIN PERIAATE

7. Tämän testimenetelmän B.2 tarkoituksena on tuottaa tarpeeksi tietoa testikemikaalin akuutista myrkyllisyydestä, jotta se voidaan luokitella, sekä tietoa aineen tappavuudesta (esimerkiksi $LC_{50,}$ LC_{01} ja kulmakerroin) toisen tai kummankin sukupuolen kannalta sen mukaan, mikä on tarpeen määrällisissä riskinarvioinneissa. Tämä testimenetelmä koostuu kahdesta menetelmästä. Ensimmäinen menetelmä on perinteinen protokolla, jossa eläinryhmät altistetaan rajapitoisuudelle (rajatesti) tai pitoisuuksien sarjalle vaiheittaisessa menettelyssä, jonka kestoksi on yleensä määritetty neljä tuntia. Myös muunpituisia altistuksia voidaan soveltaa tiettyihin sääntelytarkoituksiin. Toinen menetelmä on C × t -protokolla, jossa eläinryhmät altistetaan yhdelle pitoisuudelle (rajapitoisuus) tai sarjalle useita pitoisuuksia eripituisiksi ajoiksi.

8. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa 19 (8) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

9. On käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Suositeltavin laji on rotta, ja jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

10. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Altistuspäivänä on käytettävä 8–12 viikon ikäisiä nuoria aikuisia eläimiä, joiden ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia aiemmin altistettujen samanikäisten eläinten keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Eläimet on totutettava myös testilaitteistoon vähän ennen testausta, sillä se vähentää uuteen ympäristöön tutustumisesta aiheutuvaa stressiä.

Eläinten hoito

11. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta

testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

Inhalaatiokammiot

12. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistumistapa on vain nasaalisesti (tähän termiin kuuluvat myös altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti ja koko kehon kautta tapahtuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

13. Vain nasaalisesti -altistukset rotilla voivat kestää enintään kuusi tuntia. Jos hiiriä altistetaan vain nasaalisesti, altistusten kesto ei tavallisesti saa ylittää neljää tuntia. Jos tarvitaan pitempään kestäviä tutkimuksia, on esitettävä perustelut [katso GD 39 (2)]. Eläimille, joita altistetaan aerosoleille koko kehon kammioissa, on järjestettävä oma häkki sen estämiseksi, etteivät muut häkissä olevat eläimet niele testikemikaalia, kun ne nuolevat toistensa turkkia. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

14. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti.

Hiukkaskokojakauma

15. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–4 µm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (2) (9) (10). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset, kuidut ja hygroskooppiset materiaalit (joiden koko kasvaa hengitystie-elimistön kosteassa ympäristössä) voivat olla vaatimusta suurempia.

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

16. Jotta ilmakehään saadaan testikemikaalista sopiva pitoisuus ja hiukkaskoko, voidaan käyttää kantaja-ainetta. Pääsääntöisesti on käytettävä vettä. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti vaaditun hiukkaskokojakauman saavuttamiseksi, mutta se on tehtävä varovasti, jotta testikemikaali ei hajoa tai muutu. Jos mekaanisen prosessin oletetaan muuttaneen testikemikaalin koostumusta (esimerkiksi kitkan vuoksi liiallisen jauhamisen aiheuttamat hyvin korkeat lämpötilat), testikemikaalin koostumus on varmennettava analyyttisesti. Riittäviä varotoimia on noudatettava, jotta testikemikaali ei kontaminoidu. Murenemattomia raemateriaaleja, jotka on tarkoituksella valmistettu sellaisiksi, ettei niitä voi hengittää, ei tarvitse testata. Hankauskoe on tehtävä sen osoittamiseksi, ettei raemaisen materiaalin käsittelyssä synny hengitettäviä hiukkasia. Jos hankauskoe tuottaa hengitettäviä aineita, on tehtävä hengityksen kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä koskeva testi.

Verrokkieläimet

17. Samanaikaista negatiivista (ilma-) verrokkiryhmää ei tarvita. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineverrokkiryhmää on käytettävä ainoastaan silloin, kun saatavilla ei ole aiempia tietoja sisäänhengityksen kautta aiheutuvasta myrkyllisyydestä. Jos kantaja-aineessa valmistellun testikemikaalin myrkyllisyystutkimus osoittaa, ettei kemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa, että kantaja-aine on myrkytön testattuna pitoisuutena, joten kantaja-aineverrokkia ei tarvita.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

18. Ilman virtausta kammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai stabiiliuden) seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia parametreja, joita tarvitaan ilmakehän tuottamiseen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisen altistuksen kammioissa niissä tapauksissa,

kun altistusjärjestelmän läpi kulkeva ilmavirtaus ei riitä tuottamaan dynaamista testikemikaali-ilmakehän virtaa. On tiettyjä menetelmiä, joiden avulla voidaan osoittaa, ettei valituissa toimintaolosuhteissa tapahdu uudelleenhengittämistä (2) (11). Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

19. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava vähintään kolmesti enintään neljä tuntia kestävien altistusten osalta ja tunneittain lyhyempien altistusten osalta. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

20. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

21. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit. Tutkimusraportissa on ilmoitettava tavoitepitoisuus, nimellinen pitoisuus ja todellinen pitoisuus, mutta tilastollisissa analyyseissa käytetään vain todellisia pitoisuuksia tappavien pitoisuuksien arvoja laskettaessa.

22. Jos mahdollista, on käytettävä yksi erä testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

23. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana, ja sitä on tarkkailtava jatkuvasti ja/tai ajoittain analyysimenetelmän mukaisesti. Jos näytteitä otetaan ajoittain, kammion ilmakehästä on otettava näytteitä vähintään kahdesti neljän tunnin tutkimuksen aikana. Jos se ei ole mahdollista vähäisen ilmanvirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, koko altistusjakson ajalta voidaan ottaa yksi näyte. Jos näytteiden välillä ilmenee suurta vaihtelua, seuraavia pitoisuuksia testattaessa on otettava neljä näytettä kutakin altistusta kohti. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan, mikä otetaan huomioon t_{95}-ajan saavuttamiseen tarvittavissa ajoissa. Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

24. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin, joten jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai komponentin (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

25. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kahdesti jokaisen neljän tunnin mittaisen altistuksen aikana käyttämällä kaskadierotinta tai jotain toista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, kyseistä muuta laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa. Höyryjen osalta on määritettävä hiukkaskoko, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyrykammiossa, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia (katso 15 kohta).

MENETTELY

26. Jäljempänä kuvataan kahdentyyppisiä tutkimuksia: perinteistä protokollaa ja C × t -protokollaa. Molemmat protokollat voivat sisältää esikokeen, päätutkimuksen ja/tai raja-annostestin (perinteinen protokolla) tai testauksen rajapitoisuudella (C × t). Jos yhden sukupuolen tiedetään olevan herkempi, tutkimuksen johtaja voi päättää suorittaa nämä tutkimukset käyttäen vain herkkää sukupuolta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Ennen tutkimuksen aloittamista on otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot, jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Esimerkiksi tiedot, jotka on saatu hyödyntämällä tämän liitteen lukua B.52 (4), saattavat poistaa tarpeen toteuttaa esikoe, ja ne voivat myös osoittaa, onko jompikumpi sukupuoli toista herkempi [katso GD 39 (2)].

PERINTEINEN PROTOKOLLA

Yleisiä huomioita: perinteinen protokolla

27. Perinteisessä tutkimuksessa ryhmä eläimiä altistetaan testikemikaalille tietyksi ajaksi (yleensä neljäksi tunniksi) joko nasaalisen altistuksen tai koko kehoon kohdistuvan altistuksen kammiossa. Eläimet altistetaan joko rajapitoisuudelle (rajatesti) tai vähintään kolmelle pitoisuudelle vaiheittaisessa menettelyssä (päätutkimus). Päätutkimusta voi edeltää esikoe, ellei testikemikaalista ole jo jonkin verran tietoa saatavilla, esimerkiksi aiemmin tehty luvun B.52 mukainen tutkimus [katso GD 39 (2)].

Esikoe: perinteinen protokolla

28. Esikoetta käytetään testikemikaalin vaikutuskyvyn arvioimisessa, sukupuolten välisten herkkyyserojen tunnistamisessa ja helpottamaan altistuksen pitoisuustasojen valintaa päätutkimukseen tai rajatestiin. Kun valitaan esikokeen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös (Q)SAR-tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja. Kullekin pitoisuudelle saa altistaa enintään kolme urosta ja kolme naarasta (kolme eläintä / sukupuoli voi olla tarpeen sukupuolten välisen eron määrittämiseksi). Esikoe voi koostua yhdestä pitoisuudesta, mutta myös useampia pitoisuuksia voidaan testata, mikäli tarpeen. Esikokeessa ei tule kuitenkaan testata niin montaa eläintä ja pitoisuutta, että se alkaa muistuttaa päätutkimusta. Esikokeen sijasta voidaan käyttää aiemmin toteutettua luvun B.52 mukaista tutkimusta (4) [katso GD 39 (2)].

Rajatesti: perinteinen protokolla

29. Rajatestiä käytetään silloin, kun testikemikaalin tiedetään tai oletetaan olevan periaatteessa myrkytön eli aiheuttavan toksisen vasteen vain lakisääteistä rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla. Rajatestissä altistetaan yksi ryhmä, jossa on kolme urosta ja kolme naarasta, rajapitoisuuden vahvuiselle testikemikaalille. Tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä voidaan hankkia samanlaisia testattuja kemikaaleja koskevista tiedoista, jolloin on otettava huomioon niiden komponenttien identiteetti ja prosenttiosuus, joilla tiedetään olevan toksikologista merkitystä. Tilanteissa, joissa tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tai sitä ei ole lainkaan tai jos testikemikaalin oletetaan olevan myrkyllinen, on toteutettava päätutkimus.

30. Rajapitoisuudet valitaan yleensä sääntelyvaatimusten perusteella. Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (tai suurin mahdollinen pitoisuus) (3). Rajapitoisuuksien määrittäminen tietyille testikemikaaleille, etenkin höyryille ja aerosoleille, voi olla teknisesti haasteellista. Aerosolien testauksessa ensisijaisena tavoitteena tulee olla hengitettävän hiukkaskoon (MMAD 1–4 µm) saavuttaminen. Useimpien kemikaalien osalta tämä on mahdollista, kun niiden pitoisuus on 2 mg/l. Aerosolien testaamista suurempina pitoisuuksina kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos hengitettävä hiukkaskoko voidaan saavuttaa [katso GD 39 (2)]. Asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi (3). Rajapitoisuutta on harkittava vain, jos on erittäin todennäköistä, että sellaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden (3) suojelemisessa, ja tutkimusraportissa on esitettävä asiaa koskevat perustelut. Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen rajatestiä on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että rajatestin edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

31. Jos rajapitoisuudella havaitaan kuolleisuutta tai kuoleman lähestymistä, rajatestin tuloksia voidaan käyttää muiden, eri pitoisuuksilla tehtävien testien esikokeena (katso päätutkimus). Jos rajapitoisuuden tuottaminen ei ole mahdollista testikemikaalin fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien vuoksi, on testattava suurin mahdollinen pitoisuus. Jos kuolleisuus on alle 50 prosenttia suurimmalla mahdollisella pitoisuudella, lisätestaus ei ole tarpeen. Jos rajapitoisuutta ei voitu tuottaa, tutkimusraportissa on esitettävä sitä koskeva selvitys ja sitä tukevia tietoja. Jos höyryn suurin mahdollinen pitoisuus ei aiheuta myrkyllisyyttä, testikemikaalista voi olla tarpeen tuottaa nestemäinen aerosoli.

Päätutkimus: perinteinen protokolla

32. Päätutkimuksessa käytetään yleensä viittä urosta ja viittä naarasta (tai viittä herkän sukupuolen yksilöä, jos herkkyys tiedetään) pitoisuustasoa kohti. Pitoisuustasoja on oltava vähintään kolme. On käytettävä riittävän suuria pitoisuuksia, jotta voidaan laatia luotettava tilastollinen analyysi. Altistusryhmien välinen aika määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Eläinten altistusta seuraavalla pitoisuudella on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Näin tutkimuksen johtaja voi mukauttaa seuraavan altistusryhmän tavoitepitoisuutta. Kehittyneiden tekniikoiden vuoksi tämä ei ole välttämättä käytännöllistä inhalaatiotutkimuksissa, joten eläinten altistamisen seuraavalla pitoisuustasolla on perustuttava aiempaan kokemukseen ja tieteelliseen arvioon. Seosten testaamisesta saa tietoa ohjeasiakirjasta GD 39 (2).

PITOISUUS × AIKA (C × T) -PROTOKOLLA

Yleisiä huomioita: C × t -protokolla

33. Vaiheittaista C × t -tutkimusta voidaan harkita vaihtoehdoksi perinteiselle protokollalle, kun arvioidaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä (12) (13) 14). Tämän lähestymistavan avulla eläimet voidaan altistaa testikemikaalille useilla pitoisuustasoilla ja eripituisiksi ajoiksi. Kaikki testit tehdään vain nasaaliseen altistukseen tarkoitetussa kammiossa (koko kehoon kohdistuvaan altistukseen tarkoitetut kammiot eivät ole käytännöllisiä tässä protokollassa). Tämä protokolla on kuvattu lisäyksessä 1 olevassa vuokaaviossa. Simulaatioanalyysi on osoittanut, että sekä perinteisellä protokollalla että C × t -protokollalla voidaan tuottaa luotettavia LC_{50}-arvoja, mutta että C × t -protokolla on yleisesti parempi luotettavien LC_{01}- ja LC_{10}-arvojen tuottamisessa (15).

34. Lisäksi simulaatioanalyysi on osoittanut, että kahden eläimen käyttäminen yhtä C × t -aikaväliä kohti (yksi kumpaakin sukupuolta, jos käytetään molempia sukupuolia, tai kaksi herkemmän sukupuolen edustajaa) saattaa olla riittävä, kun päätutkimuksessa testataan neljä pitoisuutta ja viisi altistuksen kestoa. Tietyissä olosuhteissa tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää kahta rottaa kummastakin sukupuolesta yhtä C × t -aikaväliä kohti (15). Kahden eläimen käyttäminen kumpaakin sukupuolta kohti voi vähentää vinoumia ja estimaattien vaihtelevuutta, lisätä arvioinnin onnistumista ja parantaa luottamusvälin kattavuutta. Jos tiedot eivät kuitenkaan riitä arviointiin (kun käytetään yhtä eläintä sukupuolta kohti tai kahta herkemmän sukupuolen eläintä), viides altistuspitoisuus voi olla myös tarpeen. Lisätietoja eläinten määrästä ja käytettävistä pitoisuuksista C × t -tutkimuksessa on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Esikoe: C × t -protokolla

35. Esikokeella arvioidaan testikemikaalin vaikutuskykyä ja helpotetaan altistuksen pitoisuustasojen valintaa päätutkimusta varten. Jotta voidaan valita asianmukainen aloituspitoisuus päätutkimukseen ja minimoida käytettävien eläinten määrä, saatetaan tarvita esikoe, jossa käytetään enintään kolmea eläintä sukupuolta ja pitoisuutta kohti [katso tarkemmat tiedot ohjeasiakirjan GD 39 lisäyksestä III (2)]. Sukupuolten välisen eron määrittämiseksi voi olla tarpeen käyttää kolmea eläintä sukupuolta kohti. Nämä eläimet on altistettava yhden kerran, yleensä 240 minuutin ajaksi. Riittävien testi-ilmakehien tuottamisen mahdollisuus on arvioitava teknisissä esitesteissä ilman eläimiä. Yleensä esikoetta ei tarvita, jos kuolleisuustiedot ovat saatavilla luvun B.52 mukaisesta tutkimuksesta (4). Kun B.2-tutkimukseen valitaan alustavaa tavoitepitoisuutta, tutkimuksen johtajan on otettava huomioon saatavilla olevissa B.52-tutkimuksissa (4) havaitut kuolleisuusmallit kummankin sukupuolen ja kaikkien testattujen pitoisuuksien osalta [katso GD 39 (2)].

Alkupitoisuus: C × t -protokolla

36. Alkupitoisuus (altistuskerta I) (lisäys 1) on joko rajapitoisuus tai pitoisuus, jonka tutkimuksen johtaja on valinnut esikokeen perusteella. Ryhmät, joissa on yksi eläin sukupuolta kohti, altistetaan tälle pitoisuudelle eripituisiksi ajoiksi (esimerkiksi 15, 30, 60, 120 tai 240 minuuttia), jolloin eläinten kokonaismäärä on 10 (tätä ryhmää kutsutaan nimellä altistuskerta I) (lisäys 1).

37. Rajapitoisuudet valitaan yleensä sääntelyvaatimusten perusteella. Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (tai suurin mahdollinen pitoisuus) (3). Rajapitoisuuksien määrittäminen tietyille testikemikaaleille, etenkin höyryille ja aerosoleille, voi olla teknisesti haasteellista. Aerosoleja testattaessa tavoitteena on oltava kooltaan hengitettävä hiukkanen (esimerkiksi 1–4 µm:n MMAD) rajapitoisuudella 2 mg/l. Tämä on mahdollista useimpien kemikaalien osalta. Aerosolien testaamista suuremmalla pitoisuudella kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos on mahdollista saavuttaa kooltaan hengitettävä hiukkanen [katso ohjeasiakirja GD 39 (2)]. Asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi (3). Rajapitoisuuden ylittävää testausta on harkittava vain, jos on erittäin todennäköistä, että sellaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden (3) suojelemisessa, ja tutkimusraportissa on esitettävä perustelut.

Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen alkupitoisuudella testausta on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että tämän pitoisuuden edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

38. Jos alkupitoisuuteen havaitaan liittyvän kuolleisuutta tai kuoleman lähestymistä, tällä pitoisuudella saatuja tuloksia voidaan käyttää muiden, eri pitoisuuksilla tehtävien testien lähtökohtana (katso päätutkimus). Jos rajapitoisuuden tuottaminen ei ole mahdollista testikemikaalin fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien vuoksi, on testattava suurin mahdollinen pitoisuus. Jos kuolleisuus on alle 50 prosenttia suurimmalla mahdollisella pitoisuudella, lisätestaus ei ole tarpeen. Jos rajapitoisuutta ei voitu tuottaa, tutkimusraportissa on esitettävä sitä koskeva selvitys ja sitä tukevia tietoja. Jos höyryn suurin mahdollinen pitoisuus ei aiheuta myrkyllisyyttä, testikemikaalista voi olla tarpeen tuottaa nestemäinen aerosoli.

Päätutkimus: C × t -protokolla

39. Päätutkimuksessa testattu alkupitoisuus (altistuskerta I) (lisäys 1) on joko rajapitoisuus tai pitoisuus, jonka tutkimuksen johtaja on valinnut esikokeen perusteella. Jos altistuskerran I aikana tai sen jälkeen on havaittu kuolleisuutta, vähimmäisaltistus (C × t), josta seuraa kuolema, ohjaa altistuskerran II pitoisuuden ja altistusjaksojen määrittämistä. Edellinen altistuskerta vaikuttaa jokaiseen seuraavaan altistuskertaan (katso lisäys 1).

40. Monien testikemikaalien osalta alkupitoisuudella saadut tulokset sekä kolme muuta altistuskertaa, jotka on toteutettu pienemmällä aikavälillä (esimerkiksi altistusjaksojen jaottelu geometrisesti peräkkäisten jaksojen välisen kertoimen mukaisesti, yleensä √2) riittävät C × t -kuolleisuussuhteen (15) määrittämiseen, mutta viidennen altistuspitoisuuden käyttämisestä voi olla jonkin verran hyötyä [katso lisäys 1 ja GD 39 (2)]. Lisätietoja C × t -protokollalla saatujen tulosten matemaattisesta käsittelystä on lisäyksessä 1.

HAVAINNOT

41. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti altistumisjakson aikana. Altistuksen jälkeen kliinisiä havaintoja on tehtävä vähintään kahdesti altistuspäivän aikana tai useammin, jos eläinten vaste käsittelyyn antaa siihen aihetta, ja vähintään kerran päivässä sen jälkeen yhteensä 14 päivän ajan. Havaintojakson pituus ei ole kiinteä, vaan se on määritettävä kliinisten merkkien luonteen ja alkamisajankohdan sekä toipumisajan pituuden perusteella. Ne ajankohdat, jolloin myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat ja häviävät, ovat tärkeitä varsinkin, jos myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat viipeellä. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti jokaisesta eläimestä erikseen. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet ja/tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti eläinten hyvinvointiin liittyvien periaatteiden vuoksi. Kun tutkitaan myrkyllisyyden kliinisiä merkkejä, on kiinnitettävä huomiota siihen, ettei altistusmenettelystä johtuvaa huonoa ulkonäköä ja ohimeneviä muutoksia hengityksessä pidetä erehdyksessä merkkeinä kemikaaliin liittyvästä myrkyllisyydestä, jolloin eläimet pitäisi lopettaa ennenaikaisesti. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa (GD 19) esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon (7). Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

42. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Mikäli mahdollista, paikallisten ja systeemisten vaikutusten väliset erot on merkittävä muistiin. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa vahvistavaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta.

Ruumiinpainot

43. Kunkin eläimen paino on kirjattava kerran sopeutumisvaiheen aikana, altistuspäivänä ennen altistusta (päivä 0) ja vähintään päivinä 1, 3 ja 7 (ja myöhemmin viikoittain) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä, jos se tapahtuu päivän 1 jälkeen. Ruumiinpaino on tunnetusti erittäin tärkeä myrkyllisyyden indikaattori, joten eläimiä, joiden paino on jatkuvasti vähintään 20 prosenttia pienempi kuin ennen tutkimusta mitatut arvot, on seurattava tarkasti. Elossa olevat eläimet punnitaan ja lopetetaan humaanisti altistumisen jälkeisen jakson lopussa.

Patologia

44. Kaikki koe-eläimet, myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetut ja tutkimuksesta poistetut, avataan. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

45. Myös tutkimussuunnitelmaan ennalta sisällytettyjen lisätutkimusten käyttöä voidaan harkita tutkimuksen tulkinnallisen arvon lisäämiseksi. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi eloonjääneiden rottien keuhkojen painon punnitseminen ja/tai todisteiden hankkiminen ärsyttävyydestä hengitysteiden mikroskooppitutkimuksella. Tutkittaviin elimiin voi sisältyä myös vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet ja elimet, joissa tiedetään tai oletetaan olevan kemikaalin aiheuttamia vaikutuksia. Koko hengityselimistön mikroskooppitutkimus voi antaa hyödyllistä tietoa veden kanssa reagoivista testikemikaaleista, kuten hapoista ja hygroskooppisista testikemikaaleista.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

46. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot ruumiinpainoista ja ruumiinavaustuloksista on esitettävä. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin testiryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, myrkyllisyyden oireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, myrkyllisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

Testiraportti

47. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— tiedot ruoan ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— kuvaus inhalaatiokammiosta sekä sen mitat ja tilavuus

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilmanlähde, tulo- ja poistoilman käsittely sekä ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti järjestelmässä (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän ajallinen yhtenäisyys/stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— tiedot hapen ja hiilidioksidin mittauslaitteistosta, jos tarpeen

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuuden muutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, etc.), tilavuusyksiköt (esimerkiksi ppm, ppb jne.) voidaan ilmoittaa sulkeissa

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä Jos mekaaniset prosessit ovat voineet muuttaa kemiallista koostumusta, on ilmoitettava analyysien tulokset testikemikaalin koostumuksen vahvistamiseksi.

— kuvaus (mieluiten kaavio) testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— vastetiedot ja pitoisuustaso jokaisesta eläimestä (ts. eläimet, jotka osoittivat merkkejä myrkyllisyydestä, ja tiedot kuolleisuudesta sekä vaikutusten luonteesta, vaikeusasteesta, alkamisajankohdasta ja kestosta) (taulukkomuodossa)

— tutkimuksen aikana kerätyt tiedot yksittäisten eläinten ruumiinpainoista, kuolinpäivä ja -aika, jos se tapahtui ennen suunniteltua lopetusta, kunkin eläimen toksisuusoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— kuolleisuusestimaatit (esimerkiksi LC_{50}, LD_{01}) sekä 95 prosentin luottamusrajat ja kulmakerroin (jos se on voitu laskea arviointimenetelmällä)

— tilastollinen suhde ja eksponentin n estimaatti (C × t -protokolla) käytetyn tilasto-ohjelman nimi.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (esimerkiksi rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (8) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Jos tämän liitteen luvun B.52 (4) mukainen testaus keskeytettiin tämän testimenetelmän (B.2) puoltamiseksi, sille on esitettävä perustelut.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittelemiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

4) Tämän liitteen luku B.52: Akuutti myrkyllisyys hengitettynä – akuutin toksisuuden luokittelua koskeva menetelmä (ATC-menetelmä)

5) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

6) Tämän liitteen luku B.40 a *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihmisihomallitesti.

7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321–327.

10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278–290,

13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105–117.

14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65–71.

15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Lisäys 1

C × t -protokolla

1. Vaiheittaista pitoisuus × aika (C × t) -tutkimusta voidaan harkita vaihtoehdoksi perinteiselle protokollalle, kun arvioidaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä (12) (13) 14). Sitä on käytettävä ensisijaisesti silloin, kun on erityinen sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve, jonka vuoksi eläimiä on testattava eripituisia aikoja, esimerkiksi hätäavun tai maankäytön suunnitteluun liittyviä tarkoituksia varten. Tämä lähestymistapa alkaa yleensä rajapitoisuudella testaamisella (altistuskerta I), jolloin eläimet altistetaan testikemikaalille viideksi eripituiseksi ajaksi (esimerkiksi 15, 30, 60, 120 ja 240 minuutiksi). Toisin sanoen yhdellä altistuskerralla saadaan tietoa eripituisista altistusajoista (katso kuva 1). Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Nämä rajat saa ylittää vain, jos on sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve testata näitä suuremmilla pitoisuuksilla (katso 37 kohta luvun B.2 päätekstissä).

2. Jos testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tietoa tai jos sitä ei ole lainkaan, on toteutettava esikoe, jossa enintään kolme eläintä sukupuolta kohti altistetaan tutkimuksen johtajan valitsemille tavoitepitoisuuksille yleensä 240 minuutin ajaksi.

3. Jos altistuskerralla I testataan rajapitoisuutta ja jos siinä yhteydessä havaitaan alle 50 prosentin kuolleisuus, lisätestit eivät ole tarpeen. Jos on sääntelyyn liittyvä tai tieteellinen tarve määrittää pitoisuus-/aika-/vastesuhde saatua rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla, seuraava altistus on tehtävä suuremmalla pitoisuudella, joka on kaksi kertaa rajapitoisuus (ts. 2L kuvassa 1).

4. Jos rajapitoisuuden yhteydessä havaitaan myrkyllisyyttä, lisätestaus (päätutkimus) on tarpeen. Nämä lisäaltistukset toteutetaan joko pienemmillä pitoisuuksilla (kuvassa 1: altistuskerrat II, III tai IV') tai suuremmilla pitoisuuksilla käyttäen lyhyempiä altistusaikoja (kuvassa 1: altistuskerta IV) siten, että aikoja mukautetaan tai että niiden välinen aika on lyhyempi.

5. Testi (alkupitoisuus ja muut pitoisuudet) toteutetaan käyttämällä yhtä eläintä sukupuolta kohti kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti tai kahta herkemmän sukupuolen eläintä kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti. Tietyissä olosuhteissa tutkimuksen johtaja voi valita käyttää kahta rottaa sukupuolta kohti kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti (tai neljää herkemmän sukupuolen eläintä kutakin pitoisuutta/aikapistettä kohti) (15). Kahden eläimen käyttäminen kumpaakin sukupuolta kohti yleensä vähentää vinoumia ja estimaattien vaihtelevuutta, lisää arvioinnin onnistumista ja parantaa tässä kuvattuun protokollaan liittyvän luottamusvälin kattavuutta. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

6. Kukin altistuskerta toteutetaan mielellään yhtenä päivänä. Tämän ansiosta seuraavaa altistusta voidaan lykätä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä, ja tutkimuksen johtaja voi myös muuttaa seuraavan altistuskerran tavoitepitoisuutta ja altistuksen kestoa. Kukin altistuskerta on suositeltavaa aloittaa sillä ryhmällä, joka altistuu pisimpään, eli ensin 240 minuutin altistusryhmä, seuraavaksi 120 minuutin altistusryhmä ja niin edelleen. Jos esimerkiksi 240 minuutin ryhmän eläimet kuolevat 90 minuutin kuluttua tai osoittavat vakavia merkkejä myrkyllisyydestä (esimerkiksi suuria muutoksia hengityksessä, kuten vaivalloista hengittämistä), ei ole mielekästä altistaa ryhmää 120 minuutin ajaksi, koska kuolleisuus olisi todennäköisesti 100 prosenttia. Tällöin tutkimuksen johtajan on valittava kyseiselle pitoisuudelle lyhyempikestoiset altistukset (esimerkiksi 90, 65, 45, 33 ja 25 minuuttia).

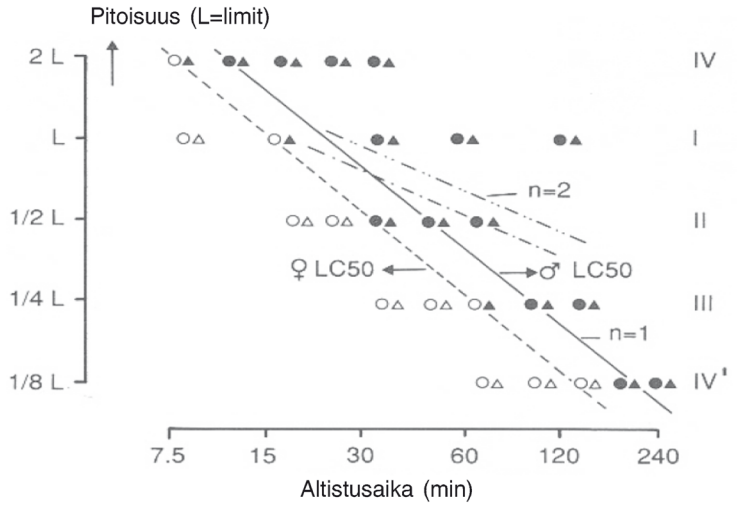
7. Kammion pitoisuudet on mitattava säännöllisesti, jotta kunkinpituisen altistuksen aikapainotettu keskimääräinen pitoisuus voidaan määrittää. Aina kun mahdollista, tilastollisessa analyysissa on käytettävä kunkin eläimen kuolinaikaa (pikemmin kuin altistuksen kestoa).

8. Neljän ensimmäisen altistuskerran tulokset on analysoitava, jotta voidaan tunnistaa pitoisuus-aikakäyrästä puuttuvat tiedot (katso kuva 1). Jos käyrä ei kuvaa tietoja riittävästi, voidaan toteuttaa ylimääräinen altistus (viides pitoisuus). Viidennen altistuksen pitoisuus ja kesto on valittava siten, että puuttuvat tiedot voidaan tuottaa.

9. Kaikkia altistuskertoja (myös ensimmäistä altistuskertaa) käytetään laskettaessa pitoisuus-aika-vaste-suhdetta tilastollista analyysia hyödyntäen (16). Mikäli mahdollista, kutakin C × t -väliä kohti on käytettävä aikapainotettua keskimääräistä pitoisuutta ja altistuksen kestoa kuolemaan saakka (jos eläin kuolee altistuksen aikana).

Kuva 1

Hypoteettinen kuvaus pitoisuus-aika-kuolleisuussuhteesta rotilla.



Vaaleat symbolit = eloonjääneet, mustat symbolit = kuolleet eläimet

Kolmio = naaras, neliö = uros

Yhtenäinen viiva = LC_{50}-arvot (vaihteluväli 7,5–240 min), urokset, n = 1

Katkoviiva = LC_{50}-arvot (vaihteluväli 7,5–240 min), naaraat, n = 1

Pisteviivat = hypoteettiset LC_{50}-arvot uroksille ja naaraille, jos n olisi ollut 2 (12).

Sanasto

Pitoisuus:

Altistusaika:

10. Jäljempänä on esimerkki vaiheittaisesta menettelystä:

Altistuskerta I – Testaus rajapitoisuudella (katso kuva 1)

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä [a]

— Tavoitepitoisuus [b] = rajapitoisuus.

— Altista viisi eläinryhmää tälle tavoitepitoisuudelle 15, 30, 60, 120 ja 240 minuutin ajaksi.

↓

Altistuskerta II [c] – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

[a] Jos tietoja sukupuolikohtaisesta herkkyydestä ei ole, käytetään sekä uros- että naarasrottia, ts. yksi eläin kumpaakin sukupuolta pitoisuutta kohti. Olemassa olevien tietojen perusteella – tai jos tämän altistuskerran aikana käy ilmi, että jompikumpi sukupuoli on herkempi – käytetään 10:tä herkemmän sukupuolen eläintä (kaksi eläintä pitoisuutta/aikapistettä kohti) jokaisella pitoisuustasolla testauksen seuraavissa vaiheissa. 10 eläintä.

[b] Kun käytetään asetusta (EY) N:o 1272/2008, kaasujen, höyryjen ja aerosolien rajapitoisuudet ovat 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Oletetun myrkyllisyyden tai esikokeen tulosten perusteella on valittava pienemmät aloituspitoisuudet. Sääntelyyn liittyvien tai tieteellisten tarpeiden yhteydessä voidaan käyttää suurempia pitoisuuksia.

[c] Eläinten altistusta seuraavalle pitoisuudelle on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Näin tutkimuksen johtaja voi mukauttaa seuraavan altistusryhmän tavoitepitoisuutta ja altistuksen kestoa.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle [d] (1/2 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

↓

Altistuskerta III – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle [d] (1/4 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

↓

Altistuskerta IV' – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää pienemmälle pitoisuudelle [d] (1/8 L) hieman pidemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

tai

Altistuskerta IV – Päätutkimus

— Yksi eläin/sukupuoli pitoisuutta/aikapistettä kohti, yhteensä 10 eläintä.

— Altista viisi eläinryhmää suuremmalle pitoisuudelle [e] (2 L) hieman lyhyemmäksi aikaa (kertoimen √2 mukaan porrastettuna, katso kuva 1).

C × t -protokollalla saatujen tulosten matemaattinen käsittely

11. C × t -menettely, jossa on neljä tai viisi altistuspitoisuutta ja viisi kestoa, tuottaa 20 tai 25 datapistettä. Näiden datapisteiden avulla C × t -suhde voidaan laskea käyttämällä tilastollista analyysia (16):

Kaava 1

$$Probitti(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

jossa C = pitoisuus; t = altistuksen kesto, tai

Kaava 2

$$Vaste = f(C^n t)$$

jossa $n = b_1/b_2$.

Kaavan 1 avulla LC_{50}-arvo voidaan laskea tietylle ajanjaksolle (esimerkiksi neljä tuntia, yksi tunti, 30 minuuttia tai mikä tahansa ajanjakso testatuilta ajanjaksoilta) käyttäen arvoa P = 5 (50 prosentin vaste). Haberin sääntöä voidaan soveltaa vain, kun n = 1. LC_{01}-arvo voidaan laskea käyttäen arvoa P = 2,67.

[d] Pienintä annosta (pitoisuus x aika), joka aiheutti kuolleisuutta alkupitoisuudella testattaessa (ensimmäinen altistuskerta), käytetään ohjenuorana määritettäessä seuraavaa pitoisuuden ja altistuksen keston yhdistelmää. Yleensä pitoisuutta pienennetään kaksinkertaisesti (1/2 L), ja eläimet altistetaan uudelle aikavälille, jota on tarkennettu siten, että altistusajat on jaettu kertoimella 1,4 (√2; katso viite 11) ensimmäisen altistuksen yhteydessä havaittuun pienimpään tappavaan annokseen (aika × pitoisuus) liittyvän ajan mukaisesti. Tässä kuvassa (kuva 1) altistuskerralla 1 havaittiin kuolleisuutta 15 minuutin kohdalla, joten altistuskerran II kestot sijoitetaan tällöin 30 minuutin ympärille, ja ne ovat 15, 21, 30, 42 ja 60 minuuttia. Kahden ensimmäisen altistuksen jälkeen on erittäin suositeltavaa piirtää tiedoista edellä olevan kuvan kaltainen kuva ja tarkistaa, onko pitoisuuden ja ajan välinen kulma 45 astetta (n = 1) vai onko pitoisuus-aika-vastesuhde loivempi (esimerkiksi N = 2) vai jyrkempi (esimerkiksi n = 0,8). Jälkimmäisissä tapauksissa on erittäin suositeltavaa muuttaa seuraavia pitoisuuksia ja kestoja vastaavasti.

[e] Tietyissä tapauksissa voi olla tarpeen suurentaa pitoisuutta (2 L) uuden, vieläkin tarkemman aikavälin mukaisesti siten, että altistusajat jaetaan geometrisesti kertoimella 1,4 (√2) sen ajan mukaisesti, jolloin ensimmäisessä altistuksessa havaittiin pienin tappava pitoisuus. Altistuksen vähimmäiskeston on mielellään oltava yli viisi minuuttia, kun taas enimmäiskesto ei saa ylittää kahdeksaa tuntia."

4) Korvataan luvut B.7 ja B.8 seuraavasti:

”B.7 ORAALINEN TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS (28 PV) JYRSIJÖILLÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 407 (2008). Alkuperäinen testiohje nro 407 hyväksyttiin vuonna 1981. Vuonna 1995 hyväksyttiin tarkistettu versio, jonka tavoitteena oli saada lisätietoja tutkimuksessa käytetystä eläimestä eritoten neurotoksisuuden ja immunotoksisuuden osalta.

2. Vuonna 1998 OECD aloitti tärkeän toimenpiteen, olemassa olevien testiohjeiden uudistuksen ja uusien testiohjeiden laatimisen mahdollisten hormonaalisten haitta-aineiden seulontaa ja testausta varten (8). Osa tätä toimenpidettä oli ajantasaistaa OECD:n olemassa olevaa ohjetta ”Oraalinen toistuvan annostelun toksisuustutkimus (28 pv) jyrsijöillä” (TG 407) parametreilla, joilla voidaan havaita testikemikaalien hormonitoimintaan kohdistuva vaikutus. Tämä menettely kävi läpi laajan kansainvälisen ohjelman, jossa testattiin uusien parametrien merkityksellisyys ja käytännöllisyys, näiden parametrien suorituskyky (anti)estrogeenisia, (anti)androgeenisia ja kilpirauhasen toimintaa estäviä vaikutuksia omaaviin kemikaaleihin nähden, laboratorion sisäinen ja laboratorioiden välinen toistettavuus sekä se, häiritsevätkö uudet parametrit ohjeen TG 407 vanhemmassa versiossa vaadittuja parametreja. Näin saatu valtava määrä tietoa on koottu yhteen ja arvioitu yksityiskohtaisesti OECD:n kattavassa raportissa (9). Tämä ajantasaistettu testimenetelmä B.7 (joka vastaa ohjetta TG 407) perustuu kansainvälisen testiohjelman aikana saatuihin kokemuksiin ja tuloksiin. Tämän testimenetelmän avulla hormonivälitteisiä vaikutuksia voidaan tarkastella muiden toksikologisten vaikutusten yhteydessä.

ALUSTAVAT HUOMIOT JA RAJOITUKSET

3. Kun määritetään ja arvioidaan kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia, toistettujen annosten aiheuttama oraalinen myrkyllisyys voidaan määrittää sen jälkeen, kun akuutin myrkyllisyyden testistä on saatu alustavia tietoja myrkyllisyydestä. Tällä testimenetelmällä voidaan tutkia hyvin monenlaisia mahdollisia kohteita, joihin myrkylliset vaikutukset voivat kohdistua. Se antaa tietoa mahdollisista terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta suhteellisen lyhyen ajan kuluessa, mukaan luettuina hermostoon sekä immuuni- ja hormonijärjestelmiin kohdistuvat vaikutukset. Näiden erityisten tutkittavien ominaisuuksien osalta menetelmän avulla on voitava tunnistaa kemikaalit, jotka saattavat olla neurotoksisia, jolloin tarkemmat asiaa koskevat tutkimukset saattavat olla tarpeen, sekä kemikaalit, jotka häiritsevät kilpirauhasen fysiologiaa. Menetelmä voi myös tuottaa tietoa kemikaaleista, jotka vaikuttavat uroksen ja/tai naaraan lisääntymiselimiin nuorilla eläimillä, ja sen avulla voidaan saada myös viitteitä immunologisista vaikutuksista.

4. Tällä B.7-testimenetelmällä saatavia tuloksia on käytettävä vaarojen tunnistamisessa ja riskinarvioinnissa. Hormonitoimintaan liittyvien parametrien avulla saatuja tuloksia on tarkasteltava OECD:n asiakirjaan ”Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals” (11) (hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeva toimintamalli) liittyvässä kontekstissa. Menetelmä koostuu tavanomaisesta toistuvan annoksen myrkyllisyystutkimuksesta, jota voidaan käyttää sellaisten kemikaalien testaamisessa, joiden osalta 90 päivän tutkimus ei ole perusteltu (kun esimerkiksi tuotantomäärä ei ylitä tiettyjä rajoja), tai pitkäaikaisen tutkimuksen esitutkimuksena. Altistuksen on kestettävä 28 päivää.

5. Kansainvälinen ohjelma, joka koski sellaisten parametrien validointia, joiden avulla voidaan mahdollisesti havaita testikemikaalin hormonitoimintaan kohdistuva vaikutus, osoitti, että testauslaboratorion kokemus vaikuttaa suuresti testimenetelmällä B.7 saatujen tietojen laatuun. Tämä liittyy varsinkin naaraiden lisääntymiselimissä tapahtuvien syklisten muutosten histopatologiseen määrittämiseen sekä pienten hormoneista riippuvaisten elinten painon määrittämiseen, koska näitä elimiä on vaikea dissekoida. Histopatologiaa koskevia ohjeita on laadittu (19). Ne ovat saatavilla OECD:n julkisella verkkosivustolla kemikaalien testausta käsittelevässä kohdassa. Ohjeet on tarkoitettu patologeille avuksi tutkimuksiin ja määritysmenetelmän herkkyyden parantamiseen. Useiden parametrien havaittiin antavan viitteitä hormonitoimintaan liittyvästä myrkyllisyydestä, ja ne on sisällytetty testimenetelmään. Parametreja, joista oli saatavilla käyttökelpoisuuden vahvistamisen kannalta liian vähän tietoa, tai joiden kyvystä auttaa havaitsemaan hormonaalisia haitta-aineita saatiin validointiohjelmassa vain heikkoa näyttöä, ehdotetaan käytettäväksi valinnaisina päätepisteinä (katso lisäys 2).

6. Validointiprosessissa saatujen tietojen perusteella on korostettava, että tämän menetelmän herkkyys ei riitä kaikkien sellaisten aineiden tunnistamiseen, joilla on (anti)androgeenisia tai (anti)estrogeenisia vaikutustapoja (9). Testimenetelmää ei käytetä siinä elämänvaiheessa, joka on herkin hormonaalisille häiriöille. Validointiprosessin aikana testimenetelmällä tunnistettiin kuitenkin aineita, jotka vaikuttavat kilpirauhasen toimintaan heikosti ja voimakkaasti, sekä hormonitoimintaan estrogeeni- tai androgeenireseptoreiden kautta voimakkaasti tai kohtalaisesti vaikuttavia aineita, mutta useimmissa tapauksissa menetelmällä ei pystytty tunnistamaan sellaisia hormonitoimintaan vaikuttavia aineita, jotka vaikuttavat estrogeeni- tai androgeenireseptoreihin heikosti. Sitä ei siis voida pitää hormonitoimintaan kohdistuvan vaikutuksen seulontamenetelmänä.

7. Vastaavasti näihin vaikutustapoihin liittyvien vaikutusten puuttumista ei voida pitää osoituksena hormonijärjestelmään kohdistuvien vaikutusten puuttumisesta. Hormonivälitteisten vaikutusten osalta aineen luonnehdinnan ei tule sen vuoksi perustua pelkästään tällä testimenetelmällä saatuihin tuloksiin, vaan niitä tulee käyttää näyttöön perustuvan toimintatavan yhteydessä, ja siihen on sisällytettävä kaikki kemikaalista olemassa olevat tiedot, jotta mahdollista hormonitoimintaan vaikutusta voidaan luonnehtia. Tästä syystä sääntelyyn liittyvässä päätöksenteossa, joka koskee hormonitoimintaan kohdistuvia vaikutuksia (aineen luonnehdinta), on sovellettava laaja-alaista lähestymistapaa, eikä siinä tule tukeutua pelkästään tätä testimenetelmää soveltaen saatuihin tuloksiin.

8. Kaikissa eläimiin liittyvissä menettelyissä on noudatettava paikallisia eläintenhoitovaatimuksia. Jäljempänä olevat kuvaukset eläinten hoidosta ja käsittelystä ovat vähimmäisvaatimuksia, ja paikalliset määräykset ovat niihin nähden ensisijaisia, jos ne ovat tiukempia. OECD on antanut lisäohjeita eläinten humaanista käsittelystä (14).

9. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

10. Testikemikaali annostellaan useille koe-eläinryhmille suun kautta päivittäin asteittain suurenevina annoksina siten, että yksi ryhmä saa aina yhtä annostasoa 28 päivän ajan. Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin päivittäin toksisuusoireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus. Kahdenkymmenenkahdeksan päivän mittainen tutkimus antaa tietoa toistuvan oraalisen altistuksen vaikutuksesta, ja siitä voidaan myös saada viitteitä pitempiaikaisten tutkimusten tarpeesta. Lisäksi tutkimus voi antaa tietoa pitoisuuksien valinnasta pitkäaikaisia tutkimuksia varten. Testimenetelmän avulla saatujen tietojen perusteella tulisi voida luonnehtia testikemikaalin myrkyllisyyttä, jotta annos-vastesuhde ja taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL), voidaan määrittää.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

11. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä voidaan käyttää. Jos tässä testimenetelmässä B.7 määritettyjä parametreja tutkitaan muilla jyrsijöillä, on esitettävä yksityiskohtainen perustelu. Vaikka on biologisesti todennäköistä, että muut lajit reagoivat myrkkyihin samalla tavoin kuin rotta, pienempien lajien käyttö voi kuitenkin lisätä vaihtelua pienempien elinten dissekoimiseen liittyvien teknisten haasteiden vuoksi. Kansainvälisessä validointiohjelmassa, jossa tutkittiin hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemista, rotta oli ainoa käytetty laji. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Annostelun tulee alkaa mahdollisimman pian vieroituksen jälkeen ja ainakin ennen yhdeksättä elinviikkoa. Käytettävien eläinten paino ei saisi juurikaan vaihdella eikä ylittää ± 20:tä prosenttia kummankaan sukupuolen keskipainosta kokeen alussa. Mikäli toistuvan oraalisen annostelun tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, molemmissa tutkimuksissa tulee mieluiten käyttää samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

12. Kaikissa menettelyissä on noudatettava laboratorioeläinten hoitoa koskevia paikallisia vaatimuksia. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion valinnassa on varmistettava, että testiaineen ja ravinnon suhde on sopiva, mikäli testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna. Eläimet voidaan pitää häkeissä muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä tai yksittäin, jos se on tieteellisesti perusteltua. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä.

13. Eläinten ravinto on analysoitava säännöllisesti kontaminanttien varalta. Näyte ruokavaliosta on säilytettävä siihen saakka, kunnes tutkimusraportti on valmis.

Eläinten valmistelu

14. Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaisesti testi- ja verrokkiryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti, ja ne pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Annosten valmistelu

15. Testikemikaali annetaan ruokintaletkulla tai ruoan tai juomaveden kautta. Oraalisen annostelun menetelmä määräytyy tutkimuksen tarkoituksen sekä testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ja toksikokineettisten ominaisuuksien mukaan.

16. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkkyominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiliteetti kantaja-aineessa on määritettävä.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

17. Kutakin annostasoa tulee testata vähintään kymmenellä eläimellä (viisi naarasta ja viisi urosta). Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken kokeen, eläinten määrää tulee lisätä saman verran kuin niitä aiotaan lopettaa ennen kokeen päättymistä. Myös ylimääräisen, kymmenestä eläimestä (viisi kumpaakin sukupuolta) koostuvan satelliittiryhmän käyttöä voidaan harkita verrokkiryhmässä ja suurimman annoksen ryhmässä, jotta toksisten vaikutusten korjaantuvuutta, jatkuvuutta ja ilmenemisen viivästymistä voidaan havainnoida vähintään 14 päivän ajan käsittelyn jälkeen.

Annostelu

18. Yleensä tulee käyttää vähintään kolmea testiryhmää ja yhtä verrokkiryhmää, mutta jos vaikutuksia ei muiden tietojen arvioinnin perusteella ole odotettavissa toistetulla vuorokausiannoksella 1 000 mg/kg, voidaan tehdä raja-annostesti. Jos sopivia tietoja ei ole saatavilla, voidaan tehdä annosalueen haarukointitesti (samaa sukupuolta ja samasta lähteestä olevia eläimiä käyttäen) käytettävien annosten määrittämisen helpottamiseksi. Testiaineen annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testiaineen annostelussa käytetään kantaja-ainetta, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

19. Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon kaikki testikemikaaleista tai samankaltaisista kemikaaleista saatavilla olevat aiemmin saadut toksisuus- ja kinetiikkatiedot. Korkein annostaso tulee valita siten, että sen tarkoituksena on aiheuttaa toksisia vaikutuksia mutta ei kuolemaa tai vakavia kärsimyksiä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla (NOAEL). Kaksin-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin 10-kertaisia).

20. Jos havaitaan yleisiä myrkyllisyysvaikutuksia (kuten ruumiinpainon pienenemistä, maksaan, sydämeen, keuhkoihin tai munuaisiin kohdistuvia vaikutuksia jne.) tai muita muutoksia, jotka eivät ole välttämättä toksisia (esimerkiksi ravinnonoton vähentymistä, maksan suurenemista), immuunijärjestelmän, hermoston tai hormonitoiminnan kannalta herkkiin tutkittaviin ominaisuuksiin kohdistuvia vaikutuksia on tulkittava varovaisesti.

Rajatesti

21. Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1 000 mg painokiloa kohti / vrk tai jota annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna vastaava prosenttiosuus (painomääritysten perusteella), tehdyssä testissä, joka on tehty tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita myrkyllisiä vaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla kemikaaleilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

Antotapa

22. Eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 28 vuorokauden ajan. Jos testikemikaali annetaan ruokintaletkun kautta, se on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Määrä ei saa ylittää 1 ml/100 g painoa. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 2 ml/100 g painoa. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Muutoin testitilavuuden vaihtelu tulee minimoida pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla voidaan käyttää tilavuudeltaan samaa nestemäärää.

23. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annostaso; käytetty tapa on mainittava. Jos kemikaali annetaan letkulla, annos tulee antaa päivittäin samaan aikaan ja sitä on mukautettava tarvittaessa siten, että annostaso pysyy samana eläimen ruumiinpainoon nähden. Mikäli toistuvan annostelun tutkimusta käytetään pitkäaikaistutkimuksen esitestinä, kummassakin tutkimuksessa on käytettävä samanlaista ruokavaliota.

Havainnot

24. Havainnointijakson on kestettävä 28 päivää. Seurantahavainnointiin tarkoitettuja satelliittiryhmän eläimiä tulisi pitää vähintään 14 päivää ilman annostelua, jotta viivästyneet toksiset vaikutukset, niiden jatkuminen tai niistä toipuminen voidaan todeta.

25. Eläimestä on tehtävä kliinisiä yleishavaintoja vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä ja ottaen huomioon, että odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Eläinten vointi on kirjattava. Eläinten sairastavuus ja kuolleisuus tarkistetaan vähintään kahdesti päivässä.

26. Kutakin eläintä on havainnoitava kliinisesti seikkaperäisesti kerran ennen ensimmäistä altistuskertaa (samaa koeeläintä koskevia vertailuja varten) ja sen jälkeen vähintään kerran viikossa. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella vakioalueella mieluiten samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. Vaihtelut koeolosuhteissa on pyrittävä minimoimaan ja havainnoijien on mieluiten oltava annostelusta tietämättömiä henkilöitä. Huomiota tulee kiinnittää mm. ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, mahdollisten sisäeritteiden ja kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, hengitys) muutoksiin. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esim. ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esim. itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (2).

27. Neljännellä altistusviikolla arvioidaan aistien reaktiivisuutta erityyppisille ärsykkeille (2) (esim. kuulo, näkö ja asentotunto) (3) (4) (5), tarttumaotteen voimakkuutta (6) ja motorista toimintaa (7). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittausten mukaisia toimenpiteitä voidaan käyttää.

28. Toiminnallisia havaintoja ei tarvitse tehdä neljännellä altistusviikolla, jos kyseessä on subkroonisen (90 päivän) tutkimuksen esitutkimus. Tällöin toiminnalliset havainnot tehdään seurantatutkimuksessa. Toisaalta toistuvan annostelun tutkimuksesta saatavat toiminnallisia havaintoja koskevat tiedot voivat helpottaa annostasojen valintaa subkroonista tutkimusta varten.

29. Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei myöskään tarvitse tehdä ryhmillä, joissa muutoin ilmenee merkkejä myrkyllisyydestä laajuudessa, joka häiritsisi merkitsevästi toiminnallisten kokeiden suorittamista.

30. Ruumiinavauksen yhteydessä kaikkien naaraiden kiimasykli voidaan määrittää (valinnaisesti) ottamalla niiltä irtosolunäytteet. Näistä havainnoista saadaan tietoa kiimasyklin vaiheesta eläimen lopettamisen ajankohtana, ja niistä on myös apua estrogeeniherkkien kudosten histologisessa arvioinnissa [katso histopatologiaa koskevat ohjeet (19)].

Ruumiinpaino ja ravinnon/veden kulutus

31. Kukin eläin on punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnon kulutus on mitattava vähintään viikoittain. Jos testikemikaali annostellaan juomavedessä, myös veden kulutus on mitattava vähintään viikoittain.

Hematologia

32. Seuraavat verikokeet on tehtävä koejakson päätyttyä: hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, retikulosyytit, leukosyyttien kokonaismäärä ja erittelylaskenta, trombosyyttien määrä ja veren hyytymisajan/-potentiaalin mittaus. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalilla tai sen oletetuilla metaboliiteilla on tai epäillään olevan hapettavia ominaisuuksia, ovat methemoglobiinipitoisuus ja Heinzin kappaleet.

33. Verinäytteet tulee ottaa nimetystä kohdasta juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Näytteet tulee säilyttää asianmukaisissa olosuhteissa. Eläinten ruokintaa on siirrettävä lopettamista edeltävän yön yli ([1]).

Kliininen biokemia

34. Kliiniset biokemialliset määritykset tärkeimpien toksisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan kustakin eläimestä juuri ennen lopettamista tai sen yhteydessä (lukuun ottamatta eläimiä, jotka on löydetty kuolemaisillaan ja/tai lopetettu kesken kokeen). Plasma- ja seerumikokeiden tulee kattaa natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, kreatiniini, kokonaisproteiini ja albumiini, vähintään kaksi hepatosellulaarisia vaikutuksia osoittavaa entsyymiä (kuten alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitranspeptidaasi ja glutamaattidehydrotenaasi) ja sappihapot. Muiden entsyymien (maksasta tai muualta peräisin olevien) ja bilirubiinin mittauksista voidaan saada hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa.

35. Vaihtoehtoisesti voidaan tehdä seuraavat virtsa-analyysit viimeisellä tutkimusviikolla ajastetun virtsankeräyksen avulla: ulkonäkö, määrä, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH-arvo, proteiini, glukoosi ja veri/verisolut.

([1]) Ruokinnan siirtämistä yön yli suositellaan monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksissa. Tärkein syy tälle suositukselle on se, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta ruokinnan siirtäminen yön yli voi häiritä eläinten yleistä metaboliaa ja etenkin ruokintatutkimuksissa päivittäistä altistusta testikemikaalille. Jos eläimen ruokinta siirretään yli yön, kliiniset biokemialliset mittaukset tulee tehdä neljännellä tutkimusviikolla suoritettavien toiminnallisten havaintojen jälkeen.

36. Lisäksi tulee tutkia, esiintyykö seerumissa yleisiä kudosvaurioita osoittavia merkkiaineita. Muita määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testikemikaalin tunnetut ominaisuudet voivat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan siihen liittyviin metaboliaprofiileihin, ovat kalsium, fosfaatti, triglyseridit, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliiniesteraasi. Nämä on selvitettävä tiettyjen luokkien aineista tai tapauskohtaisesti.

37. Vaikka hormonitoimintaan liittyvien tutkittavien ominaisuuksien kansainvälisessä arvioinnissa ei voitu osoittaa, että kilpirauhashormonien (T3, T4) ja TSH:n määrittämisestä olisi selvää hyötyä, plasma- ja seeruminäytteet kannattaa kuitenkin säilyttää T3- ja T4-arvojen sekä TSH-arvon (valinnainen) mittaamista varten, jos näyttää siltä, että kemikaali vaikuttaa aivolisäke-kilpirauhasakseliin. Nämä näytteet voidaan pakastaa −20 °C:ssa säilytystä varten. Seuraavat seikat saattavat vaikuttaa hormonimääritysten vaihteluun ja absoluuttisiin pitoisuuksiin:

— lopettamisaika hormonipitoisuuksien vuorokausivaihtelun takia

— lopettamistapa, jotta vältetään aiheuttamasta eläimille turhaa stressiä, joka voi vaikuttaa hormonipitoisuuksiin

— hormonimääritysten testipaketit, joiden standardikäyrät voivat vaihdella.

Kilpirauhaseen vaikuttavat kemikaalit tunnistetaan varmemmin ja luotettavammin käyttämällä hormonipitoisuuksien sijasta mieluummin histopatologista analyysia.

38. Plasmanäytteet, jotka on nimenomaisesti tarkoitettu hormonimäärityksiin, on otettava samaan aikaan päivästä. On suositeltavaa harkita T3-, T4- ja THS-määrityksiä, jos kilpirauhasen histopatologiset muutokset antavat siihen aihetta. Hormonipitoisuuksien analysoimisesta saadaan toisenlaisia numeerisia arvoja kuin erilaisten kaupallisten testipakettien avulla. Näin ollen yhtenäisiin aiempiin tietoihin perustuvia vaatimuksia ei voida välttämättä laatia. Vaihtoehtoisesti laboratorioiden on pyrittävä pitämään variaatiokertoimet T3:n ja T4:n osalta pienempinä kuin 25 ja TSH:n osalta pienempänä kuin 35. Kaikki pitoisuudet on kirjattava käyttäen yksikköä ng/ml.

39. Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömiä, hematologiset ja kliiniset biokemialliset muuttujat on määritettävä ennen annostelun aloittamista tai mieluiten ryhmässä eläimiä, jotka eivät kuulu koeryhmiin.

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

40. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta lopetettuja) maksa, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat kokonaisuudessaan, kateenkorva, perna, aivot ja sydän on puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne on punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi. Eturauhaskokonaisuuden puhdistamisessa on oltava huolellinen, jotta nestettä sisältävät rakkularauhaset eivät puhkea. Rakkularauhaset ja eturauhanen voidaan puhdistaa ja punnita myös kiinnittämisen jälkeen.

41. Lisäksi voidaan valinnaisesti punnita kaksi muuta kudosta mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi: munasarjat (märkäpaino), kohtu ja kohdunkaula (ohjeita kohtukudosten irrottamisesta ja valmistelusta punnitusta varten on OECD:n ohjeessa TG 440 (18)).

42. Kilpirauhasen paino (valinnainen) voidaan määrittää kiinnittämisen jälkeen. Puhdistus on tehtävä hyvin varovasti ja vasta kiinnittämisen jälkeen kudosvaurioiden välttämiseksi. Kudosvauriot voivat haitata histopatologista analyysia.

43. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (katso 47 kohta): kaikki silmin havaittavat vauriot, aivot (edustavat alueet, mukaan lukien iso- ja pikkuaivot ja aivosilta), selkäydin, mahalaukku, ohutsuoli, paksusuoli (mukaan lukien Peyerin levyt), maksa, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, kateenkorva, kilpirauhanen, henkitorvi ja keuhkot (säilytetään puhaltamalla keuhkot täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla ne sitten kiinnitysaineeseen), sukurauhaset (kivekset ja munasarjat), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, eturauhanen ja rakkularauhanen sekä niiden etuosat), vagina, virtsarakko, imusolmukkeet [proksimaalisimman imusolmukkeen lisäksi on otettava vielä toinen imusolmuke laboratorion kokemuksen perusteella (15)], ääreishermo(lonkka- tai säärihermo) mieluiten läheltä lihasta, luurankolihas ja luu sekä osa luuydintä (tai vaihtoehtoisesti tuore luuydinaspiraatti). Kivekset suositellaan kiinnitettävän upottamalla ne Bouinin tai muunneltuun Davidsonin kiinnitysaineeseen (16) (17). Tunica albugineaan on tehtävä varovasti pieni reikä neulalla elimen molempiin päihin, jotta kiinnitysaine pääsee tunkeutumaan sisään nopeasti. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä.

44. Seuraavista kudoksista voi löytyä tärkeitä merkkejä hormonitoimintaan liittyvistä vaikutuksista: sukurauhaset (munasarjat ja kivekset), avustavat sukuelimet (kohtu ja kohdunkaula, lisäkivekset, rakkularauhanen ja sen etuosa, dorsolateraalinen ja ventraalinen eturauhanen), vagina, aivolisäke, uroksen rintarauhanen sekä kilpirauhanen ja lisämunuainen. Uroksen rintarauhasten muutoksia ei ole dokumentoitu riittävästi, mutta tämä parametri voi olla hyvin herkkä aineille, joilla on estrogeenisia vaikutuksia. Niiden elinten/kudosten, joita ei ole lueteltu 43 kohdassa, havainnointi ei ole pakollista (katso lisäys 2).

45. Histopatologiaa koskevissa ohjeissa (19) on tarkempia tietoja endokriinisten kudosten dissektiosta, kiinnittämisestä, mikrotomiasta ja histopatologiasta.

46. Kansainvälisestä testiohjelmasta saatiin jonkin verran näyttöä siitä, että sellaisten kemikaalien, jotka vaikuttavat sukupuolihormonien tasapainoon vain vähän, lievät hormonitoimintaan kohdistuvat vaikutukset voidaan tunnistaa kiimasyklin synkronoinnin häiriintymisestä eri kudoksissa eikä niinkään suoraan naaraan sukupuolielinten histopatologisista muutoksista. Vaikkei tällaisista vaikutuksista saatu varmoja todisteita, on suositeltavaa ottaa huomioon todisteet kiimasyklin epäsynkroniasta, kun tulkitaan munasarjojen (follikkeli-, teeka- ja granuloosasolut), kohdun, kohdunkaulan ja vaginan histopatologiaa. Jos syklin vaihe on arvioitu vaginan irtosolunäytteestä, myös tämä tieto voidaan sisällyttää tähän vertailuun.

Histopatologia

47. Kaikkien verrokkien ja suuriannoksiseen ryhmään kuuluneiden eläinten säilytetyt elimet ja kudokset tutkitaan perusteellisesti histopatologisesti. Histopatologiset tutkimukset tulee tehdä myös kaikille muiden annostusryhmien eläimille, jos käsittelyyn liittyviä muutoksia havaitaan suuren annoksen ryhmässä.

48. Kaikki silmin havaittavat vauriot on tutkittava.

49. Mahdolliseen satelliittiryhmään kuuluvilta eläimiltä tulee tutkia histopatologisesti sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

50. Koetulokset tulee esittää yksilöidysti. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin koeryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen toksisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin.

51. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Verrattaessa vaikutusta pitoisuusalueen mukaan on vältettävä monien t-testien käyttöä. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimusasetelman suunnitteluvaiheessa.

52. Laadunvalvontaa varten on suositeltavaa kerätä vertailutietoja aiemmista tutkimuksista ja laskea vaihtelukertoimista numeeriset tiedot varsinkin sellaisista parametreista, jotka liittyvät hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseen. Näitä tietoja voidaan käyttää vertailutarkoituksiin, kun varsinaisia tutkimuksia arvioidaan.

Testiraportti

53. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa

— lajin valinnan perustelut, jos se on muu kuin rotta.

Testiolosuhteet:

— annostason valintaperustelut

— yksityiskohdat testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta, sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— testikemikaalin annostelun yksityiskohdat

— ravinnossa/juomavedessä olevan testikemikaalin määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Valinnaiset tutkitut ominaisuudet

— luettelo valinnaisista ominaisuuksista, jotka on tutkittu.

Tulokset:

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon ja tarvittaessa veden kulutus

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, mukaan lukien toksisuusoireet

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)

— arvioinnit aistitoiminnoista, tarttumaotteen voimakkuudesta ja motorisesta toiminnasta

— verikokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— kliiniset biokemialliset kokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot

— ruumiinpaino eläimen lopettamisen yhteydessä ja eri elinten painotiedot

— ruumiinavauslöydökset

— kaikkien histopatologisten löydösten seikkaperäinen kuvaus

— tiedot imeytymisestä, mikäli saatavilla

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Androgeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) tavoin.

Annos on annetun testikemikaalin määrä. Annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg päivässä) tai vakioina pidettävinä ruokavalion pitoisuuksina (ppm).

Annostelu on yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

Antiandrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen androgeenihormonin (esimerkiksi testosteronin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Antiestrogeenisuus on kemikaalin kyky estää luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

Estrogeenisuus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen estrogeenihormonin (esimerkiksi 17ß-estradiolin) tavoin.

Ilmeinen toksisuus on yleistermi, jolla tarkoitetaan testikemikaalin antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden oireita. Niitä on oltava riittävästi vaaran arviointia varten, ja niiden on oltava sellaisia, että annetun annoksen suurentamisen voidaan odottaa aiheuttavan vakavia merkkejä myrkyllisyydestä ja todennäköisesti kuolleisuutta.

Kilpirauhasen kaltainen vaikutus on kemikaalin kyky vaikuttaa nisäkkäiden organismissa luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) tavoin.

Kilpirauhasen toimintaa estävä vaikutus on kemikaalin kyky estää luonnollisen kilpirauhashormonin (esimerkiksi T_3:n) vaikutus nisäkkäiden organismissa.

NOAEL on lyhennys englanninkielisistä sanoista no-observed-adverse-effect level (taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta). Se on siis suurin annos, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Validointi on tieteellinen menettely, jonka tarkoituksena on luonnehtia testimenetelmän toiminnallisia vaatimuksia ja rajoituksia sekä osoittaa sen luotettavuus ja merkityksellisyys tiettyyn tarkoitukseen nähden.

Lisäys 2

Testimenetelmässä B.7 tutkittavat ominaisuudet hormonaalisten haitta-aineiden havaitsemiseksi

Pakolliset tutkittavat kohteet	Valinnaiset tutkittavat kohteet
Paino	
— Kivekset — Lisäkivekset — Lisämunuaiset — Eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat	— Munasarja — Kohtu ja kohdunkaula — Kilpirauhanen
Histopatologia	

— Sukupuolirauhaset:
  — Kivekset
  — Munasarjat
— Lisäsukupuolirauhaset:
  — Lisäkivekset
  — Eturauhanen + rakkularauhanen ja niiden etuosat
  — Kohtu ja kohdunkaula
— Lisämunuaiset
— Kilpirauhanen
— Vagina
	— Vaginan irtosolunäytteet
	— Urosten maitorauhaset
	— Aivolisäke

Hormonimääritys	
	— T3- ja T4-hormonien pitoisuus verenkierrossa — TSH-hormonin pitoisuus verenkierrossa

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691–704.

5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11) OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404–407.

16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, s. 52–85.

17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524–533.

18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

B.8 **SUBAKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 28 PÄIVÄN TUTKIMUS**

TIIVISTELMÄ

Tämän tarkistetun testimenetelmän B.8 tarkoituksena on luonnehtia kokonaisvaltaisesti testikemikaalin myrkyllisyyttä hengitettynä toistuvan altistuksen jälkeen tietyllä ajanjaksolla (28 päivää) ja tuottaa tietoa määrällistä riskinarviointia varten. Jyrsijäryhmät, joissa on vähintään viisi urosta ja viisi naarasta, altistetaan kuuden tunnin ajan päivittäin 28 päivän ajan a) testikemikaalille kolmella tai useammalla pitoisuudella, b) suodatetulle ilmalle (negatiivinen kontrolli) ja/tai kantaja-aineelle (kantaja-ainekontrolli). Eläimiä altistetaan yleensä viitenä päivänä viikossa, mutta myös seitsemän päivän altistus viikossa on mahdollista. Sekä uroksia että naaraita testataan aina, mutta ne voidaan altistaa eri pitoisuuksille, jos jommankumman tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille. Tässä menetelmässä tutkimuksen johtajalla on mahdollisuus sisällyttää tutkimukseen satelliittiryhmiä (vaikutusten korjaantuvuus), bronkoalveolaarinen huuhtelu (BAL), neurologisia testejä sekä muita kliiniskemiallisia ja histopatologisia arviointeja, jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia paremmin.

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 412 (2009). Alkuperäinen subakuuttia inhalaatiotestiä koskeva testiohje nro 412 (TG 412) hyväksyttiin vuonna 1981. Tätä testimenetelmää B.8 (joka vastaa tarkistettua ohjetta TG 412) on ajantasaistettu, jotta tieteellinen kehitys voidaan ottaa huomioon ja jotta nykyiset ja tulevat sääntelyvaatimukset voidaan täyttää.

2. Tämän menetelmän avulla voidaan luonnehtia haittavaikutuksia, joita seuraa toistuvasta altistumisesta testikemikaalille päivittäin hengityksen kautta 28 päivän ajan. Tietoja, jotka saadaan 28 päivän mittaisista, subakuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevista tutkimuksista, voidaan käyttää määrällisissä riskinarvioinneissa [jos niiden jälkeen ei tehdä 90 päivän tutkimusta subkroonisesta myrkyllisyydestä hengitettynä (tämän liitteen luku B.29)]. Tiedoista voi olla apua myös valittaessa pitoisuuksia pitkäkestoisempiin tutkimuksiin, kuten 90 päivän tutkimukseen, jossa tarkastellaan subkroonista myrkyllisyyttä hengitettynä. Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALUSTAVAT HUOMIOT

3. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tietoihin, joista voi olla apua asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa olevat käytöt ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista sekä akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevista testeistä saadut tulokset. Jos oletetaan tai havaitaan, että tutkimuksen aikana ilmenee neurotoksisuutta, tutkimuksen johtaja voi sisällyttää tutkimukseen asianmukaisia arviointeja, kuten toiminnallisen havaintosarjan (FOB:n) ja motorisen aktiivisuuden mittauksen. Vaikka altistuksen ajoitus voi olla kriittinen tietyissä tutkimuksissa, näiden ylimääräisten toimien toteuttaminen ei saa häiritä perustutkimuksen rakennetta.

4. Syövyttävien tai ärsyttävien testikemikaalien laimennoksia voidaan testata sellaisina pitoisuuksina, joilla saadaan aikaan haluttu myrkyllisyyden aste [katso GD 39 (2)]. Kun eläimiä altistetaan näille materiaaleille, tavoitepitoisuuksien on oltava riittävän pienet, jotta eläimille ei aiheudu suurta kipua ja stressiä, mutta kuitenkin tarpeeksi suuret, jotta pitoisuus-vastekäyrä on riittävä sääntelyyn liittyvien ja tieteellisten testaustavoitteiden saavuttamiseksi. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja niiden tulee ensisijaisesti perustua asianmukaisesti suunniteltuun annosalueen määritystestiin, josta saadaan tietoa kriittisestä tutkittavasta ominaisuudesta, ärsytysrajasta ja oireiden alkamisajankohdasta (katso 11–13 kohta). Pitoisuuden valinnalle on esitettävä perusteet.

5. Kuolemaisillaan olevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti. Kuolemaisillaan olevia eläimiä käsitellään samalla tavalla kuin eläimiä, jotka kuolevat testissä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

6. Kokeessa tulee käyttää terveitä nuoria täysikasvuisia jyrsijöitä, jotka kuuluvat yleisesti käytettyihin koe-eläinkantoihin. Suositeltavin laji on rotta. Jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

7. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Satunnaistamispäivänä eläinten on oltava nuoria ja täysikasvuisia, ja niiden iän on oltava 7–9 viikkoa. Ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Eläinten hoito

8. Eläimet on voitava erottaa toisistaan esimerkiksi ihon alle asennettavien lähettimien avulla havainnoinnin helpottamiseksi ja sekaannuksien välttämiseksi. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

Inhalaatiokammiot

9. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistustapa on vain nasaalisesti (nose-only; tähän termiin kuuluvat altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti -altistuksen ja koko kehoon kohdistuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET

Rajapitoisuudet

10. Toisin kuin akuuteissa tutkimuksissa, 28 päivän subakuuteissa tutkimuksissa, joissa tarkastellaan myrkyllisyyttä hengitettynä, ei ole määritettyjä rajapitoisuuksia. Testatun enimmäispitoisuuden osalta on otettava huomioon seuraavat seikat: 1) suurin mahdollinen pitoisuus, 2) ihmisen altistustaso pahimmassa tapauksessa, 3) tarve ylläpitää riittävä hapensyöttö ja/tai 4) eläinten hyvinvointiin liittyvät seikat. Koska tietoon perustuvia rajoja ei siis ole, voidaan käyttää asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (13) mukaisia akuutteja rajoja (ts. enimmäispitoisuus aerosolien osalta on 5 mg/l, höyryjen osalta 20 mg/l ja kaasujen osalta 20 000 ppm), ks. GD 39 (2). Jos nämä rajat täytyy ylittää esimerkiksi testattaessa kaasuja tai erittäin haihtuvia testikemikaaleja (esimerkiksi jäähdytysaineita), sille on esitettävä perustelut. Rajapitoisuudella on saatava aikaan selvä myrkyllisyys, joka ei saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

Annosalueen määritystutkimus

11. Ennen päätutkimuksen aloittamista voi olla tarpeen tehdä annosalueen määritystutkimus. Annosalueen määritystutkimus on esikoetta kattavampi, koska sitä ei ole rajattu pitoisuuden valintaan. Annosalueen määritystutkimuksesta karttunut tieto voi edistää päätutkimuksen onnistumista. Annosalueen määritystutkimuksesta voidaan saada esimerkiksi teknistä tietoa analyysimenetelmistä, hiukkasten koosta, toksisten mekanismien löytämisestä, kliinisestä patologiasta ja histopatologiasta, ja sen avulla voidaan arvioida, mitkä ovat päätutkimuksen NOAEL- ja MTC-pitoisuudet. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa annosalueen määritystutkimuksen, jotta tiedetään, mikä on hengityselimistöä ärsyttävä pitoisuus (esimerkiksi hengityselimistön histopatologia, keuhkojen toiminnan testaus tai bronkoalveolaarinen huuhtelu), mikä on siedettävän pitoisuuden yläraja, joka ei aiheuta eläimille tarpeetonta stressiä, ja millä parametreilla testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia parhaiten.

12. Annosalueen määritystutkimuksessa voi olla yksi tai useampi pitoisuustaso. Kullekin pitoisuustasolle saa altistaa enintään kolme urosta ja kolme naarasta. Annosalueen määritystutkimuksen on kestettävä vähintään viisi päivää, yleensä ei enempää kuin 14 päivää. Tutkimusraportissa on esitettävä perustelut päätutkimuksen pitoisuuksien valinnalle. Päätutkimuksen tavoite on osoittaa sellainen pitoisuus-vastesuhde, joka perustuu herkimmäksi oletettuun tutkittavaan ominaisuuteen. Pienen pitoisuuden on mielellään oltava sellainen, joka ei aiheuta havaittavia haittavaikutuksia, kun taas suuren pitoisuuden on aiheutettava selvä myrkyllisyys, joka ei kuitenkaan saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

13. Kun valitaan annosalueen määritystutkimuksen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös rakenne-aktiivisuussuhdetta koskevia tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja (katso 3 kohta). Annosalueen määritystutkimuksessa voidaan vahvistaa tai kumota se, mitä pidetään herkimpänä mekanistisesti perusteltuna tutkittavana ominaisuutena, esimerkiksi koliiniesteraasin esto organofosfaateilla, methemoglobiinin muodostus erytrosytotoksisilla aineilla, kilpirauhashormonit (T_3, T_4) kilpirauhaselle myrkyllisillä aineilla sekä proteiini, LDH tai neutrofiilit bronkoalveolaarisessa huuhtelussa vaarattomilla huonosti liukenevilla hiukkasilla tai keuhkoja ärsyttävillä aerosoleilla.

Päätutkimus

14. Subakuuttia myrkyllisyyttä koskeva päätutkimus sisältää yleensä kolme pitoisuustasoa ja tarvittaessa myös samanaikaiset negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän ja/tai kantaja-aineverrokkiryhmän (katso 17 kohta). Asianmukaisten altistustasojen valinnassa on käytettävä apuna kaikkia saatavilla olevia tietoja, mukaan luettuina tulokset systeemisistä myrkyllisyystutkimuksista sekä metabolia ja kinetiikka (erityisesti on pyrittävä välttämään suuria pitoisuuksia, joiden vuoksi kineettiset prosessit saturoituvat). Jokainen testiryhmä sisältää vähintään 10 jyrsijää (viisi urosta ja viisi naarasta), jotka altistetaan testikemikaalille kuuden tunnin ajaksi päivittäin viitenä päivänä viikossa neljän viikon ajanjaksolla (tutkimuksen kokonaiskesto on 28 päivää). Eläimet voidaan altistaa myös seitsemänä päivänä viikossa (esimerkiksi testattaessa inhaloitavia lääkkeitä). Jos jommankumman sukupuolen tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille, sukupuolet voidaan altistaa eri pitoisuuksille pitoisuus-vasteen optimoimiseksi 15 kohdassa kuvatun mukaisesti. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoja voidaan mukauttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Perustelut on esitettävä, jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä tai jos on toteutettava pitkäkestoinen (esimerkiksi 22 tuntia/päivä) koko kehoon kohdistuvan altistuksen tutkimus [katso GD 39 (2)]. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana, paitsi jos altistus kestää yli kuusi tuntia. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

15. Valituilla tavoitepitoisuuksilla tulee voida tunnistaa kohde-elin (-elimet) ja osoittaa selvä pitoisuus-vaste:

— Suurimman pitoisuuden tulee aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia, mutta ne eivät saa lievittyä tai aiheuttaa kuolleisuutta, koska se estää mielekkään arvioinnin.

— Keskisuuri pitoisuus (keskisuuret pitoisuudet) on valittava siten, että myrkylliset vaikutukset porrastuvat pienimmän ja suurimman pitoisuuden välille.

— Pienimmän pitoisuuden tulee aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan oireita myrkyllisyydestä.

Satelliittitutkimus (vaikutusten korjaantuvuus)

16. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) avulla voidaan tarkkailla myrkytysoireiden korjaantuvuutta, pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö viivästyneitä myrkytysoireita käsittelyn jälkeisellä jaksolla, jonka on oltava riittävän pitkä, vähintään kuitenkin 14 päivää. Satelliittiryhmissä (korjaantuvuusryhmissä) on viisi urosta ja viisi naarasta, jotka altistetaan samaan aikaan kuin päätutkimuksen koe-eläimet. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) ryhmät on altistettava testikemikaalille suurimmalla pitoisuudella, ja tarvittaessa tutkimuksissa on oltava rinnakkaiset ilma- ja/tai kantaja-aineverrokit (katso 17 kohta).

Verrokkieläimet

17. Rinnakkaisryhmien negatiivisia (ilma)verrokkieläimiä on käsiteltävä samalla tavalla kuin testiryhmän eläimiä muutoin paitsi että ne altistetaan suodatetulle ilmalle testikemikaalin sijasta. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna vettä tai muuta ainetta, tutkimukseen on sisällytettävä kantaja-aineverrokkiryhmä negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän sijasta. Kantaja-aineena on käytettävä vettä, mikäli mahdollista. Jos kantaja-aineena käytetään vettä, verrokkieläimet on altistettava ilmalle, jonka suhteellinen kosteus on sama kuin altistusryhmissä. Sopiva kantaja-aine on valittava asianmukaisesti toteutetun esitutkimuksen tai aiempien tietojen pohjalta. Jos kantaja-aineen myrkyllisyyttä ei tiedetä, tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää sekä negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ja kantaja-aineverrokkiryhmää, joskaan se ei ole suositeltavaa. Jos aiemmat tiedot osoittavat, että kantaja-aine on myrkytön, negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ei tarvita, ja tällöin tulee käyttää vain kantaja-aineverrokkia. Jos esitutkimus osoittaa, ettei kantaja-aineessa oleva testikemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa sitä, että kantaja-aine on myrkytön testatulla pitoisuudella, ja tällöin on käytettävä tätä kantaja-aineverrokkia.

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

18. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti hiukkaskoon pienentämisen vuoksi. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Hiukkaskokojakauma

19. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–3 µm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (4). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset ja kuidut voivat olla vaatimusta suurempia.

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

20. Testikemikaali on testattava mielellään ilman kantaja-ainetta. Jos kantaja-aineen käyttö on tarpeellista asianmukaisen testikemikaalipitoisuuden ja hiukkaskoon tuottamiseksi, on käytettävä ensisijaisesti vettä. Aina kun testikemikaali liuotetaan kantaja-aineeseen, sen stabiilius on osoitettava.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

21. Ilman virtausta altistuskammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai ajallisen stabiiliuden) reaaliaikainen seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia inhalaatioparametreja. Jos pitoisuutta seurataan reaaliajassa, ilmavirtausten mittaustaajuutta voidaan vähentää yhteen mittaukseen altistusta kohti päivässä. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisesti -altistuksen kammioissa. Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava. Jos ensimmäisenä altistuspäivänä tehdyt mittaukset osoittavat, että näiden kaasujen pitoisuus on asianmukainen, myöhemmät mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

22. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava kerran tunnissa kunkin altistuksen aikana, mikäli mahdollista. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

23. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

24. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit.

25. Jos mahdollista, koko tutkimuksen keston ajan on käytettävä yhdestä erästä peräisin olevaa testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

26. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana. Altistusolosuhteiden stabiiliuden osoittamiseen voidaan käyttää reaaliaikaista seurantalaitetta, kuten aerosolifotometria aerosoleille tai hiilivetyanalysaattoria höyryille. Kammion todellinen pitoisuus on mitattava vähintään kolme kertaa jokaisena altistuspäivänä ja jokaiselta altistustasolta. Jos se ei ole mahdollista pienen ilmavirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, yksi näyte altistuskertaa kohti hyväksytään. Tällöin tämä näyte on mielellään kerättävä koko altistuskerran ajalta. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan. Tässä otetaan huomioon hajoamiseen ja kammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95}). Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

27. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin. Sen vuoksi jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava koko seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai indikaattoriaineen (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

28. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kerran viikossa jokaisesta pitoisuudesta käyttämällä kaskadierotinta tai jotain vaihtoehtoista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, vaihtoehtoista laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan.

29. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa kaikkien pitoisuuksien osalta tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa.

30. Höyryjen osalta hiukkaskoko on määritettävä, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyryatmosfäärissä, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia.

HAVAINNOT

31. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti ennen altistusjaksoa, sen aikana ja sen jälkeen. Tiiviimpi tarkkailu voi olla aiheenmukaista sen perusteella, millainen vaste eläimille muodostuu altistuksen aikana. Kun eläinten tarkkailu ei ole mahdollista immobilisointiputkien, huonosti valaistujen koko kehon altistuskammioiden tai läpinäkymättömien ilmakehien vuoksi, eläimiä on tarkkailtava huolellisesti altistuksen jälkeen. Myrkyllisten vaikutusten korjaantuvuutta tai pahenemista voidaan arvioida ennen seuraavan päivän altistusta tehtävillä havainnoilla.

32. Kaikki havainnot kirjataan jokaisesta eläimestä erikseen. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

33. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, hermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta. Tutkimussuunnitelmaan voidaan sisällyttää muita arviointeja, kuten kinetiikka, biomonitorointi, keuhkojen toiminta, huonosti liukenevien, keuhkokudokseen kertyvien materiaalien retentio sekä käyttäytymisen muutokset.

RUUMIINPAINOT

34. Eläinyksilöiden painot on kirjattava vähän ennen ensimmäistä altistusta (päivä 0) ja sen jälkeen kahdesti viikossa (esimerkiksi perjantaisin ja maanantaisin, jotta voidaan osoittaa toipuminen altistuksettoman viikonlopun tai tietyn ajan jälkeen systeemisen toksisuuden arvioimiseksi) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä. Jos eläimessä ei ilmene vaikutuksia kahden ensimmäisen viikon aikana, ruumiinpainot voidaan punnita kerran viikossa tutkimuksen loppuun saakka. Satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläinten (jos käytössä) punnitsemista viikoittain on jatkettava koko toipumisjakson ajan. Tutkimuksen päättyessä kaikki eläimet on punnittava vähän ennen niiden lopettamista, jotta elinten ja ruumiinpainon väliset suhteet voidaan laskea ilman vääristymiä.

RAVINNON JA VEDEN KULUTUS

35. Ravinnon kulutus on mitattava viikoittain. Myös veden kulutus voidaan mitata.

KLIININEN KEMIA

36. Kaikista eläimistä, myös verrokki- ja satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläimistä, on tehtävä kliinis-kemialliset arvioinnit, kun ne lopetetaan. Altistuksen päättymisen ja verinäytteen ottamisen välinen aika on merkittävä muistiin varsinkin, jos kyseinen tutkittava ominaisuus rekonstituoituu nopeasti. Niistä parametreista, joiden puoliintumisaika plasmassa on lyhyt (esimerkiksi COHb, CHE ja MetHb), on syytä ottaa näyte heti altistuksen päätyttyä.

37. Taulukossa 1 luetellaan ne kliinis-kemialliset parametrit, jotka yleensä vaaditaan kaikissa toksikologisissa tutkimuksissa. Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta. Jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voitaisiin luonnehtia tarkemmin, tutkimuksen johtaja voi päättää arvioida myös muita parametreja (esimerkiksi koliiniesteraasi, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini tai Heinzin kappaleet, kreatiinikinaasi, myelosyyttien ja punasolujen suhde, troponiinit, valtimoverikaasut, laktaattidehydrogenaasi, sorbitolidehydrogenaasi, glumaattidehydrogenaasi ja gammaglutamyylitranspeptidaasi).

Taulukko 1

Kliinis-kemialliset vakioparametrit

Hematologia	
Punasolujen määrä	Valkosolujen kokonaismäärä
Hematokriitti	Valkosolujen erittely
Hemoglobiinipitoisuus	Verihiutaleiden määrä
Keskihemoglobiini (MCH)	Hyytymisominaisuudet (valittava yksi):
Punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV)	— Protrombiiniaika
Keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC)	— Hyytymisaika
Retikulosyytit	— Partiaalinen tromboplastiiniaika

Kliininen kemia	
Glukoosi (*)	Alaniiniaminotransferaasi
Kokonaiskolesteroli	Aspartaattiaminotransferaasi
Triglyseridit	Alkaalifosfataasi
Veren ureatyppi	Kalium
Kokonaisbilirubiini	Natrium
Kreatiniini	Kalsium
Kokonaisproteiini	Fosfori
Albumiini	Kloridi
Globuliini	
Virtsa-analyysi (valinnainen)	
Ulkonäkö (väri ja sameus)	Kokonaisproteiini
Määrä	Glukoosi
Ominaistiheys tai osmolaliteetti	Veri/verisolut
pH	

(*) Koska pitkähkö paastojakso voi vääristää glukoosinmittauksen tuloksia (käsitellyt eläimet vs. verrokkieläimet), tutkimuksen johtajan on päätettävä, onko eläinten pitäminen ravinnotta tarpeen. Jos paastojaksoa käytetään, sen on oltava käytetyille lajeille sopiva, esimerkiksi rotalle paastoajan pituus voi olla 16 h (ravinnotta yli yön). Paastoverensokeri voidaan määrittää yli yön toteutetun paaston jälkeen viimeisellä altistusviikolla tai yli yön paastoamisen jälkeen ennen ruumiinavausta (jälkimmäisessä tapauksessa on määritettävä myös kaikki muut kliinis-kemialliset parametrit).

38. Jos on todisteita siitä, että alemmat hengitystiet (esimerkiksi keuhkorakkulat) ovat ensisijainen kertymä- ja retentiopaikka, bronkoalveolaarinen huuhtelu voi olla sopiva tekniikka analysoida määrällisesti hypoteesiperusteiset annos-vaikutus-parametrit, jotka kohdistuvat keuhkorakkulatulehdukseen, keuhkotulehdukseen ja fosfolipidoosiin. Tämän avulla voidaan testata annosvaste ja keuhkorakkuloiden vaurioiden ajalliset muutokset. Huuhtelunesteestä voidaan analysoida valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erottelu, kokonaisproteiini ja laktaattidehydrogenaasi. Lisäksi voidaan analysoida parametreja, jotka viittaavat lysosomien vaurioihin, fosfolipidoosiin, fibroosiin sekä ärsytyksen aiheuttamaan tai allergiseen tulehdukseen, johon voi sisältyä esitulehduksellisten sytokiinien/kemokiinien määritys. Bronkoalveolaariseen huuhteluun perustuvat mittaukset yleensä täydentävät histopatologisten tutkimusten tuloksia mutta eivät korvaa niitä. Ohjeita keuhkohuuhtelun tekemisestä on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

MAKROSKOOPPISET MUUTOKSET JA ELINTEN PAINOT

39. Kaikille koe-eläimille, myös kokeen aikana kuolleille tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetuille ja tutkimuksesta poistetuille, on tehtävä täydellinen verenlasku ja ruumiinavaus. Jokaisen eläimen viimeisen altistuksen ja lopetuksen välinen aika on merkittävä muistiin. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kun eläimen on havaittu kuolleen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

40. Taulukossa 2 on lueteltu kaikki elimet ja kudokset, jotka on säilytettävä sopivassa aineessa histopatologista tutkimusta varten. [Hakasulkeisiin] merkittyjen elinten ja kudosten säilyttämisestä päättää tutkimuksen johtaja. **Lihavoidut** elimet ja kudokset on puhdistettava ja punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen välttämiseksi. Kilpirauhanen ja lisäkivekset on punnittava vain tarvittaessa, koska puhdistuksen aiheuttamat vahingot voivat estää histopatologisen arvioinnin. Kudokset ja elimet on kiinnitettävä 10-prosenttisella puskuroidulla formaliinilla tai muulla sopivalla kiinnitysaineella heti ruumiinavauksen jälkeen, vähintään 24–48 tuntia ennen puhdistusta sen mukaan, mitä kiinnitysainetta käytetään.

Taulukko 2

Ruumiinavauksen aikana säilöttävät elimet ja kudokset

Lisämunuaiset	Rakkularauhaset
Luuydin (ja/tai tuore aspiraatti)	Selkäydin (kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	**Perna**
[Silmät (verkkokalvo, silmähermo) ja silmäluomet]	Maha
Sydän	**Kivekset**
Munuaiset	**Kateenkorva**
Kurkunpää (kolmesta kohdasta, joista yhden on oltava kurkunkansi)	Kilpirauhanen
Maksa	Henkitorvi (vähintään kahdesta kohdasta siten, että mukana on yksi pitkittäinen leikkaus harjun läpi ja yksi poikittainen leikkaus)
Keuhkot (kaikki lohkot yhdestä kohdasta, mukaan luettuina pääkeuhkoputket)	[Virtsarakko]
Imusolmukkeet keuhkoportin alueelta etenkin huonosti liukenevien hiukkasmaisten testikemikaalien yhteydessä. Tarkempia kokeita ja/tai tutkimuksia, joissa keskitytään immunologiaan, voidaan käyttää myös muita imusolmukkeita esimerkiksi välikarsinan, servikaaliselta/submandibulaariselta ja/tai aurikulaariselta alueelta.	Kohtu
Nenänielun kudokset (vähintään neljästä kohdasta, yhden kohdan on oltava nenänielukanava ja NALT-imukudos (Nasal Associated Lymphoid Tissue)	Kaikki suuret leesiot
Ruokatorvi	
[Hajurauhanen]	
Munasarjat	

41. Keuhkot on poistettava kokonaisina, punnittava ja täytettävä sopivalla kiinnitysaineella 20–30 cm:n syvyisen veden paineessa, jotta niiden rakenne säilyy (5). Leikkeet on kerättävä kaikista lohkoista yhdestä kohdasta pääkeuhkoputket mukaan luettuina, mutta jos tehdään keuhkohuuhtelu, huuhtelemattomasta lohkosta on otettava leikkeet kolmesta kohdasta (ei sarjaleikkeitä).

42. Nenänielun kudoksista on tutkittava vähintään neljästä kohdasta otetut näytteet, joista yhden on oltava nenänielukanava (5, 6, 7, 8, 9), jotta levyepiteeli, välimuotoinen epiteeli (värekarvaton hengitysepiteeli), hengitysepiteeli (värekarvallinen), hajuepiteeli sekä imukudos (NALT; 10, 11) voidaan tutkia. Kurkunpäästä on tutkittava kolmesta kohdasta otetut leikkeet, ja yhden niistä on oltava kurkunpään kansi (12). Henkitorvesta on tutkittava vähintään kahdesta kohdasta otetut leikkeet, joista toisen on oltava pitkittäinen leike ekstrapulmonaalisten keuhkoputkien ja henkitorven harjun haarautuman läpi ja toisen poikittaisleike.

HISTOPATOLOGIA

43. Histopatologinen arviointi on tehtävä kaikkien taulukossa 2 lueteltujen elinten ja kudosten osalta niin verrokkiryhmästä kuin suuren pitoisuuden ryhmästä sekä kaikista eläimistä, jotka kuolevat tai jotka lopetetaan tutkimuksen aikana. Erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteihin, kohde-elimiin ja näkyviin vammoihin. Ne elimet ja kudokset, joissa suuren pitoisuuden ryhmän eläimillä on leesioita, on tutkittava kaikista ryhmistä. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa histopatologiset arvioinnit myös muista ryhmistä selvän pitoisuusvasteen osoittamiseksi. Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä (korjaantuvuus), sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä, on tutkittava histopatologisesti. Jos suuren pitoisuuden ryhmässä on hyvin paljon varhaisia kuolemantapauksia tai muita ongelmia, jotka vaarantavat tietojen merkityksellisyyden, seuraava pienemmän pitoisuuden ryhmä on tutkittava histopatologisesti. Silmämääräisten havaintojen ja mikroskooppisten löydösten välille on pyrittävä löytämään korrelaatio.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

44. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava seuraavat tiedot: ruumiinpaino, ravinnonkulutus, kliinis-kemialliset tiedot, makroskooppiset muutokset sekä histopatologiset löydökset. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset. Kaikki tulokset, niin määrälliset kuin satunnaiset, on arvioitava sopivalla tilastomenetelmällä. Kaikkia yleisesti hyväksyttyjä tilastomenetelmiä voi käyttää, ja ne on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

Testiraportti

45. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle tietoja lähteestä ja aiemmin saatuja tietoja voi ilmoittaa, jos ne koskevat eläimiä, jotka on altistettu samankaltaisessa altistuksessa ja joiden asumis- ja paasto-olosuhteet ovat olleet samat

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— yksityiskohtainen kuvaus inhalaatiokammiosta, mukaan luettuina tilavuus ja kaavakuva

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilman lähde ja ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti kammiossa (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— tulo- ja poistoilman käsittely

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuusmuutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin kokonaismassa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava mieluummin massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.) kuin tilavuusyksikköinä (ppm, ppb jne.)

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä

— (mieluiten kaavion sisältävä) kuvaus testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— yksityiskohdat kammion lämpötilan, kosteuden ja ilmanvirtauksen seuraamiseen käytetystä laitteistosta (esimerkiksi kalibrointikäyrän laatiminen)

— yksityiskohdat kammion pitoisuuden ja hiukkaskokojakauman määrittämisessä tarvittavien näytteiden keräämiseen tarkoitetusta laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— satunnaistamismenetelmä, jolla eläimet jaettiin testi- ja verrokkiryhmiin

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— kunkin eläimen vastetulosten ja pitoisuustason taulukot (ts. eläimet, joilla ilmeni toksisuusoireita, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste, alkamisajankohta ja kesto)

— taulukko kunkin eläimen painoista

— taulukko ravinnonkulutuksesta

— taulukko kliinis-kemiallisista tiedoista

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— taulukko muista mitatuista parametreista.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittämiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Kohde-elin (-elimet) on määritettävä.

— NOAEL- ja LOAEL-arvot on määritettävä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos."

5) Korvataan luvut B.29 ja B.30 seuraavasti:

"B.29 **SUBKROONINEN MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ: 90 PÄIVÄN TUTKIMUS**

TIIVISTELMÄ

Tämän tarkistetun testimenetelmän B.29 tarkoituksena on luonnehtia kokonaisvaltaisesti testikemikaalin myrkyllisyyttä hengitettynä toistuvan altistuksen jälkeen tietyllä ajanjaksolla (90 päivää) ja tuottaa yksityiskohtaista tietoa määrällistä riskinarviointia varten. Jyrsijäryhmät, joissa on vähintään kymmenen urosta ja kymmenen naarasta, altistetaan kuuden tunnin ajan päivittäin 90 päivän (13 viikon) ajan a) testikemikaalille kolmella tai useammalla pitoisuudella, b) suodatetulle ilmalle (negatiivinen kontrolli) ja/tai kantaja-aineelle (kantaja-ainekontrolli). Eläimiä altistetaan yleensä viitenä päivänä viikossa, mutta myös seitsemän päivän altistus viikossa on mahdollista. Sekä uroksia että naaraita testataan aina, mutta ne voidaan altistaa eri pitoisuuksille, jos jommankumman tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille. Tässä menetelmässä tutkimuksen johtajalla on mahdollisuus sisällyttää tutkimukseen satelliittiryhmiä (vaikutusten korjaantuvuus), eläinten lopettamista tutkimuksen aikana, bronkoalveolaarinen huuhtelu (BAL), neurologisia testejä sekä muita kliinis-kemiallisia ja histopatologisia arviointeja, jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia paremmin.

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta TG 413 (2009). Alkuperäinen subkroonista inhalaatiotestiä koskeva testiohje nro 413 (TG 413) hyväksyttiin vuonna 1981. Tätä testimenetelmää B.29 (joka vastaa tarkistettua ohjetta TG 413 (2009)) on ajantasaistettu, jotta tieteellinen kehitys voidaan ottaa huomioon ja jotta nykyiset ja tulevat sääntelyvaatimukset voidaan täyttää.

2. Subkroonisia tutkimuksia, joissa tarkastellaan aineen myrkyllisyyttä hengitettynä, käytetään pääasiassa lakisääteisten pitoisuuksien johtamiseen, jotta on mahdollista arvioida työntekijälle työssä aiheutuva riski. Tutkimuksia käytetään myös ihmisten asumiseen, kuljetukseen ja ympäristöön liittyvän riskin arvioinnissa. Tämän menetelmän avulla voidaan luonnehtia haittavaikutuksia, joita seuraa toistuvasta altistumisesta testikemikaalille päivittäin hengityksen kautta 90 päivän ajan (noin 10 prosenttia rotan elinajasta). Subkroonisia hengitysmyrkyllisyyttä tarkastelevia tutkimuksia voidaan käyttää myös määrällisissä riskinarvioinneissa ja kroonisten tutkimusten pitoisuuksien valinnassa. Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat tämän luvun lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

ALUSTAVAT HUOMIOT

3. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tietoihin, joista voi olla apua asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Jos oletetaan tai havaitaan, että tutkimuksen aikana ilmenee neurotoksisuutta, tutkimuksen johtaja voi sisällyttää tutkimukseen asianmukaisia arviointeja, kuten toiminnallisen havaintosarjan (FOB:n) ja motorisen aktiivisuuden mittauksen. Vaikka altistuksen ajoitus voi olla kriittinen tietyissä tutkimuksissa, näiden ylimääräisten toimien toteuttaminen ei saa häiritä perustutkimuksen rakennetta.

4. Syövyttävien tai ärsyttävien testikemikaalien laimennoksia voidaan testata sellaisina pitoisuuksina, joilla saadaan aikaan haluttu myrkyllisyyden aste. Katso lisätietoja ohjeasiakirjasta GD 39 (2). Kun eläimiä altistetaan näille materiaaleille, tavoitepitoisuuksien on oltava riittävän pienet, jotta eläimille ei aiheudu suurta kipua ja stressiä, mutta kuitenkin tarpeeksi suuret, jotta pitoisuus-vastekäyrä on riittävä sääntelyyn liittyvien ja tieteellisten testaustavoitteiden saavuttamiseksi. Nämä pitoisuudet on valittava tapauskohtaisesti, ja niiden tulee ensisijaisesti perustua asianmukaisesti suunniteltuun annosalueen määritystestiin, josta saadaan tietoa kriittisestä tutkittavasta ominaisuudesta, ärsytysrajasta ja oireiden alkamisajankohdasta (katso 11–13 kohta). Pitoisuuden valinnalle on esitettävä perusteet.

5. Kuolemaisillaan olevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti. Kuolemaisillaan olevia eläimiä käsitellään samalla tavalla kuin eläimiä, jotka kuolevat testissä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

6. Kokeessa tulee käyttää terveitä nuoria täysikasvuisia jyrsijöitä, jotka kuuluvat yleisesti käytettyihin koe-eläinkantoihin. Suositeltavin laji on rotta. Jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

7. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Satunnaistamispäivänä eläinten on oltava nuoria ja täysikasvuisia, ja niiden iän on oltava 7–9 viikkoa. Ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin.

Eläinten hoito

8. Eläimet on voitava erottaa toisistaan esimerkiksi ihon alle asennettavien lähettimien avulla havainnoinnin helpottamiseksi ja sekaannuksien välttämiseksi. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

Inhalaatiokammiot

9. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistustapa on vain nasaalisesti (nose-only; tähän termiin kuuluvat altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti -altistuksen ja koko kehoon kohdistuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET

Rajapitoisuudet

10. Toisin kuin akuuteissa tutkimuksissa, subkroonisissa tutkimuksissa, joissa tarkastellaan myrkyllisyyttä hengitettynä, ei ole määritettyjä rajapitoisuuksia. Testatun enimmäispitoisuuden osalta on otettava huomioon seuraavat seikat: 1) suurin mahdollinen pitoisuus, 2) ihmisen altistustaso pahimmassa tapauksessa, 3) tarve ylläpitää riittävä hapensyöttö ja/tai 4) eläinten hyvinvointiin liittyvät seikat. Koska tietoon perustuvia rajoja ei siis ole, voidaan käyttää asetuksen (EY) N:o 1272/2008 (13) mukaisia akuutteja rajoja (ts. enimmäispitoisuus aerosolien osalta on 5 mg/l, höyryjen osalta 20 mg/l ja kaasujen osalta 20 000 ppm), ks. GD 39 (2). Jos nämä rajat täytyy ylittää esimerkiksi testattaessa kaasuja tai erittäin haihtuvia testikemikaaleja (esimerkiksi jäähdytysaineita), sille on esitettävä perustelut. Rajapitoisuudella on saatava aikaan selvä myrkyllisyys, joka ei saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

Annosalueen määritystutkimus

11. Ennen päätutkimuksen aloittamista on yleensä tarpeen tehdä annosalueen määritystutkimus. Annosalueen määritystutkimus on esikoetta kattavampi, koska sitä ei ole rajattu pitoisuuden valintaan. Annosalueen määritystutkimuksesta karttunut tieto voi edistää päätutkimuksen onnistumista. Annosalueen määritystutkimuksesta voidaan saada esimerkiksi teknistä tietoa analyysimenetelmistä, hiukkasten koosta, toksisten mekanismien löytämisestä, kliinisestä patologiasta ja histopatologiasta, ja sen avulla voidaan arvioida, mitkä ovat päätutkimuksen NOAEL- ja MTC-pitoisuudet. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa annosalueen määritystutkimuksen, jotta tiedetään, mikä on hengityselimistöä ärsyttävä pitoisuus (esimerkiksi hengityselimistön histopatologia, keuhkojen toiminnan testaus tai bronkoalveolaarinen huuhtelu), mikä on siedettävän pitoisuuden yläraja, joka ei aiheuta eläimille tarpeetonta stressiä, ja millä parametreilla testikemikaalin myrkyllisyyttä voidaan luonnehtia parhaiten.

12. Annosalueen määritystutkimuksessa voi olla yksi tai useampi pitoisuustaso. Valittujen tutkittavien ominaisuuksien mukaan kullekin pitoisuustasolle on altistettava 3–6 urosta ja 3–6 naarasta. Annosalueen määritystutkimuksen on kestettävä vähintään viisi päivää, yleensä ei enempää kuin 28 päivää. Tutkimusraportissa on esitettävä perustelut päätutkimuksen pitoisuuksien valinnalle. Päätutkimuksen tavoite on osoittaa sellainen pitoisuus-vastesuhde, joka perustuu herkimmäksi oletettuun tutkittavaan ominaisuuteen. Pienen pitoisuuden on mielellään oltava sellainen, joka ei aiheuta havaittavia haittavaikutuksia, kun taas suuren pitoisuuden on aiheutettava selvä myrkyllisyys, joka ei kuitenkaan saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta stressiä tai vaikuttaa niiden pitkäikäisyyteen (3).

13. Kun valitaan annosalueen määritystutkimuksen pitoisuustasoja, on käytettävä kaikkea saatavilla olevaa tietoa, myös rakenne-aktiivisuussuhdetta koskevia tietoja ja samanlaisia kemikaaleja koskevia tietoja (katso 3 kohta). Annosalueen määritystutkimuksessa voidaan vahvistaa tai kumota se, mitä pidetään herkimpänä mekanistisesti perusteltuna päätepisteenä, esimerkiksi koliiniesteraasin esto organofosfaateilla, methemoglobiinin muodostus erytrosytotoksisilla aineilla, kilpirauhashormonit (T_3, T_4) kilpirauhaselle myrkyllisillä aineilla sekä proteiini, LDH tai neutrofiilit bronkoalveolaarisessa huuhtelussa vaarattomilla huonosti liukenevilla hiukkasilla tai keuhkoja ärsyttävillä aerosoleilla.

Päätutkimus

14. Subkroonista myrkyllisyyttä koskeva päätutkimus sisältää yleensä kolme pitoisuustasoa ja tarvittaessa myös samanaikaiset negatiivisen (ilma)verrokin ja/tai kantaja-aineverrokin (katso 18 kohta). Asianmukaisten altistustasojen valinnassa on käytettävä apuna kaikkia saatavilla olevia tietoja, mukaan luettuina tulokset systeemisistä myrkyllisyystutkimuksista sekä metabolia ja kinetiikka (erityisesti on pyrittävä välttämään suuria pitoisuuksia, joiden vuoksi kineettiset prosessit saturoituvat). Jokainen testiryhmä sisältää 10 urosjyrsijää ja 10 naarasjyrsijää, jotka altistetaan testikemikaalille kuuden tunnin ajaksi päivittäin viitenä päivänä viikossa 13 viikon ajanjaksolla (tutkimuksen kokonaiskesto on vähintään 90 päivää). Eläimet voidaan altistaa myös seitsemänä päivänä viikossa (esimerkiksi testattaessa inhaloitavia lääkkeitä). Jos jommankumman sukupuolen tiedetään olevan herkempi tietylle testikemikaalille, sukupuolet voidaan altistaa eri pitoisuuksille pitoisuus-vasteen optimoimiseksi 15 kohdassa kuvatun mukaisesti. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoja voidaan mukauttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Perustelut on esitettävä, jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä tai jos on toteutettava pitkäkestoinen (esimerkiksi 22 tuntia/päivä) koko kehoon kohdistuvan altistuksen tutkimus (katso GD 39) (2). Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana, paitsi jos altistus kestää yli kuusi tuntia. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

15. Valituilla tavoitepitoisuuksilla tulee voida tunnistaa kohde-elin (-elimet) ja osoittaa selvä pitoisuus-vaste:

— Suurimman pitoisuuden tulee aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia, mutta ne eivät saa lievittyä tai aiheuttaa kuolleisuutta, koska se estää mielekkään arvioinnin.

— Keskisuuri pitoisuus (keskisuuret pitoisuudet) on valittava siten, että myrkylliset vaikutukset porrastuvat pienimmän ja suurimman pitoisuuden välille.

— Pienimmän pitoisuuden tulee aiheuttaa vain vähän tai ei lainkaan oireita myrkyllisyydestä.

Eläinten lopettaminen tutkimuksen aikana

16. Jos eläimiä suunnitellaan lopetettavaksi tutkimuksen aikana, eläinten lukumäärää kullakin altistustasolla on lisättävä lopetettujen eläinten lukumäärää vastaavasti ennen tutkimuksen päättämistä. Tutkimuksen aikana tapahtuville lopetuksille on esitettävä perustelut, ja niistä on laadittava myös asianmukaiset tilastolliset analyysit.

Satelliittitutkimus (vaikutusten korjaantuvuus)

17. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) avulla voidaan tarkkailla myrkytysoireiden korjaantuvuutta, pysyvyyttä sekä sitä, esiintyykö viivästyneitä myrkytysoireita käsittelyn jälkeisellä jaksolla, jonka on oltava riittävän pitkä, vähintään kuitenkin 14 päivää. Satelliittiryhmissä (korjaantuvuusryhmissä) on 10 urosta ja 10 naarasta, jotka altistetaan samaan aikaan kuin päätutkimuksen koe-eläimet. Satelliittitutkimuksen (korjaantuvuustutkimuksen) ryhmät on altistettava testikemikaalille suurimmalla pitoisuudella, ja tarvittaessa tutkimuksissa on oltava rinnakkaiset ilma- ja/tai kantaja-aineverrokit (katso 18 kohta).

Verrokkieläimet

18. Rinnakkaisryhmien negatiivisia (ilma)verrokkieläimiä on käsiteltävä samalla tavalla kuin testiryhmän eläimiä muutoin paitsi että ne altistetaan suodatetulle ilmalle testikemikaalin sijasta. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna vettä tai muuta ainetta, tutkimukseen on sisällytettävä kantaja-aineverrokkiryhmä negatiivisen (ilma)verrokkiryhmän sijasta. Kantaja-aineena on käytettävä vettä, mikäli mahdollista. Jos kantaja-aineena käytetään vettä, verrokkieläimet on altistettava ilmalle, jonka suhteellinen kosteus on sama kuin altistusryhmissä.

Sopiva kantaja-aine on valittava asianmukaisesti toteutetun esitutkimuksen tai aiempien tietojen pohjalta. Jos kantaja-aineen myrkyllisyyttä ei tiedetä, tutkimuksen johtaja voi päättää käyttää sekä negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ja kantaja-aineverrokkiryhmää, joskaan se ei ole suositeltavaa. Jos aiemmat tiedot osoittavat, että kantaja-aine on myrkytön, negatiivista (ilma)verrokkiryhmää ei tarvita, ja tällöin tulee käyttää vain kantaja-aineverrokkia. Jos esitutkimus osoittaa, ettei kantaja-aineessa oleva testikemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa sitä, että kantaja-aine on myrkytön testatulla pitoisuudella, ja tällöin on käytettävä tätä kantaja-aineverrokkia.

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

19. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti, jotta hiukkaskokoa voidaan pienentää. Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Hiukkaskokojakauma

20. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–3 µm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (4). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset ja kuidut voivat olla vaatimusta suurempia.

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

21. Testikemikaali on testattava mielellään ilman kantaja-ainetta. Jos kantaja-aineen käyttö on tarpeellista asianmukaisen testikemikaalipitoisuuden ja hiukkaskoon tuottamiseksi, on käytettävä ensisijaisesti vettä. Aina kun testikemikaali liuotetaan kantaja-aineeseen, sen stabiilius on osoitettava.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

22. Ilman virtausta altistuskammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai ajallisen stabiiliuden) reaaliaikainen seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa kaikkia oleellisia dynaamisia inhalaatioparametreja. Jos pitoisuutta seurataan reaaliajassa, ilmavirtausten mittaustaajuutta voidaan vähentää yhteen mittaukseen altistusta kohti päivässä. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisesti -altistuksen kammioissa. Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava. Jos ensimmäisenä altistuspäivänä tehdyt mittaukset osoittavat, että näiden kaasujen pitoisuus on asianmukainen, myöhemmät mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

23. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava kerran tunnissa kunkin altistuksen aikana, mikäli mahdollista. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

24. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: todellinen pitoisuus

25. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit.

26. Jos mahdollista, koko tutkimuksen keston ajan on käytettävä yhdestä erästä peräisin olevaa testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin joiltain osin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

27. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana. Altistusolosuhteiden stabiiliuden osoittamiseen voidaan käyttää reaaliaikaista seurantalaitetta, kuten aerosolifotometria aerosoleille tai hiilivetyanalysaattoria höyryille. Kammion todellinen pitoisuus on mitattava vähintään kolme kertaa jokaisena altistuspäivänä ja jokaiselta altistustasolta. Jos se ei ole mahdollista pienen ilmavirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, yksi näyte altistuskertaa kohti hyväksytään. Tällöin tämä näyte on mielellään kerättävä koko altistuskerran ajalta. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan. Tässä otetaan huomioon hajoamiseen ja kammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95}). Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

28. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin. Sen vuoksi jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava koko seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai indikaattoriaineen (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

29. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kerran viikossa jokaisesta pitoisuudesta käyttämällä kaskadierotinta tai jotain vaihtoehtoista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, vaihtoehtoista laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan.

30. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (2)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa kaikkien pitoisuuksien osalta tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi on pyrittävä minimoimaan epävarmat tiedot, jotta altistusta ei tarvitse toistaa.

31. Höyryjen osalta hiukkaskoko on määritettävä, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyryatmosfäärissä, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia.

HAVAINNOT

32. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti ennen altistusjaksoa, sen aikana ja sen jälkeen. Tiiviimpi tarkkailu voi olla aiheenmukaista sen perusteella, millainen vaste eläimille muodostuu altistuksen aikana. Kun eläinten tarkkailu ei ole mahdollista immobilisointiputkien, huonosti valaistujen koko kehon altistuskammioiden tai läpinäkymättömien ilmakehien vuoksi, eläimiä on tarkkailtava huolellisesti altistuksen jälkeen. Myrkyllisten vaikutusten korjaantuvuutta tai pahenemista voidaan arvioida ennen seuraavan päivän altistusta tehtävillä havainnoilla.

33. Kaikki havainnot kirjataan jokaisesta eläimestä erikseen. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

34. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, hermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta. Tutkimussuunnitelmaan voidaan sisällyttää muita arviointeja, kuten kinetiikka, biomonitorointi, keuhkojen toiminta, huonosti liukenevien, keuhkokudokseen kertyvien materiaalien retentio sekä käyttäytymisen muutokset.

RUUMIINPAINOT

35. Eläinyksilöiden painot on kirjattava vähän ennen ensimmäistä altistusta (päivä 0) ja sen jälkeen kahdesti viikossa (esimerkiksi perjantaisin ja maanantaisin, jotta voidaan osoittaa toipuminen altistuksettoman viikonlopun tai tietyn ajan jälkeen systeemisen toksisuuden arvioimiseksi) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä. Jos eläimessä ei ilmene vaikutuksia neljän ensimmäisen viikon aikana, ruumiinpainot voidaan punnita kerran viikossa tutkimuksen loppuun saakka. Satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläinten (jos käytössä) punnitsemista viikoittain on jatkettava koko toipumisjakson ajan. Tutkimuksen päättyessä kaikki eläimet on punnittava vähän ennen niiden lopettamista, jotta elinten ja ruumiinpainon väliset suhteet voidaan laskea ilman vääristymiä.

RAVINNON JA VEDEN KULUTUS

36. Ravinnon kulutus on mitattava viikoittain. Myös veden kulutus voidaan mitata.

KLIININEN KEMIA

37. Kaikista eläimistä, myös verrokki- ja satelliittiryhmän (korjaantuvuusryhmän) eläimistä, on tehtävä kliinis-kemialliset arvioinnit, kun ne lopetetaan. Altistuksen päättymisen ja verinäytteen ottamisen välinen aika on merkittävä muistiin varsinkin, jos kyseinen tutkittava ominaisuus rekonstituoituu nopeasti. Niistä parametreista, joiden puoliintumisaika plasmassa on lyhyt (esimerkiksi COHb, CHE ja MetHb), on syytä ottaa näyte heti altistuksen päätyttyä.

38. Taulukossa 1 luetellaan ne kliinis-kemialliset parametrit, jotka yleensä vaaditaan kaikissa toksikologisissa tutkimuksissa. Virtsa-analyysia ei yleensä tarvita. Se tehdään silloin, kun oletettu tai todettu myrkyllisyys antaa siihen aihetta. Jotta testikemikaalin myrkyllisyyttä voitaisiin luonnehtia tarkemmin, tutkimuksen johtaja voi päättää arvioida myös muita parametreja (esimerkiksi koliiniesteraasi, lipidit, hormonit, happo-emästasapaino, methemoglobiini tai Heinzin kappaleet, kreatiinikinaasi, myelosyyttien ja punasolujen suhde, troponiinit, valtimoverikaasut, laktaattidehydrogenaasi, sorbitolidehydrogenaasi, glumaattidehydrogenaasi ja gammaglutamyylitranspeptidaasi).

Taulukko 1

Kliinis-kemialliset vakioparametrit

Hematologia	
Punasolujen määrä	Valkosolujen kokonaismäärä
Hematokriitti	Valkosolujen erittely
Hemoglobiinipitoisuus	Verihiutaleiden määrä
Keskihemoglobiini (MCH)	Hyytymisominaisuudet (valittava yksi):
Punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV)	— Protrombiiniaika
Keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC)	— Hyytymisaika
Retikulosyytit	— Partiaalinen tromboplastiiniaika

Kliininen kemia	
Glukoosi (*)	Alaniiniaminotransferaasi
Kokonaiskolesteroli	Aspartaattiaminotransferaa–si
Triglyseridit	Alkaalifosfataasi
Veren ureatyppi	Kalium
Kokonaisbilirubiini	Natrium
Kreatiniini	Kalsium
Kokonaisproteiini	Fosfori
Albumiini	Kloridi
Globuliini	
Virtsa-analyysi (valinnainen)	
Ulkonäkö (väri ja sameus)	Kokonaisproteiini
Määrä	Glukoosi
Ominaistiheys tai osmolaliteetti	Veri/verisolut
pH	

(*) Koska pitkähkö paastojakso voi vääristää glukoosinmittauksen tuloksia (käsitellyt eläimet vs. verrokkieläimet), tutkimuksen johtajan on päätettävä, onko eläinten pitäminen ravinnotta tarpeen. Jos paastojaksoa käytetään, sen on oltava käytetyille lajeille sopiva, esimerkiksi rotalle paastoajan pituus voi olla 16 h (ravinnotta yli yön). Paastoverensokeri voidaan määrittää yli yön toteutetun paaston jälkeen viimeisellä altistusviikolla tai yli yön paastoamisen jälkeen ennen ruumiinavausta (jälkimmäisessä tapauksessa on määritettävä myös kaikki muut kliinis-kemialliset parametrit).

39. Jos on todisteita siitä, että alemmat hengitystiet (esimerkiksi keuhkorakkulat) ovat ensisijainen kertymä- ja retentiopaikka, bronkoalveolaarinen huuhtelu voi olla sopiva tekniikka analysoida määrällisesti hypoteesiperusteiset annos-vaikutus-parametrit, jotka kohdistuvat keuhkorakkulatulehdukseen, keuhkotulehdukseen ja fosfolipidoosiin. Tämän avulla voidaan testata annosvaste ja keuhkorakkuloiden vaurioiden ajalliset muutokset. Huuhtelunesteestä voidaan analysoida valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erottelu, kokonaisproteiini ja laktaattidehydrogenaasi. Lisäksi voidaan analysoida parametreja, jotka viittaavat lysosomien vaurioihin, fosfolipidoosiin, fibroosiin sekä ärsytyksen aiheuttamaan tai allergiseen tulehdukseen, johon voi sisältyä esitulehduksellisten sytokiinien/kemokiinien määritys. Bronkoalveolaariseen huuhteluun perustuvat mittaukset yleensä täydentävät histopatologisten tutkimusten tuloksia mutta eivät korvaa niitä. Ohjeita keuhkohuuhtelun tekemisestä on ohjeasiakirjassa GD 39 (2).

OFTALMOLOGINEN TUTKIMUS

40. Kaikilta eläimiltä on tutkittava silmänpohjat, taittavat väliaineet, värikalvot ja sidekalvot oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin antamista ja testin lopussa kaikilta suuren annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään kuuluvilta eläimiltä. Jos silmissä havaitaan muutoksia, kaikki muiden ryhmien eläimet on tutkittava, myös satelliittiryhmä (korjaantuvuusryhmä).

MAKROSKOOPPISET MUUTOKSET JA ELINTEN PAINOT

41. Kaikille koe-eläimille, myös kokeen aikana kuolleille tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetuille ja tutkimuksesta poistetuille, on tehtävä täydellinen verenlasku ja ruumiinavaus. Jokaisen eläimen viimeisen altistuksen ja lopetuksen välinen aika on merkittävä muistiin. Jos ruumiinavausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

42. Taulukossa 2 on lueteltu kaikki elimet ja kudokset, jotka on säilytettävä sopivassa aineessa histopatologista tutkimusta varten. [Hakasulkeisiin] merkittyjen elinten ja kudosten säilyttämisestä päättää tutkimuksen johtaja. **Lihavoidut** elimet ja kudokset on puhdistettava ja punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen välttämiseksi. Kilpirauhanen ja lisäkivekset on punnittava vain tarvittaessa, koska puhdistuksen aiheuttamat vahingot voivat estää histopatologisen arvioinnin. Kudokset ja elimet on kiinnitettävä 10-prosenttisella puskuroidulla formaliinilla tai muulla sopivalla kiinnitysaineella heti ruumiinavauksen jälkeen, vähintään 24–48 tuntia ennen puhdistusta sen mukaan, mitä kiinnitysainetta käytetään.

Taulukko 2

Ruumiinavauksen aikana säilöttävät elimet ja kudokset

Lisämunuaiset	Ruokatorvi
Aortta	[Hajurauhanen]
Luuydin (ja/tai tuore aspiraatti)	**Munasarjat**
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Haima
Umpisuoli	Lisäkilpirauhanen
Paksusuoli	Ääreishermo (lonkka- tai säärihermo, mieluiten lihaksen läheltä)
Pohjukaissuoli	Aivolisäke
[**Lisäkivekset**]	Eturauhanen
[Silmät (verkkokalvo, silmähermo) ja silmäluomet]	Peräsuoli
Reisiluu ja polvinivel	Sylkirauhaset
Sappirakko (jos olemassa)	Rakkularauhaset
[Harderin rauhaset]	Iho
Sydän	Selkäydin (kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)
Sykkyräsuoli	**Perna**
Tyhjäsuoli	Rintalasta
Munuaiset	Maha
[Kyynelrauhaset (ekstraorbitaalisesti)]	Hampaat
Kurkunpää (kolmesta kohdasta, joista yhden oltava kurkunkansi)	**Kivekset**
Maksa	**Kateenkorva**
Keuhkot (kaikki lohkot yhdestä kohdasta, mukaan luettuina pääkeuhkoputket)	**Kilpirauhanen**
Imusolmukkeet keuhkoportin alueelta etenkin huonosti liukenevien hiukkasmaisten testikemikaalien yhteydessä. Tarkempia kokeita ja/tai tutkimuksia, joissa keskitytään immunologiaan, voidaan käyttää myös muita imusolmukkeita esimerkiksi välikarsinan, servikaaliselta/submandibulaariselta ja/tai aurikulaariselta alueelta.	[Kieli]
	Henkitorvi (vähintään kahdesta kohdasta siten, että mukana on yksi pitkittäinen leike harjun läpi ja yksi poikittainen leike)
	[Virtsanjohdin]
Imusolmukkeet (distaalisesti aineen antokohdasta)	[Virtsaputki]
Rintarauhanen (naaras)	Virtsarakko
Lihas (reisi)	**Kohtu**
Nenänielun kudokset (vähintään neljästä kohdasta, yhden kohdan on oltava nenänielukanava ja NALT-imukudos (Nasal Associated Lymphoid Tissue)	Kohde-elimet
	Kaikki silmin havaittavat vauriot ja mitat

43. Keuhkot on poistettava kokonaisina, punnittava ja täytettävä sopivalla kiinnitysaineella 20–30 cm:n syvyisen veden paineessa, jotta niiden rakenne säilyy (5). Leikkeet on kerättävä kaikista lohkoista yhdestä kohdasta pääkeuhkoputket mukaan luettuina, mutta jos tehdään keuhkohuuhtelu, huuhtelemattomasta lohkosta on otettava leikkeet kolmesta kohdasta (ei sarjaleikkeitä).

44. Nenänielun kudoksista on tutkittava vähintään neljästä kohdasta otetut näytteet, joista yhden on oltava nenänielukanava (5) (6) (7) (8) (9), jotta levyepiteeli, välimuotoinen epiteeli (värekarvaton hengitysepiteeli), hengitysepiteeli (värekarvallinen), hajuepiteeli sekä imukudos (NALT) (10) (11) voidaan tutkia. Kurkunpäästä on tutkittava kolmesta kohdasta otetut leikkeet, ja yhden niistä on oltava kurkunpään kansi (12). Henkitorvesta on tutkittava vähintään kahdesta kohdasta otetut leikkeet, joista toisen on oltava pitkittäinen leike ekstrapulmonaalisten keuhkoputkien ja henkitorven harjun haarautuman läpi ja toisen poikittaisleike.

HISTOPATOLOGIA

45. Histopatologinen arviointi on tehtävä kaikkien taulukossa 2 lueteltujen elinten ja kudosten osalta niin verrokkiryhmästä kuin suuren pitoisuuden ryhmästä sekä kaikista eläimistä, jotka kuolevat tai jotka lopetetaan tutkimuksen aikana. Erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteihin, kohde-elimiin ja näkyviin vammoihin. Ne elimet ja kudokset, joissa suuren pitoisuuden ryhmän eläimillä on leesioita, on tutkittava kaikista ryhmistä. Tutkimuksen johtaja voi päättää toteuttaa histopatologiset arvioinnit myös muista ryhmistä selvän pitoisuusvasteen osoittamiseksi. Kun tutkimukseen sisältyy satelliittiryhmä (korjaantuvuus), sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä, on tutkittava histopatologisesti. Jos suuren pitoisuuden ryhmässä on hyvin paljon varhaisia kuolemantapauksia tai muita ongelmia, jotka vaarantavat tietojen merkityksellisyyden, seuraava pienemmän pitoisuuden ryhmä on tutkittava histopatologisesti. Silmämääräisten havaintojen ja mikroskooppisten löydösten välille on pyrittävä löytämään korrelaatio.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

46. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava seuraavat tiedot: ruumiinpaino, ravinnonkulutus, kliinispatologiset tiedot, makroskooppiset muutokset sekä histopatologiset löydökset. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, toksisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset. Kaikki tulokset, niin määrälliset kuin satunnaiset, on arvioitava sopivalla tilastomenetelmällä. Kaikkia yleisesti hyväksyttyjä tilastomenetelmiä voi käyttää, ja ne on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

Testiraportti

47. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle tietoja lähteestä ja aiemmin saatuja tietoja voi ilmoittaa, jos ne koskevat eläimiä, jotka on altistettu samankaltaisessa altistuksessa ja joiden asumis- ja paasto-olosuhteet ovat olleet samat

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— yksityiskohtainen kuvaus inhalaatiokammiosta, mukaan luettuina tilavuus ja kaavakuva

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilman lähde ja ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti kammiossa (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— tulo- ja poistoilman käsittely

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuuden muutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin kokonaismassa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava mieluummin massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.) kuin tilavuusyksikköinä (ppm, ppb jne.)

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät; yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä

— (mieluiten kaavion sisältävä) kuvaus testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— yksityiskohdat kammion lämpötilan, kosteuden ja ilmanvirtauksen seuraamiseen käytetystä laitteistosta (esimerkiksi kalibrointikäyrän laatiminen)

— yksityiskohdat kammion pitoisuuden ja hiukkaskokojakauman määrittämisessä tarvittavien näytteiden keräämiseen tarkoitetusta laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— satunnaistamismenetelmä, jolla eläimet jaettiin testi- ja verrokkiryhmiin

— tiedot ravinnon ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— kunkin eläimen vastetulosten ja pitoisuustason taulukot (ts. eläimet, joilla ilmeni toksisuusoireita, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste, alkamisajankohta ja kesto)

— taulukko kunkin eläimen painoista

— taulukko ravinnonkulutuksesta

— taulukko kliinis-kemiallisista tiedoista

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittämiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallista vaikutustapaa (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (3) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

— Kohde-elin (-elimet) on määritettävä.

— NOAEL- ja LOAEL-arvot on määritettävä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4) Whalan.E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229–258.

6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.

7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353–372.

10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219–224.

11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140–141: 281–285.

12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419–428.

13) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

B.30 **KROONISET MYRKYLLISYYSTUTKIMUKSET**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 452 (2009). Alkuperäinen testiohje nro 452 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.30 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (1) (2) (3) (4). Tämän testimenetelmän B.30 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.32 (Karsinogeenisuustesti) ja luvun B.33 (Yhdistetty krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuustesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa.

2. Koska valtaosa kroonisista myrkyllisyystutkimuksista tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos näitä tutkimuksia on tehtävä muilla lajeilla kuin jyrsijöillä, tässä testimenetelmässä kuvattujen periaatteiden ja menetelmien lisäksi voidaan soveltaa myös tässä liitteessä olevassa luvussa B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (5) kuvattuja periaatteita ja menetelmiä asianmukaisin muutoksin, kuten OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (Kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelu ja toteutus) (6) on määritelty.

3. Kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistumisreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistusreitti kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa. Vaikka pitkäaikaiset myrkyllisyystutkimukset, joissa altistus tapahtuu ihon tai hengitysteiden kautta, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta -antoreitistä aiheutuvan kroonisen myrkyllisyyden määrittämiseen ja arviointiin, on pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta hengitysteiden (6) (7) ja ihon kautta (6). Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa, joka koskee akuuttia testausta hengitysteiden kautta (7). Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (10).

5. Kroonisesta myrkyllisyystutkimuksesta saadaan tietoa terveyshaitoista, joita käytetylle lajille todennäköisesti aiheutuu toistuvasta altistuksesta niiden elinkaaren suurimman osan aikana. Tutkimuksesta saadaan tietoa myös testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista, kohde-elimistä ja kemikaalin mahdollisesta kertymisestä. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Sitä voidaan käyttää määritettäessä turvallisuuskriteerejä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien tutkimusten tavoitteita ovat seuraavat:

   — Testikemikaalin kroonisen myrkyllisyyden määrittäminen

   — Kohde-elinten tunnistaminen

   — Annos-vaste-suhteen luonnehtiminen

   — NOAEL-arvon (tason, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta.

   — Kroonisten myrkyllisyysvaikutusten ennustaminen ihmisten altistumistasoilla

   — Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (6).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin myrkyllisiä ominaisuuksia, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että mahdollista kroonista myrkyllisyyttä voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tiedot vaikutustavasta, *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsittelevistä tutkimuksista saadut tiedot. Krooninen myrkyllisyys on määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu alustavia tietoja 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä, joissa on käytetty toistuvia annoksia. Kroonisen myrkyllisyystestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (11) (12) (13) (14).

8. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. Tässä yhteydessä on pohdittava, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus ja analyysi, jos testi päättyy yhden tai useamman ryhmän osalta ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (6) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia.

9. Kroonisia myrkyllisyystutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: "Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta."

10. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (6) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (17) (18). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on oleellista varsinkin tilanteessa, kun on määrä toteuttaa yhdistetty kroonista myrkyllisyyttä ja karsinogeenisuutta koskeva tutkimus (tämän liitteen luku B.33) (11 kohta).

11. Erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämä testimenetelmä B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta on harkittava yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.33) toteuttamista. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus (tämän liitteen luku B.33), on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (9 ja 20–25 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia.

12. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

TESTIN PERIAATE

13. Testikemikaalia annetaan useille koe-eläinryhmille erisuuruisina annoksina joka päivä yleensä 12 kuukauden ajan, joskin on mahdollista valita tätä pidempi tai lyhyempi aika sääntelyvaatimusten mukaisesti (katso 33 kohta). Tämän pituisen ajan katsotaan olevan riittävän pitkä, jotta mahdolliset kumulatiivisen myrkyllisyyden vaikutukset tulevat esiin ilman geriatristen muutosten häiritseviä vaikutuksia. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on sitä lyhyempi. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta, mutta myös hengitysteiden tai ihon kautta testaus voi olla asianmukaista. Tutkimussuunnitelmaan voi myös sisältyä yksi tai useampi eläinten lopettamiskerta kesken kokeen esimerkiksi kolmen ja kuuden kuukauden kohdalla, ja tutkimukseen voidaan ottaa lisää eläinryhmiä tämän kompensoimiseksi (katso 19 kohta). Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin myrkyllisyyteen viittaavien oireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

14. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän kroonisen myrkyllisyyden määrittämistä ja arviointia (katso 2 kohta), joskin samanlaiset tutkimukset muilla kuin jyrsijöillä saattavat olla tarpeen tietyn lainsäädännön nojalla. Lajin valinta on perusteltava. Tarvittaessa muilla lajeilla kuin jyrsijöillä tehtävät krooniset myrkyllisyystutkimukset on suunniteltava ja toteutettava tässä testimenetelmässä kuvattujen sekä tämän liitteen luvussa B.27 (Oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) kuvattujen periaatteiden mukaisesti Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

15. Tässä testimenetelmässä suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiirtä, voidaan käyttää. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koeeläinkantoja. Kroonisessa myrkyllisyystutkimuksessa on käytettävä eläimiä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin kestoltaan lyhyemmässä alustavassa myrkyllisyystutkimuksessa (alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa). Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

16. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (19) (20) (21). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien määrän on oltava mahdollisimman pieni. Tällaisia kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on ilmoitettava analyyttiset tiedot tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

17. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen. Eläimet tulee jakaa verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

18. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Kun tutkimuksessa käytetään jyrsijöitä, jokaisella annostasolla on käytettävä yleensä vähintään 20:tä eläintä kumpaakin sukupuolta. Kun tutkimuksessa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, suositeltava määrä on vähintään neljä eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimuksissa, joissa käytetään hiiriä, kuhunkin annosryhmään saatetaan tarvita enemmän eläimiä, jotta kaikki vaadittavat hematologiset määritykset saadaan tehtyä.

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen sekä satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

19. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen (vähintään 10 eläintä/sukupuoli/ryhmä) esimerkiksi kuuden kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa toksikologisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Tutkimukseen voidaan sisällyttää myös satelliittiryhmiä, jotta tutkittavana olevan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta voidaan

seurata. Nämä ryhmät rajataan yleensä tutkimuksen suurimman annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (22). Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken tutkimuksen tai jos tutkimukseen aiotaan sisällyttää satelliittiryhmiä tai erityisvalvonnassa olevien eläinten ryhmiä, tutkimussuunnitelman mukaista eläinten määrää on lisättävä niiden eläinten määrällä, jotka on määrä lopettaa ennen tutkimuksen päättymistä. Näitä eläimiä on yleensä tarkkailtava samalla tavalla kuin päätutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa käytettäviä eläimiä: niiden ruumiinpainoa ja ravinnon-/vedenkulutusta on tarkkailtava ja hematologiset ja kliinis-biokemialliset mittaukset sekä patologiset tutkimukset on tehtävä. Mittaukset voidaan rajata (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmissä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen.

Annosryhmät ja annostus

20. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (6). Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja samanaikaista verrokkiryhmää, paitsi jos tehdään rajatesti (katso 27 kohta). Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

21. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohdeelimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimyksiä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Kun otetaan huomioon jäljempänä 22 kohdassa esitetyt tekijät, suurin annos on valittava siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla).

22. Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon. Suurin annos saa olla enintään 1 000 mg painokiloa kohti päivässä (raja-annos, katso 27 kohta).

23. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi viiteannos pienimmällä annostasolla (katso 25 kohta)) perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle.

24. Valittu annostason porrastus määräytyy testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset–nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

25. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (6) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ihmisten ennakoituja altistumistasoja koskeva pohdinta.

26. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

27. Jos esitutkimuksista saatujen tietojen perusteella voidaan olettaa, ettei yksi annostaso, joka on vähintään 1 000 mg painokiloa kohti päivässä ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, todennäköisesti aiheuta haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla kemikaaleilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Tätä rajaa (1 000 mg painokiloa kohti päivässä) sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

28. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (6). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis- kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

29. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

30. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

31. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä joka viikko) yleensä 12 kuukauden ajan (katso myös 33 kohta), joskin tätä pidempi aika voi olla tarpeen sääntelyvaatimusten perusteella. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen B.9 luvussa (10) on täsmennetty, vähintään 12 kuukauden ajan. Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakso on yleensä 12 kuukautta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (8).

32. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (22). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

33. Vaikka tämä testimenetelmä on tarkoitettu ensisijaisesti 12 kuukauden mittaiseen krooniseen myrkyllisyystutkimukseen, tutkimussuunnitelman mukaan testimenetelmää on mahdollista soveltaa joko lyhyempiin (esimerkiksi kuusi tai yhdeksän kuukautta) tai pitempiin (esimerkiksi 18 tai 24 kuukautta) tutkimuksiin tietyn lainsäädännön nojalla tai tiettyjen mekanististen tarkoitusten perusteella. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on tätä lyhyempi. Tutkimukseen sisältyville satelliittiryhmille, joiden avulla seurataan tutkittavan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta, ei saa antaa testikemikaalia vähintään neljään viikkoon eikä pidempään kuin kolmanneksen tutkimuksen kokonaiskestosta altistuksen päätyttyä. Lisää ohjeita ja tietoa eloonjäämisen käsittelystä tutkimuksessa on ohjeasiakirjassa GD 116 (6).

HAVAINNOT

34. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä aamuin illoin joka päivä myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Kliinisiä yleishavaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen.

35. Kaikista eläimistä on tehtävä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilanteeseen), tutkimuksen ensimmäisen viikon päätteeksi ja kerran kuukaudessa sen jälkeen. Havainnointi on toteutettava siten, että yksittäisten havainnoijien välinen vaihtelu on mahdollisimman pientä ja testiryhmästä riippumatonta. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella mieluiten vakioalueella samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. On pyrittävä varmistamaan, että havainnointiolosuhteissa on mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja ovat mm. ihon, karvapeitteen, silmien ja limakalvojen muutokset sekä sisäeritteiden, kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko ja epätavallinen hengitys) esiintyminen. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (24).

36. Kaikille eläimille on tehtävä silmätutkimus oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin ensimmäistä antokertaa. Tutkimuksen päätteeksi tämä tutkimus on tehtävä mieluiten kaikille eläimille, mutta vähintään suuren annoksen ryhmässä ja verrokkiryhmässä. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, kaikki eläimet on tutkittava. Jos rakenteellinen analyysi tai muut tiedot viittaavat silmiin kohdistuvaan myrkyllisyyteen, silmätutkimuksia on tehtävä useammin.

37. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan neurotoksisia vaikutuksia, voidaan lisäksi arvioida aistien reaktiivisuus erityyppisille ärsykkeille (24) (esimerkiksi kuulon, näön tai asentotunnon kautta välittyville ärsykkeille) (25), (26), (27), tarttumaotteen voimakkuus (28) ja motorinen toiminta (29) ennen tutkimuksen aloittamista ja kolmen kuukauden välein sen jälkeen, kunnes tutkimus on kestänyt 12 kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittauksissa mainittuja toimenpiteitä voidaan käyttää.

38. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan immunotoksisia vaikutuksia, tätä tutkittavaa ominaisuutta koskevat tarkemmat tutkimukset voidaan tehdä tutkimuksen päättyessä.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

39. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun kemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

Hematologia ja kliininen biokemia

40. Tutkimuksissa, joissa käytetään jyrsijöitä, hematologiset tutkimukset on tehtävä vähintään kymmenelle urokselle ja kymmenelle naaraalle kutakin ryhmää kohti, kun tutkimus on kestänyt kolme, kuusi ja kaksitoista kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Kaikissa verikokeissa on käytettävä samoja eläimiä. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut hematologiset määritykset saadaan tehtyä (katso 18 kohta). Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos hematologisissa parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa.

41. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (30): valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, punasolujen määrä, verihiutaleiden määrä, hemoglobiinipitoisuus, hematokriitti (punasolujen tilavuusosuus), punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV), keskihemoglobiini (MCH), keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC), protrombiiniaika ja aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika. Muita hematologisia parametreja (kuten Heinzin kappaleet, epätyypillinen punasolujen morfologia tai methemoglobiini) voidaan tarvittaessa mitata testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti. Jos testikemikaali vaikuttaa verta muodostavaan järjestelmään, retikulosyyttien määrän ja luuytimen sytologinen tutkimus voi olla aiheenmukaista, joskaan sitä ei tarvitse tehdä rutiininomaisesti.

42. Kliinis-biokemialliset määritykset tärkeimpien myrkyllisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan vähintään kymmeneltä urokselta ja kymmeneltä naaraalta jokaisesta ryhmästä hematologisia tutkimuksia varten määritetyin aikavälein käyttäen aina samoja eläimiä. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut kliinis- biokemialliset määritykset saadaan tehtyä. Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos kliinisen biokemian parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Eläinten ruokinnan siirtämistä yön yli (hiiriä lukuun ottamatta) ennen verinäytteen ottoa suositellaan. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (30): glukoosi, virtsa (virtsan typpi), kreatiniini, kokonaisproteiini, albumiini, kalsium, natrium, kalium, kokonaiskolesteroli, vähintään kaksi hepatosellulaariseen arviointiin sopivaa testiä (alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, glutamaattidehydrogenaasi, kokonaissappihapot) (31), ja vähintään kaksi hepatobiliaariseen arviointiin sopivaa testiä (alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitransferaasi, 5'-nukleotidaasi, kokonaisbilirubiini, kokonaissappihapot) (31). Muita kliinis-kemiallisia parametreja, kuten paastotriglyseridit, tietyt hormonit ja koliiniesteraasi, voidaan mitata tarvittaessa testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti.

43. Virtsa-analyysit on tehtävä vähintään kymmeneltä urokselta ja kymmeneltä naaraalta ryhmää kohti näytteistä, jotka otetaan samoina aikoina kuin hematologiset ja kliinis-kemialliset näytteet. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä, jos virtsa-analyysissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Seuraava parametriluettelo on kliinis-patologisia tutkimuksia koskevan asiantuntijasuosituksen mukainen (30): ulkonäkö, tilavuus, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH, kokonaisproteiini ja glukoosi. Muita määrityksiä ovat ketoaineet, urobilinogeeni, bilirubiini ja piilevä veri. Myös muita parametreja voidaan tarvittaessa käyttää, jos havaitun vaikutuksen (havaittujen vaikutusten) tutkimusta on laajennettava.

44. Koiratutkimuksissa lähtötilanteen hematologiset ja kliinis-biokemialliset muuttujat on yleensä määritettävä ennen käsittelyn aloittamista, mutta jyrsijätutkimuksissa niitä ei tarvitse määrittää (30). Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömät (katso 50 kohta), näiden tietojen hankkimista on harkittava.

Patologia

Ruumiinavaustutkimukset

45. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Mittaukset voidaan kuitenkin määrätä rajattavaksi (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmässä tai satelliittiryhmässä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen (katso 19 kohta). Näille eläimille ei tarvitse tehdä ruumiinavausta eikä jäljempänä olevissa kohdissa kuvattuja toimenpiteitä. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella.

46. Elinten painotiedot on kerättävä kaikilta eläimiltä lukuun ottamatta 45 kohdan jälkimmäisessä osassa lueteltuja eläimiä. Lisämunuaiset, aivot, lisäkivekset, sydän, munuaiset, maksa, munasarjat, perna, kivekset ja kilpirauhanen (punnittava kiinnityksen jälkeen lisäkilpirauhasten kanssa) on puhdistettava niihin kiinnittyvistä kudoksista tarkoituksenmukaisella tavalla, ja elinten märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi. Tutkimuksessa, jossa käytetään hiiriä, lisämunuaisten punnitseminen ei ole pakollista.

47. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (32) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]

Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailta; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilta)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengityksen kautta altistuksen yhteydessä hengityselimistön säilytettyjen ja tutkittujen kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9). Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

48. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (32). Vähintään seuraavat histopatologiset tutkimukset on tehtävä:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— kohdekudokset tai kudokset, joissa oli käsittelyyn liittyviä muutoksia suuren annoksen ryhmässä; kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä

— parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

49. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni toksisia vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

50. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

51. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (8 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

Testiraportti

52. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen):

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, mukaan lukien toksisuusoireet

— kliinisten havaintojen luonne, ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos se on pisteytetty) ja kesto (väliaikaisuus/pysyvyys)

— silmätutkimus

— hematologiset testit

— kliinisen biokemian testit

— virtsa-analyyttiset testit

— neurotoksisuutta tai immunotoksisuutta koskevien tutkimusten tulokset

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset

— kaikkien käsittelyyn liittyvien histopatologisten löydösten seikkaperäinen kuvaus

— tiedot imeytymisestä, mikäli saatavilla.

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— annos-vastesuhteet

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— aiemmat vertailutiedot

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145–191.

4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

5) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä)

6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

8) Tämän liitteen luku B.8 (Subakuutti myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus)

9) Tämän liitteen luku B.29 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus)

10) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet))

11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam.&Appl. Toxicol. 29: 198–201.

31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos."

---

6) Korvataan luvut B.32 ja B.33 seuraavasti:

"B.32 **KARSINOGEENISUUSTUTKIMUKSET**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 451 (2009). Alkuperäinen karsinogeenisuustestejä koskeva testiohje nro 451 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.32 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (2) (3) (4) (5) (6). Tämän testimenetelmän B.32 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.30 (Krooninen myrkyllisyystesti) ja luvun B.33 (Yhdistetty krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuustesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä B.32 on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa. Todettakoon kuitenkin, että jotkin yksityiskohdat ja vaatimukset saattavat erota lääkkeitä koskevista vaatimuksista (katso kansainvälisen harmonisointikonferenssin (ICH:n) ohje S1B lääkkeiden karsinogeenisuuden testauksesta).

2. Koska valtaosa karsinogeenisuustesteistä tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos tällaisia tutkimuksia on tehtävä muilla kuin jyrsijöillä, on noudatettava tässä testimenetelmässä esitettyjä sekä tässä liitteessä olevan luvun B.27 (Toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) mukaisia periaatteita ja menettelyjä asianmukaisin muutoksin. Lisää ohjeita on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

3. Karsinogeenisuustutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistusreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistustapa karsinogeenisuustutkimuksissa. Vaikka karsinogeenisuustutkimukset, joihin sisältyy ihon tai hengitysteiden kautta altistus, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta altistuksesta aiheutuvan karsinogeenisuuden määrittämiseen ja arviointiin, voi olla pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja jne. koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta ihon (7) ja hengitysteiden (7) (8) kautta. Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa (8), joka koskee altistusta hengitysteiden kautta. Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (11).

5. Karsinogeenisuustutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvasta altistuksesta todennäköisesti seuraa ja jotka kestävät jopa käytettyjen lajien koko eliniän ajan. Tutkimuksesta saadaan tietoa testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista ja mahdollisesta karsinogeenisuudesta, ja sen avulla saatetaan tunnistaa kohde-elimet ja kemikaalin mahdollinen kertyminen. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Ei-genotoksisten karsinogeenien osalta voidaan määrittää kasvainvasteet, joita voidaan käyttää laadittaessa turvallisuuskriteereitä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien karsinogeenisuustutkimusten tavoitteet ovat seuraavat:

   — Testikemikaalin sellaisten karsinogeenisten ominaisuuksien tunnistaminen, jotka lisäävät kasvainten ilmaantuvuutta tai pahanlaatuisten kasvainten määrää tai vähentävät kasvainten syntymiseen kuluvaa aikaa verrattuna samanaikaisiin vertailuryhmiin.

   — Karsinogeenisuuden kohde-elimen (-elinten) tunnistaminen.

   — Kasvainten ilmaantumiseen kuluvan ajan määrittäminen

— Kasvaimen annos-vastesuhteen luonnehtiminen.

— NOAEL-arvon (tason, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta.

— Karsinogeenisten vaikutusten ekstrapolointi ihmisten altistumistasoihin pienillä annoksilla.

— Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin karsinogeenisia ominaisuuksia, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että mahdollista karsinogeenisuutta voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Epäillyn karsinogeenin vaikutustapaa koskevat tiedot ja niiden ottaminen huomioon (2) (7) (12) (13) (14) (15) on erittäin tärkeää, koska paras tutkimusmenetelmä voi vaihdella sen mukaan, tiedetäänkö vai epäilläänkö testikemikaalin olevan genotoksinen karsinogeeni. Lisätietoa vaikutustapaa koskevista huomioista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

8. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro-* tai *in vivo* -myrkyllisyystestien ja genotoksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot, mutageenisuus/genotoksisuustiedot, karsinogeenisuustiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Karsinogeenisuus on määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu alustavia tietoja toistetuilla annoksilla suoritetuista 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä. Lyhytaikaiset testit, joissa tutkitaan syövän puhkeamista ja etenemistä, voivat antaa myös hyödyllistä tietoa. Karsinogeenisuustestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (16) (17) (18) (19).

9. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. On pohdittava sitä, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus, kumulatiivisten kasvainriskien analyysi suhteessa eloonjäämisen pituuteen, kasvaimen ilmaantumiseen kuluvaa aikaa koskeva analyysi sekä analyysi, joka on tehtävä, jos testi keskeytyy yhdessä tai useammassa ryhmässä ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia (20).

10. Karsinogeenisuustutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa nro 19 (turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) (21) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: ”Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta.”

11. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (22) (23). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on oleellista varsinkin tilanteessa, kun on määrä toteuttaa yhdistetty kroonista myrkyllisyyttä ja karsinogeenisuutta koskeva tutkimus (tämän liitteen luku B.33) (12 kohta).

12. Erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämän liitteen luku B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta on harkittava yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.33) toteuttamista. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus (tämän liitteen luku B.33), on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (11 ja 22–25 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia.

13. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

TESTIN PERIAATE

14. Testikemikaalia annostellaan päivittäin erisuuruisina annoksina useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta yleensä suun kautta. Testaus voi olla tarkoituksenmukaista myös hengitysteiden tai ihon kautta. Eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyyden merkkien ja neoplastisten leesioiden kehittymisen havaitsemiseksi. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

15. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän karsinogeenisuuden määrittämistä ja arviointia (katso 2 kohta). Muiden lajien kuin jyrsijöiden käyttöä voidaan harkita, kun saatavilla olevat tiedot viittaavat siihen, että muut lajit ovat oleellisempia ihmisten terveyteen kohdistuvien vaikutusten ennustamisessa. Lajin valinta on perusteltava. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiiriä, voidaan käyttää. Vaikka hiiren käyttämisestä karsinogeenisuustestauksessa koituva hyöty voi olla rajallinen (24) (25) (26), jotkin sääntelyohjelmat edellyttävät karsinogeenisuustestien tekemistä hiirellä, ellei päätetä, että tällainen tutkimus on tieteellisesti tarpeeton. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa nro 116 (7).

16. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Karsinogeenisuustutkimus on tehtävä mieluiten eläimillä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin lyhyemmissä alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa. Jos kyseisestä kannasta ja lähteestä peräisin olevien eläinten kuitenkin tiedetään aiheuttavan ongelmia pitkäaikaisissa tutkimuksissa yleensä käytettävien hyväksyttyjen eloonjäämiskriteerien täyttämisessä [katso ohjeasiakirja GD 116 (7)], on harkittava sellaisen eläinkannan käyttämistä, jonka eloonjäämisaste pitkäaikaisessa tutkimuksessa on hyväksyttävä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (27) (28) (29). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien määrän on oltava mahdollisimman pieni. Kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on annettava analyyttista tietoa tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

18. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen. Eläimet tulee jakaa verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

19. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Sen vuoksi jokaisessa annosryhmässä ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä on oltava vähintään 50 eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, mikä on tutkimuksen tavoite, keskeisten estimaattien tilastollista voimaa on mahdollista lisätä jakamalla eläimet eri annosryhmiin eri tavoin epätasaisesti siten, että pienen annoksen ryhmissä on yli 50 eläintä esimerkiksi sen vuoksi, että voidaan arvioida kemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta pienillä annoksilla. On kuitenkin muistettava, että jos ryhmäkokoa kasvatetaan vain jonkin verran, tutkimuksen tilastollinen voima lisääntyy suhteellisen vähän. Lisätietoa tutkimuksen tilastollisesta suunnittelusta ja annostasojen valinnasta tilastollisen voiman maksimoimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

20. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen esimerkiksi 12 kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa neoplastisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Jos tutkimussuunnitelmaan sisältyy kesken tutkimuksen tapahtuvia lopettamisia, kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten määrä jokaisessa annosryhmässä on yleensä 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimussuunnitelman mukaista eläinten kokonaismäärää on lisättävä ennen tutkimuksen päättymistä lopetettavaksi aiottujen eläinten määrällä. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (30). Lisätietoja on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

Annosryhmät ja annostus

21. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja yhtä samanaikaista verrokkiryhmää. Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

22. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohdeelimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimystä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Kun otetaan huomioon jäljempänä 23 kohdassa esitetyt tekijät, suurin annos on yleensä valittava siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla). Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon.

23. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja – testikemikaalin vaikutustavan mukaan – NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi BMD-arvo (katso 25 kohta) pienimmän annoksen tasolla) saavuttamisen perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle.

24. Valittu annostason porrastus määräytyy testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

25. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (7) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ihmisten ennakoituja altistumistasoja koskeva pohdinta.

26. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

27. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

28. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

29. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

30. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä viikossa), jyrsijöillä yleensä 24 kuukauden ajan (katso myös 32 kohta). Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen B.9 luvussa (11) on täsmennetty, vähintään 24 kuukauden ajan. Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakso on yleensä 24 kuukautta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (9).

31. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (31). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

32. Jyrsijöiden osalta tutkimus kestää yleensä 24 kuukautta, mikä on valtaosa käytettävien eläinten normaalista elinajasta. Tutkimus voi olla tätä pidempi tai lyhyempi sen mukaan, mikä on tutkimuksessa käytettävän eläinlajin kannan elinaika, mutta tämä on kuitenkin perusteltava. Tietyille hiirikannoille, joita ovat esimerkiksi AKR/J, C3H/J tai C57BL/6J, 18 kuukauden mittainen tutkimus voi olla sopivampi. Ohjeita tutkimuksen kestosta, päättymisestä ja tutkimuksessa havaitun eloonjäämisen käsittelemisestä sekä lisäohjeita negatiivisen karsinogeenisuuden hyväksyttävyydestä suhteessa tutkimuksessa ilmenneeseen eloonjäämiseen on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

— Tutkimuksen lopettamista on harkittava, kun eloonjääneiden eläinten määrä pienemmän annoksen ryhmissä tai verrokkiryhmässä on pienempi kuin 25 prosenttia.

— Jos vain suuren annoksen ryhmä kuolee ennenaikaisesti myrkyllisyyden vuoksi, tutkimusta ei tule lopettaa.

— Eloonjäämistä on käsiteltävä kummankin sukupuolen osalta erikseen.

— Tutkimusta ei tule jatkaa sen jälkeen, kun tutkimuksesta saatavat tiedot eivät enää riitä tilastollisesti validin arvioinnin tekemiseen.

HAVAINNOT

33. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä jokaisen päivän aamulla ja illalla myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Lisäksi eläimet on tutkittava kerran päivässä toksikologisesti merkityksellisten erityisten merkkien havaitsemiseksi. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä kasvainten kehittymiseen. Jokaisen paljain silmin tai käsin tunnustelemalla havaittavissa olevan kasvaimen toteamisaika, paikka, koko, ulkonäkö ja kehitys on kirjattava.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

34. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

Hematologia, kliininen biokemia ja muut mittaukset

35. Jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa erityisesti vaikutustapaa koskevia pohdintoja varten, eläimiltä voidaan ottaa tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä varten. Myös virtsa-analyysi voi olla tarpeen. Lisätietoa tällaisten näytteiden ottamisen hyödyllisyydestä osana karsinogeenisuustutkimusta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Tarvittaessa verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä ja virtsa-analyysia varten voidaan ottaa kesken tutkimuksen tapahtuvien lopetusten yhteydessä (20 kohta) ja tutkimuksen päättyessä vähintään 10 eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa, ja niitä on tarvittaessa säilytettävä asianmukaisissa olosuhteissa. Verinäytteet voidaan valmistella myös tutkimusta varten etenkin, jos kohde-elin vaikuttaa olevan luuydin, joskin tällaisen tutkimuksen arvoa mahdollisen karsinogeenisuuden/onkogeenisuuden arvioinnissa on pidetty kyseenalaisena (32).

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

36. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille paitsi erityisvalvonnassa oleville eläimille (katso 20 kohta) on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella. Yleensä elinten painot eivät kuulu karsinogeenisuutta käsittelevään tutkimukseen, koska geriatriset muutokset ja myöhemmissä vaiheissa kasvainten kehittyminen mitätöivät elinten painoa koskevien tietojen käyttökelpoisuuden. Nämä tiedot voivat kuitenkin olla erittäin tärkeitä näyttöön perustuvan arvioinnin toteuttamisessa ja etenkin vaikutustapaa koskevissa pohdinnoissa. Jos ne ovat osa satelliittitutkimusta, ne on kerättävä viimeistään vuoden kuluttua tutkimuksen aloittamisesta.

37. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (33) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös elimet, joita pidetään testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköisinä kohde-eliminä, on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengitysteiden kautta altistumista koskevien tutkimusten yhteydessä hengityselimistön säilytettävien ja tutkittavien kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen luvussa B.8 (8) ja luvussa B.29 (9) annettuja suosituksia. Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

38. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (33). Vähintään seuraavat kudokset on tutkittava:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— Jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä histopatologisia muutoksia, samat kudokset on tutkittava kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä.

— Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

39. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni toksisia vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

40. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

41. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (9 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

Testiraportti

42. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen)

Yleiset tiedot

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat, jos ne on tehty, sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksikokineettiset tiedot (jos saatavilla)

— silmätutkimuksen tiedot (jos saatavilla)

— hematologiset tiedot (jos saatavilla)

— kliinis-biokemialliset tiedot (jos saatavilla).

Kliiniset löydökset

— myrkyllisyyden merkit

— kaikkien poikkeavuuksien ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos pisteytetty)

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta).

Ruumiinavaustiedot

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset, poikkeavuuksien ilmaantuvuus ja vaikeusaste.

Histopatologia

— muut kuin neoplastiset histopatologiset löydökset

— neoplastiset histopatologiset löydökset

— makroskooppisten ja mikroskooppisten löydösten välinen korrelaatio

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista käsittelyyn liittyvistä histopatologisista löydöksistä sekä niiden vaikeusaste

— raportti objektilasien vertaisarvioinnista.

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— annos-vastesuhteet

— aiemmat vertailutiedot

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

6) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä)

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.8 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus).

10) Tämän liitteen luku B.29 Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus.

11) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet)).

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69–98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF&Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. S. 279–284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196–1203.

27) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15–23.

32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198–201.

33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

B. 33 YHDISTETTY KROONINEN MYRKYLLISYYS-/KARSINOGEENISUUSTUTKIMUS

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 453 (2009). Alkuperäinen testiohje nro 453 hyväksyttiin vuonna 1981. Tämän tarkistetun testimenetelmän B.33 kehittäminen katsottiin tarpeelliseksi, jotta siinä voidaan ottaa huomioon eläinten hyvinvointiin ja sääntelyvaatimuksiin liittyvä viimeaikainen kehitys (1) (2) (3) (4) (5). Tämän testimenetelmän B.33 ajantasaistus on toteutettu yhdessä tässä liitteessä olevan luvun B.32 (Karsinogeenisuustesti) ja luvun B.30 (Krooninen myrkyllisyystesti) tarkistusten kanssa. Tavoitteena on saada lisää tietoa tutkimuksessa käytetyistä eläimistä ja yksityiskohtaisempaa tietoa annoksen valinnasta. Tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi monien erilaisten kemikaalien, torjunta-aineiden ja teollisuuskemikaalien testauksessa. Todettakoon kuitenkin, että jotkin yksityiskohdat ja vaatimukset saattavat erota lääkkeitä koskevista vaatimuksista [katso kansainvälisen harmonisointikonferenssin (ICH:n) ohje S1B lääkkeiden karsinogeenisuuden testauksesta].

2. Koska valtaosa kroonisista myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksista tehdään jyrsijälajeilla, tämä testimenetelmä on tarkoitettu käytettäväksi ensisijaisesti tutkimuksissa, jotka tehdään näillä lajeilla. Jos näitä tutkimuksia on tehtävä muilla lajeilla kuin jyrsijöillä, tässä testimenetelmässä kuvattujen periaatteiden ja menetelmien lisäksi voidaan soveltaa myös tässä liitteessä olevassa luvussa B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) kuvattuja periaatteita ja menetelmiä asianmukaisin muutoksin, kuten OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (Kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelu ja toteutus) (7) on määritelty.

3. Kroonisissa myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimuksissa käytettävät kolme pääasiallista antoreittiä ovat suun kautta, ihon kautta ja hengitysteiden kautta. Antoreitti valitaan testattavan kemikaalin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä ihmisten todennäköisen altistumisreitin mukaan. Lisätietoja altistusreitin valinnasta on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

4. Tässä testimenetelmässä keskitytään suun kautta altistukseen, koska se on yleisimmin käytetty altistusreitti kroonisissa myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksissa. Vaikka pitkäaikaiset tutkimukset, joihin sisältyy ihon tai hengitysteiden kautta altistus, voivat olla tarpeen ihmisten terveysriskien arvioinnissa ja/tai vaikka niitä voidaan tarvita tiettyjen sääntelyohjelmien nojalla, molemmat altistusreitit ovat teknisesti erittäin monimutkaisia. Tällaiset tutkimukset on suunniteltava tapauskohtaisesti, joskin tässä kuvattu testimenetelmä, joka on tarkoitettu suun kautta altistuksesta aiheutuvan kroonisen myrkyllisyyden tai karsinogeenisuuden määrittämiseen ja arviointiin, voi olla pohjana hengitysteiden ja/tai ihon kautta tapahtuvaa altistusta koskeville tutkimuksille käsittelyaikoja sekä kliinisiä ja patologisia parametreja jne. koskevien suositusten osalta. Saatavilla on OECD:n ohje testikemikaalien annostelusta hengitysteiden (7) (8) ja ihon (7) kautta. Kun suunnitellaan pitempiaikaisia tutkimuksia, joihin liittyy altistus hengitysteiden kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9) sekä OECD:n ohjeasiakirjaa, joka koskee akuuttia testausta hengitysteiden kautta (7). Kun altistustestaus toteutetaan ihon kautta, on suositeltavaa käyttää apuna tämän liitteen lukua B.9 (11).

5. Yhdistetystä myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvasta altistuksesta todennäköisesti seuraa ja jotka kestävät jopa käytettyjen lajien koko eliniän ajan. Tutkimuksesta saadaan tietoa testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista ja mahdollisesta karsinogeenisuudesta, ja sen avulla voidaan tunnistaa kohde-elimet ja kemikaalin mahdollinen kertyminen. Lisäksi tutkimuksesta voidaan saada arvio tasosta, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL). Ei-genotoksisten karsinogeenien osalta voidaan määrittää kasvainvasteet, joita voidaan käyttää laadittaessa turvallisuuskriteereitä ihmisten altistumiselle. Korostettakoon, että eläinten huolellinen kliininen tarkkailu on hyvin tärkeää, jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa.

6. Tämän testimenetelmän kattamien kroonisten myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimusten tavoitteet ovat seuraavat:

   — Testikemikaalin sellaisten karsinogeenisten ominaisuuksien tunnistaminen, jotka lisäävät kasvainten ilmaantuvuutta tai pahanlaatuisten kasvainten määrää tai vähentävät kasvainten syntymiseen kuluvaa aikaa verrattuna samanaikaisiin verrokkiryhmiin.

   — Kasvainten ilmaantumiseen kuluvan ajan määrittäminen

   — Testikemikaalin kroonisen myrkyllisyyden määrittäminen

— Kroonisen myrkyllisyyden ja karsinogeenisuuden kohde-elimen (-elinten) tunnistaminen

— Annos-vastesuhteen luonnehdinta

— NOAEL-arvon (tason, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta) määrittäminen tai viiteannoksen (BMD:n) määrittämisen lähtökohta

— Karsinogeenisten vaikutusten ekstrapolointi ihmisten altistumistasoihin pienillä annoksilla

— Kroonisten myrkyllisyysvaikutusten ennustaminen ihmisten altistumistasoilla

— Tiedon tuottaminen vaikutustapaa koskevia testihypoteeseja varten (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ALUSTAVAT HUOMIOT

7. Kun määritetään ja arvioidaan testikemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta ja kroonista myrkyllisyyttä, testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista, jotta tutkimus voidaan suunnitella siten, että kemikaalin toksikologisia ominaisuuksia voidaan testata tehokkaasti ja jotta eläinten käyttö voidaan pitää mahdollisimman vähäisenä. Epäillyn karsinogeenin vaikutustapaa koskevat tiedot ja niiden ottaminen huomioon (2) (7) (12) (13) (14) (15) on erittäin tärkeää, koska paras tutkimusmenetelmä voi vaihdella sen mukaan, tiedetäänkö vai epäilläänkö testikemikaalin olevan genotoksinen karsinogeeni. Lisätietoa vaikutustapaa koskevista huomioista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

8. Tietoihin, joista on apua tutkimuksen suunnittelussa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, tiedot vaikutustavasta, *in vitro*- tai *in vivo* -myrkyllisyystestien ja genotoksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (odotettavissa olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus, saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot, mutageenisuus/genotoksisuustiedot, karsinogeenisuustiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista, saatavilla olevat toksikokineettiset tiedot (kerta-annoksen ja myös toistuvan annoksen kinetiikka, jos saatavilla) sekä muista toistuvaa altistusta käsitelleistä tutkimuksista saadut tiedot. Krooninen myrkyllisyys/karsinogeenisuus on määritettävä vasta sitten, kun myrkyllisyydestä on saatu alustavia tietoja toistetuilla annoksilla suoritetuista 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystesteistä. Lyhytaikaiset testit, joissa tutkitaan syövän puhkeamista ja etenemistä, voivat antaa myös hyödyllistä tietoa. Karsinogeenisuustestauksen osalta on harkittava vaiheittaista testaustapaa osana tietyn testikemikaalin mahdollisten terveyteen kohdistuvien haitallisten vaikutusten kokonaisarviointia (16) (17) (18) (19).

9. Ennen tutkimuksen aloittamista on määritettävä tulosten analysointiin sopivimmat tilastomenetelmät koejärjestelyt ja tavoitteet huomioon ottaen. On pohdittava sitä, onko tilastoihin sisällytettävä eloonjäämistä koskeva korjaus, kumulatiivisten kasvainriskien analyysi suhteessa eloonjäämisen pituuteen, kasvaimen ilmaantumiseen kuluvaa aikaa koskeva analyysi sekä analyysi, joka on tehtävä, jos testi keskeytyy yhdessä tai useammassa ryhmässä ennenaikaisesti. Asianmukaisia tilastollisia analyyseja koskevia ohjeita sekä keskeiset viitetiedot kansainvälisesti hyväksytyistä tilastomenetelmistä on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä ohjeasiakirjassa GD 35, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten analyysia ja arviointia (20).

10. Karsinogeenisuustutkimuksia tehtäessä on noudatettava aina periaatteita ja näkökohtia, jotka on määritelty OECD:n ohjeasiakirjassa (Turvallisuuden arvioinneissa käytetyillä koe-eläimillä ilmenevien kliinisten merkkien tunnistaminen, arvioiminen ja käyttäminen humaaneina lopettamiskriteereinä) (21) ja eritoten sen 62 kohdassa. Kyseisessä kohdassa todetaan näin: ”Kun tutkimuksissa, joihin sisältyy toistuvaa annostelua, eläin osoittaa sellaisia kliinisiä merkkejä, jotka ovat progressiivisia ja jotka johtavat eläimen tilan huonontumiseen, on tehtävä tietoon perustuva päätös siitä, tuleeko eläin lopettaa humaaneista syistä. Päätöstä tehtäessä on otettava huomioon, mitä tutkimuksellista arvoa eläimen hengissä pitämisen jatkamisesta saatavalla tiedolla on suhteessa sen yleistilaan. Jos eläin päätetään pitää testissä edelleen, havaintoja on tehtävä tiheämmin, mikäli tarpeen. On myös mahdollista keskeyttää annostus tai pienentää testiannosta väliaikaisesti, mikäli se lievittää tuskia tai kärsimyksiä, ilman että se haittaa testin tarkoitusta.”

11. Tarkempia ohjeita ja kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten annoksen valintaa ohjaavia periaatteita on ohjeasiakirjassa GD 116 (7) sekä kahdessa International Life Sciences Instituten julkaisussa (22) (23). Keskeinen annoksen valintastrategia määräytyy tutkimuksen ensisijaisen tavoitteen tai ensisijaisten tavoitteiden mukaisesti (6 kohta). Asianmukaisia annostasoja valittaessa on pyrittävä saavuttamaan tasapaino yhtäältä vaarojen seulonnan ja toisaalta pieniin annoksiin liittyvien vasteiden ja niiden merkityksen välillä. Tämä on erityisen tärkeää yhdistetyssä kroonisessa myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksessa.

12. Tällaisen yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen toteuttamista on harkittava erillisen kroonisen myrkyllisyystutkimuksen (tämän liitteen luku B.30) ja karsinogeenisuustutkimuksen (tämän liitteen luku B.32) sijasta. Kahteen erilliseen tutkimukseen verrattuna yhdistetty tutkimus on ajan ja kustannusten kannalta tehokkaampi, mutta tietojen laatu ei vaarannu kroonisessa vaiheessa tai karsinogeenisuutta käsittelevässä vaiheessa. Kun tehdään yhdistetty krooninen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimus, on kiinnitettävä erityistä huomiota annoksen valinnan periaatteisiin (11 ja 22–26 kohta). Todettakoon, että tiettyjen sääntelypuitteiden nojalla voidaan edellyttää erillisiä tutkimuksia. Lisäohjeita yhdistetyn kroonisen myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimuksen suunnittelusta tutkimuksen tehokkuuden maksimoimiseksi siltä kannalta, että eläinten määrää voidaan mahdollisesti vähentää ja että erilaisia koemenetelmiä voidaan yhtenäistää, on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

13. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät on esitetty tämän kohdan lopussa ja ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

TESTIN PERIAATE

14. Tutkimusmenetelmä koostuu kahdesta rinnakkaisesta vaiheesta, jotka ovat krooninen vaihe ja karsinogeenisuusvaihe (vaiheiden kesto: katso 34 ja 35 kohta). Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta, mutta myös hengitysteiden tai ihon kautta testaus voi olla asianmukaista. Kroonisessa vaiheessa testikemikaalia annetaan päivittäin erisuuruisina annoksina useille koe-eläinryhmille yleensä 12 kuukauden ajan, joskin on mahdollista valita tätä pidempi tai lyhyempi aika sääntelyvaatimusten mukaisesti (katso 34 kohta). Tämän pituisen ajan katsotaan olevan riittävän pitkä, jotta mahdolliset kumulatiivisen myrkyllisyyden vaikutukset tulevat esiin ilman geriatristen muutosten häiritseviä vaikutuksia. Tutkimussuunnitelmaan voi myös sisältyä yksi tai useampi eläinten lopettamiskerta kesken kokeen esimerkiksi kolmen ja kuuden kuukauden kohdalla, ja tutkimukseen voidaan ottaa lisää eläinryhmiä tämän kompensoimiseksi (katso 20 kohta). Karsinogeenisuusvaiheessa testikemikaalia annetaan päivittäin useille koe-eläinryhmille suurimman osan niiden elinajasta. Kummankin ryhmän eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyyden merkkien ja neoplastisten leesioiden kehittymisen havaitsemiseksi. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

15. Tämä testimenetelmä koskee ensisijaisesti jyrsijöillä ilmenevän kroonisen myrkyllisyyden ja karsinogeenisuuden määrittämistä ja arviointia (2 kohta). Muiden lajien kuin jyrsijöiden käyttöä voidaan harkita, kun saatavilla olevat tiedot viittaavat siihen, että muut lajit ovat oleellisempia ihmisten terveyteen kohdistuvien vaikutusten ennustamisessa. Lajin valinta on perusteltava. Suositeltavin jyrsijälaji on rotta, mutta muitakin jyrsijöitä, esimerkiksi hiiriä, voidaan käyttää. Vaikka hiiren käyttämisestä karsinogeenisuustestauksessa koituva hyöty voi olla rajallinen (24) (25) (26), jotkin sääntelyohjelmat edellyttävät karsinogeenisuustestien tekemistä hiirellä, ellei päätetä, että tällainen tutkimus on tieteellisesti tarpeeton. Rottia ja hiiriä on käytetty ensisijaisina koe-eläiminä seuraavista syistä: niiden elinaika on suhteellisen lyhyt, niitä käytetään laajalti farmakologisissa ja toksikologisissa tutkimuksissa, niille muodostuu herkästi kasvaimia, ja saatavilla on kantoja, joita on luonnehdittu riittävästi. Tämän vuoksi niiden fysiologiasta ja patologiasta on saatavana paljon tietoa. Tarvittaessa muilla lajeilla kuin jyrsijöillä tehtävät krooniset myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimukset on suunniteltava ja toteutettava tässä testimenetelmässä kuvattujen sekä tämän liitteen luvussa B.27 (Oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä) (6) kuvattujen periaatteiden mukaisesti. Lisätietoja lajin ja kannan valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

16. Testissä tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Yhdistetty myrkyllisyys-/karsinogeenisuustutkimus on tehtävä mieluiten eläimillä, jotka ovat samaa kantaa ja samasta lähteestä kuin eläimet, joita käytettiin lyhyemmissä alustavissa myrkyllisyystutkimuksissa. Jos kyseisestä kannasta ja lähteestä peräisin olevien eläinten kuitenkin tiedetään aiheuttavan ongelmia pitkäaikaisissa tutkimuksissa yleensä käytettävien hyväksyttyjen eloonjäämiskriteerien täyttämisessä [katso ohjeasiakirja GD 116 (7)], on harkittava sellaisen eläinkannan käyttämistä, jonka eloonjäämisaste pitkäaikaisessa tutkimuksessa on hyväksyttävä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Yksittäin pitämistä on harkittava vain, jos se on tieteellisesti perusteltua (27) (28) (29). Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C). Vaikka riittää, että suhteellinen kosteus on vähintään 30 prosenttia eikä mielellään ylitä 70:tä prosenttia muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, tulee kuitenkin pyrkiä 50–60 prosentin suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ruokavalion on vastattava kaikkia testattujen lajien ravintovaatimuksia. Ruokavalion sisältämien kontaminanttien määrän on oltava mahdollisimman pieni. Kontaminantteja, jotka saattavat vaikuttaa testin tuloksiin, ovat esimerkiksi torjunta-ainejäämät, pysyvät orgaaniset yhdisteet, fytoestrogeenit, raskasmetallit ja mykotoksiinit. Ravintoaine- ja kontaminanttipitoisuudesta on tuotettava analyyttista tietoa säännöllisesti, vähintään tutkimuksen alussa ja silloin, kun käytettävä erä muuttuu, ja nämä tiedot on sisällytettävä loppuraporttiin. Yhtä lailla on

annettava analyyttista tietoa tutkimuksessa käytetystä juomavedestä. Ruokavalion valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testikemikaalin ja eläinten ravintovaatimusten välinen tasapaino silloin, kun testikemikaalia annetaan ravintoon sekoitettuna.

Eläinten valmistelu

18. Testissä on käytettävä terveitä eläimiä, joita on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Jyrsijöiden osalta testikemikaalin antaminen eläimille tulee aloittaa mahdollisimman pian vieroituksen ja totutuksen jälkeen, mielellään ennen kuin eläimet ovat kahdeksanviikkoisia. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja ikä on tunnettava. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun tulee olla mahdollisimman vähäistä, ja se saa vaihdella kummankin käytetyn sukupuolen osalta korkeintaan ± 20 prosenttia kaikkien tutkimuksessa käytettyjen eläinten keskimääräisestä painosta, joka on määritettävä kummallekin sukupuolelle erikseen. Eläimet tulee jakaa verrokki- ja testiryhmään satunnaistetusti. Satunnaistamisen jälkeen kummankaan sukupuolen ryhmissä ei saa olla suuria eroja keskimääräisessä painossa. Jos tilastollisesti merkitseviä eroja on, satunnaistamisvaihe on toistettava, mikäli mahdollista. Kullekin eläimelle tulee antaa oma tunnistenumero, joka on merkittävä eläimeen pysyvästi tatuoimalla, mikrosiruimplantilla tai muulla sopivalla tavalla.

MENETTELY

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

19. Testissä on käytettävä molempia sukupuolia. Testissä on käytettävä riittävää määrää eläimiä, jotta jokaisessa ryhmässä on tarpeeksi eläimiä tutkimuksen lopussa perusteellista biologista ja tilastollista arviointia varten. Jyrsijöiden osalta jokaisessa annosryhmässä (22 kohdassa määritetyn mukaisesti) ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä, jotka on tarkoitettu tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheeseen, on oltava vähintään 50 eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, mikä on tutkimuksen tavoite, keskeisten estimaattien tilastollista voimaa on mahdollista lisätä jakamalla eläimet eri annosryhmiin eri tavoin epätasaisesti siten, että pienen annoksen ryhmissä on yli 50 eläintä, jolloin voidaan esimerkiksi arvioida kemikaalin mahdollista karsinogeenisuutta pienillä annoksilla. On kuitenkin muistettava, että jos ryhmäkokoa kasvatetaan vain jonkin verran, tutkimuksen tilastollinen voima lisääntyy suhteellisen vähän. Jyrsijöiden osalta jokaisessa annosryhmässä (22 kohdassa määritetyn mukaisesti) ja samanaikaisessa verrokkiryhmässä, jotka on tarkoitettu tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheeseen, on oltava vähintään 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. On huomattava, että tämä määrä on pienempi kuin kroonisessa myrkyllisyystutkimuksessa (tämän liitteen luku B.30). Vaikka tämän yhdistetyn tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa on vähemmän eläimiä jokaisessa ryhmässä, niistä saatujen tietojen tulkintaa tukevat kuitenkin tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheesta saadut tiedot, jotka on saatu käyttämällä enemmän eläimiä. Tutkimuksissa, joissa käytetään hiiriä, saatetaan tarvita lisää eläimiä kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa kussakin annosryhmässä, jotta kaikki vaadittavat hematologiset määritykset saadaan tehtyä. Lisätietoa tutkimuksen tilastollisesta suunnittelusta ja annostasojen valinnasta tilastollisen voiman maksimoimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

Eläinten lopettamista kesken tutkimuksen, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä koskeva säännös

20. Tutkimuksessa voidaan hyödyntää mahdollisuutta lopettaa eläimiä kesken tutkimuksen esimerkiksi kuuden kuukauden kohdalla, jotta saadaan tietoa neoplastisten muutosten etenemisestä ja mekanistista tietoa, mikäli se on tieteellisesti perusteltua. Jos tällaisia tietoja on jo saatavana aiemmista samaa testikemikaalia koskevista toistetun annoksen myrkyllisyystutkimuksista, eläinten lopettaminen kesken tutkimuksen ei ole välttämättä tieteellisesti perusteltua. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa, joka kestää yleensä 12 kuukautta, käytetyistä eläimistä saadaan tutkimuksen karsinogeenisuusvaiheeseen tietoa kesken tutkimuksen lopetetuista eläimistä, jolloin käytettyjen eläinten kokonaismäärä siis pienenee. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheeseen voidaan sisällyttää myös satelliittiryhmiä, jotta tutkittavana olevan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta voidaan seurata. Nämä ryhmät voidaan rajata tutkimuksen suurimpaan annoksen ryhmään ja verrokkiryhmään. Lisäksi tutkimukseen voidaan sisällyttää ryhmä erityisvalvonnassa olevia eläimiä (yleensä viisi eläintä kumpaakin sukupuolta) sairauden tilan seuraamiseksi tutkimuksen aikana, mikäli tarpeen (30). Lisätietoja siitä, miten tutkimussuunnitelmaan sisällytetään tutkimuksen aikana tapahtuvia lopettamisia, satelliittiryhmiä ja erityisvalvonnassa olevia eläimiä samalla, kun käytettävien eläinten kokonaismäärää pienennetään, on ohjeasiakirjassa GD 116 (7).

21. Jos tutkimussuunnitelmaan sisältyy kesken tutkimuksen tapahtuvia lopettamisia, kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten määrä jokaisessa annosryhmässä on yleensä 10 eläintä kumpaakin sukupuolta. Tutkimussuunnitelman mukaista eläinten kokonaismäärää on lisättävä ennen tutkimuksen päättymistä lopetettavaksi aiottujen eläinten määrällä. Näitä eläimiä on yleensä tarkkailtava samalla tavalla kuin päätutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa käytettäviä eläimiä: niiden ruumiinpainoa ja ravinnon-/vedenkulutusta on seurattava, ja hematologiset ja kliinisen biokemian mittaukset sekä patologiset tutkimukset on tehtävä, joskin mittaukset voidaan rajata (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmissä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen.

Annosryhmät ja annostus

22. Ohjeita kaikista annoksen valintaan ja annosten porrastamiseen liittyvistä näkökohdista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Vähintään kolmea annostasoa ja samanaikaista verrokkiryhmää on käytettävä sekä kroonista myrkyllisyyttä että karsinogeenisuutta tarkastelevissa vaiheissa. Annostasot perustuvat yleensä lyhyempien, toistetuilla annoksilla tehdyn testien tai annosalueen määritystestien tuloksiin, ja kaikki mahdolliset testikemikaalista tai samanlaisista kemikaaleista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon.

23. Tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa täydellinen kolmea annostasoa soveltava tutkimus ei välttämättä ole tarpeen, jos voidaan ennustaa, että yksi annostaso, joka vastaa vähintään 1 000 mg:n annosta painokiloa kohti päivässä, ei todennäköisesti aiheuta haitallisia vaikutuksia. Tämän tulee perustua alustavista tutkimuksista saatuihin tietoihin ja siihen huomioon, ettei myrkyllisyyttä ole odotettavissa rakenteellisesti samanlaisia kemikaaleja koskevien tietojen perusteella. Tätä rajaa (1 000 mg painokiloa kohti päivässä) sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

24. Mikäli testikemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso on yleensä valittava siten, että sen avulla voidaan tunnistaa ensisijaiset kohdeelimet ja myrkylliset vaikutukset ilman, että annos aiheuttaa kärsimystä, vakavaa myrkyllisyyttä, sairastuvuutta tai kuolemaa. Suurin annos on valittava yleensä siten, että se aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, mikä näkyy esimerkiksi painon nousun hidastumisena (noin 10 prosentilla). Tutkimuksen tavoitteiden mukaan (katso 6 kohta) suurimmaksi annokseksi voidaan valita myös pienempi annos kuin se, joka aiheuttaa merkkejä myrkyllisyydestä, jos jokin annos aiheuttaa esimerkiksi huolestuttavan haittavaikutuksen, joka vaikuttaa kuitenkin vain vähän elinaikaan tai ruumiinpainoon.

25. Annostasot ja niiden porrastus voidaan valita annosvasteen ja – testikemikaalin vaikutustavan mukaan – NOAEL-arvon määrittämisen tai tutkimuksen muun tavoitteen (esimerkiksi BMD-arvo (katso 25 kohta) pienimmän annoksen tasolla) saavuttamisen perusteella. Pienempien annosten määrittämisessä huomioon otettavia tekijöitä ovat annos-vastekäyrän odotuksenmukainen kulmakerroin, annokset, joiden yhteydessä saattaa ilmetä tärkeitä muutoksia metaboliassa tai myrkyllisen vaikutuksen tavassa, odotuksenmukainen raja-arvo tai arvo, jota pidetään lähtökohtana pienen annoksen ekstrapolaatiolle. Kun toteutetaan yhdistetty karsinogeenisuutta / kroonista myrkyllisyyttä käsittelevä tutkimus, ensisijainen tavoite on hankkia tietoa karsinogeenisuudesta riskinarviointitarkoituksiin. Kroonista myrkyllisyyttä koskevien tietojen hankinta on useimmiten toissijainen tavoite. Tämä on syytä muistaa, kun valitaan tutkimuksen annostasoja ja niiden porrastusta.

26. Valittu annostason porrastus määräytyy tutkimuksen tavoitteiden ja testikemikaalin ominaisuuksien perusteella, eikä sitä voida määrätä tässä testimenetelmässä. Kaksinkertaiset-nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevissa annossarjoissa, ja usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi 6–10-kertaisia annosvälejä). Yleisesti ottaen on pyrittävä välttämään käyttämästä kertoimia, jotka ovat suurempia kuin 10, ja niiden mahdollinen käyttö on perusteltava.

27. Kuten ohjeasiakirjassa GD 116 (7) on täsmennetty, annoksen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

— Tunnetut tai oletetut epälineaarisuudet tai käännepisteet annosvasteessa

— Toksikokinetiikka ja pitoisuusalueet, joilla ilmenee tai ei ilmene metabolian induktiota, saturaatiota tai epälineaarisuutta ulkoisten ja sisäisten annosten välillä

— Leesioiden esiasteet, vaikutusten merkkiaineet tai keskeisten biologisten prosessien toimintaa osoittavat indikaattorit

— Vaikutustapaan liittyvät keskeiset (tai oletetut) näkökohdat, kuten annokset, joilla alkaa ilmetä sytotoksisuutta, hormonipitoisuuksien ja homeostaattisten mekanismien häiriintymistä jne.

— Annos-vastekäyrän alueet, joilla tarvitaan erittäin yksityiskohtainen estimointi, esimerkiksi ennakoidun viitearvon tai oletetun raja-arvon kohdalla

— Ennakoidut ihmisten altistumistasot etenkin keskisuuria ja pieniä annoksia valittaessa

28. Verrokkiryhmän tulee olla joko ryhmä, joka ei saa käsittelyä, tai kantaja-ainetta saava ryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Testikemikaalin annostelua lukuun ottamatta verrokkiryhmän eläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmien eläimiä. Jos käytetään kantaja-ainetta, verrokkiryhmälle tulee antaa tilavuudeltaan suurin annosryhmissä käytetty kantaja-aineannos. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna ja jos se vähentää ravinnonottoa sen vuoksi, ettei ravinto maita eläimelle entiseen tapaan, normaaliravintoa saava verrokkiryhmä voi olla sopivampi.

Annosten valmistelu ja testikemikaalin antaminen

29. Testikemikaali annetaan yleensä suun kautta ruoan tai juomaveden seassa tai ruokintaletkulla. Lisätietoja antoreiteistä ja -tavoista on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Antoreitti ja antotapa määräytyvät tutkimuksen tarkoituksen, testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien ja sen biologisen hyötyosuuden sekä ihmisten yleisimmän altistumisreitin ja -tavan perusteella. Valitulle antoreitille ja -tavalle on esitettävä perustelut. Eläinten hyvinvoinnin vuoksi suun kautta käytettävä ruokintaletku on valittava yleensä vain sellaisille aineille, joiden osalta tämä antoreitti ja -tapa ovat todennäköisesti mahdollisia ihmisten altistumisen yhteydessä (esimerkiksi

lääkkeet). Torjunta-aineita sisältävät ravinto- tai ympäristökemikaalit annetaan yleensä ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna. Joidenkin skenaarioiden, kuten työperäisen altistuksen, yhteydessä kemikaalin antaminen muita antoreittejä pitkin voi kuitenkin olla tarkoituksenmukaisempaa.

30. Tarvittaessa testikemikaali liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. Seuraavat mahdolliset kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, metaboliaan tai testikemikaalin pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisiä ominaisuuksia; vaikutukset ravinnon ja veden kulutukseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esimerkiksi maissiöljyyn) tehtävää liuosta/suspensiota ja sitten mahdollisesti muita kantaja-aineita. Jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen myrkylliset ominaisuudet on tunnettava. Testikemikaalin stabiiliudesta ja annosteluliuosten homogeenisuudesta tai ruokavalioista (tarvittaessa) annosteluolosuhteissa (esimerkiksi ravinto) on oltava saatavilla tietoa.

31. Jos kemikaaleja annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalimäärät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Pitkäaikaisissa myrkyllisyystutkimuksissa, joissa testikemikaalia annetaan ravinnon seassa, testikemikaalin pitoisuus eläinten ruoassa saa yleensä olla enintään viisi prosenttia kokonaisruokavaliosta, jotta vältetään ravitsemuksellinen epätasapaino. Kun testikemikaali annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (mg/kg-ruokavalio tai ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa (mg painokiloa kohti). Molemmat lasketaan viikoittain. Valittu vaihtoehto on mainittava.

32. Suun kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia päivittäin (seitsemänä päivänä joka viikko) 12 kuukauden ajan (krooninen vaihe) tai 24 kuukauden ajan (karsinogeenisuusvaihe), katso myös 33 ja 34 kohta. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä (jos testikemikaalia annetaan esimerkiksi viitenä päivänä viikossa), se on perusteltava. Ihon kautta annostelun yhteydessä eläimille annetaan testikemikaalia vähintään kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, kuten tämän liitteen luvussa B.9 (11) on täsmennetty, 12 kuukauden ajan (krooninen vaihe) tai 24 kuukauden ajan (karsinogeenisuusvaihe). Hengitysteiden kautta altistuksessa testikemikaalia annetaan kuuden tunnin ajan päivässä seitsemänä päivänä viikossa, mutta myös altistusta viitenä päivänä viikossa voidaan käyttää, jos se on perusteltua. Altistusjakson pituus on yleensä 12 kuukautta (krooninen vaihe) tai 24 kuukautta (karsinogeenisuusvaihe). Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Jos altistuksen kesto on alle kuusi tuntia päivässä, se on perusteltava. Katso myös tämän liitteen luku B.8 (9).

33. Kun testikemikaali annetaan eläimille ruokintaletkulla, on käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia, ja kemikaali on annettava joka päivä samoihin aikoihin. Yleensä kerta-annos annetaan kerran päivässä, mutta jos kemikaali on esimerkiksi paikallisesti ärsyttävä aine, päivittäinen annos voidaan antaa myös jaettuna (kaksi kertaa päivässä). Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus tulee pitää mahdollisimman pienenä, ja jyrsijöillä se saa olla yleensä enintään 1 ml 100 g:n painoa kohti (31). Testitilavuuden vaihtelu on minimoitava muuttamalla pitoisuutta sen varmistamiseksi, että tilavuus on sama kaikilla annostasoilla. Poikkeuksena ovat mahdollisesti syövyttävät tai ärsyttävät kemikaalit, jotka on laimennettava vakavien paikallisten vaikutusten välttämiseksi. On vältettävä testausta sellaisilla pitoisuuksilla, jotka todennäköisesti syövyttävät tai ärsyttävät maha-suolikanavaa.

Tutkimuksen kesto

34. Tämän tutkimuksen annostelujakso ja krooninen vaihe kestävät yleensä 12 kuukautta, mutta tutkimussuunnitelman mukaan testimenetelmää on mahdollista soveltaa joko lyhyempiin (esimerkiksi kuusi tai yhdeksän kuukautta) tai pitempiin (esimerkiksi 18 tai 24 kuukautta) tutkimuksiin tietyn lainsäädännön nojalla tai tiettyjen mekanististen tarkoitusten perusteella. Poikkeukset 12 kuukauden mittaisesta altistuksesta on perusteltava varsinkin, jos altistus on tätä lyhyempi. Kaikki tähän vaiheeseen kohdennetut annosryhmät lopetetaan määrättynä ajankohtana kroonisen myrkyllisyyden ja ei-neoplastisten muutosten arvioimiseksi. Tutkimukseen sisältyville satelliittiryhmille, joiden avulla seurataan tutkittavan testikemikaalin aiheuttamien toksikologisten muutosten korjaantuvuutta, ei saa antaa testikemikaalia vähintään neljään viikkoon eikä pidempään kuin kolmanneksen tutkimuksen kokonaiskestosta altistuksen päätyttyä.

35. Jyrsijöiden osalta tämän tutkimuksen karsinogeenisuusvaihe kestää yleensä 24 kuukautta, mikä on valtaosa käytettävien eläinten normaalista elinajasta. Tutkimus voi olla tätä pidempi tai lyhyempi sen mukaan, mikä on tutkimuksessa käytettävän eläinlajin kannan elinaika, mutta tämä on kuitenkin perusteltava. Tietyille hiirikannoille, joita ovat esimerkiksi AKR/J, C3H/J tai C57BL/6J, 18 kuukauden mittainen tutkimus voi olla sopivampi. Ohjeita tutkimuksen kestosta, päättymisestä ja tutkimuksessa havaitun eloonjäämisen käsittelemisestä

sekä lisäohjeita negatiivisen karsinogeenisuuden hyväksyttävyydestä suhteessa tutkimuksessa ilmenneeseen eloonjäämiseen on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 116, joka koskee kroonisten myrkyllisyys- ja karsinogeenisuustutkimusten suunnittelua ja toteuttamista (7).

— Tutkimuksen lopettamista on harkittava, kun eloonjääneiden eläinten määrä pienemmän annoksen ryhmissä tai verrokkiryhmässä on pienempi kuin 25 prosenttia.

— Jos vain suuren annoksen ryhmä kuolee ennenaikaisesti myrkyllisyyden vuoksi, tutkimusta ei tule lopettaa.

— Eloonjäämistä on käsiteltävä kummankin sukupuolen osalta erikseen.

— Tutkimusta ei tule jatkaa sen jälkeen, kun tutkimuksesta saatavat tiedot eivät enää riitä tilastollisesti validin arvioinnin tekemiseen.

HAVAINNOT (KROONISEN MYRKYLLISYYDEN VAIHE)

36. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä aamuin illoin joka päivä myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Kliinisiä yleishavaintoja on tehtävä vähintään kerran päivässä mieluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä. On otettava huomioon, että kun testikemikaalia annetaan ruokintaletkun kautta, odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen.

37. Kaikista eläimistä on tehtävä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilanteeseen), tutkimuksen ensimmäisen viikon päätteeksi ja kerran kuukaudessa sen jälkeen. Havainnointi on toteutettava siten, että yksittäisten havainnoijien välinen vaihtelu on mahdollisimman pientä ja testiryhmästä riippumatonta. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella mieluiten vakioalueella samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava tarkoin muistiin, mieluiten koelaboratorion erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. On pyrittävä varmistamaan, että havainnointiolosuhteissa on mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja ovat mm. ihon, karvapeitteen, silmien ja limakalvojen muutokset sekä sisäeritteiden, kuonaeritteiden ja autonomisen toiminnan (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko ja epätavallinen hengitys) esiintyminen. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin (32).

38. Kaikille eläimille on tehtävä silmätutkimus oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testikemikaalin ensimmäistä antokertaa. Tutkimuksen päätteeksi tämä tutkimus on tehtävä mieluiten kaikille eläimille, mutta vähintään suuren annoksen ryhmässä ja verrokkiryhmässä. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, kaikki eläimet on tutkittava. Jos rakenteellinen analyysi tai muut tiedot viittaavat silmiin kohdistuvaan myrkyllisyyteen, silmätutkimuksia on tehtävä useammin.

39. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan neurotoksisia vaikutuksia, voidaan lisäksi arvioida aistien reaktiivisuus erityyppisille ärsykkeille (32) (esimerkiksi kuulon, näön tai asentotunnon kautta välittyville ärsykkeille) (33) (34) (35), tarttumaotteen voimakkuus (36) ja motorinen toiminta (37) ennen tutkimuksen aloittamista ja kolmen kuukauden välein sen jälkeen, kunnes tutkimus on kestänyt 12 kuukautta, sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät mainituista kirjallisuusviitteistä. Myös muita kuin viittauksissa mainittuja toimenpiteitä voidaan käyttää.

40. Sellaisten kemikaalien yhteydessä, joiden osalta aikaisemmat toistetulla annoksella tehdyt 28 päivän ja/tai 90 päivän myrkyllisyystestit osoittivat niiden mahdollisesti aiheuttavan immunotoksisia vaikutuksia, tätä tutkittavaa ominaisuutta koskevat tarkemmat tutkimukset voidaan tehdä tutkimuksen päättyessä.

Ruumiinpaino, ravinnon/veden kulutus ja ruumiinpainon lisäys

41. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisen 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

Hematologia ja kliininen biokemia

42. Tutkimuksissa, joissa käytetään jyrsijöitä, hematologiset tutkimukset on tehtävä kaikille tutkimuseläimille (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti) kolmen, kuuden ja kahdentoista kuukauden jälkeen sekä tutkimuksen päättyessä (jos se kestää yli 12 kuukautta). Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut hematologiset määritykset saadaan tehtyä (katso 19 kohta). Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos hematologisissa parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta, esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa.

43. Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (38): valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, punasolujen määrä, verihiutaleiden määrä, hemoglobiinipitoisuus, hematokriitti (punasolujen tilavuusosuus), punasolujen keskimääräinen tilavuus (MCV), keskihemoglobiini (MCH), keskihemoglobiinikonsentraatio (MCHC), protrombiiniaika ja aktivoitu partiaalinen tromboplastiiniaika. Muita hematologisia parametreja (kuten Heinzin kappaleet, epätyypillinen punasolujen morfologia tai methemoglobiini) voidaan tarvittaessa mitata testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti. Jos testikemikaali vaikuttaa verta muodostavaan järjestelmään, retikulosyyttien määrän ja luuytimen sytologinen tutkimus voi olla aiheenmukaista, joskaan sitä ei tarvitse tehdä rutiininomaisesti.

44. Kliinisen biokemian määritykset tärkeimpien myrkyllisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan kaikilta tutkimuseläimiltä (kymmenen urosta ja kymmenen naarasta jokaisesta ryhmästä) hematologisia tutkimuksia varten määritetyin aikavälein. Hiirten osalta saatetaan tarvita satelliittiryhmän eläimiä, jotta kaikki vaaditut kliinis- biokemialliset määritykset saadaan tehtyä. Tutkimuksissa, joissa käytetään muita eläimiä kuin jyrsijöitä, näytteet otetaan pienemmästä määrästä eläimiä (esimerkiksi koiratutkimuksissa neljältä eläimeltä sukupuolta ja ryhmää kohti) saman näytteenottoaikataulun mukaisesti kuin jyrsijöilläkin sekä tutkimuksen päättyessä. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä jyrsijöillä eikä muilla eläimillä, jos kliinisen biokemian parametreissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Eläinten ruokinnan siirtämistä yön yli (hiiriä lukuun ottamatta) ennen verinäytteen ottoa suositellaan ([1]). Seuraavassa on luettelo parametreista, jotka on tutkittava (38): glukoosi, virtsa (virtsan typpi), kreatiniini, kokonaisproteiini, albumiini, kalsium, natrium, kalium, kokonaiskolesteroli, vähintään kaksi hepatosellulaariseen arviointiin sopivaa testiä (alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, glutamaattidehydrogenaasi, kokonaissappihapot) (39), ja vähintään kaksi hepatobiliaariseen arviointiin sopivaa testiä (alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitransferaasi, 5'-nukleotidaasi, kokonaisbilirubiini, kokonaissappihapot) (39). Muita kliinis-kemiallisia parametreja, kuten paastotriglyseridit, tietyt hormonit ja koliiniesteraasi, voidaan mitata tarvittaessa testikemikaalin myrkyllisyyden mukaan. Kaiken kaikkiaan on toimittava joustavasti tietystä kemikaalista havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaisesti.

45. Virtsa-analyysit on tehtävä kaikilta tutkimuseläimiltä (10 urosta ja 10 naarasta jokaisesta ryhmästä) näytteistä, jotka otetaan samoina aikoina kuin hematologiset ja kliinis-kemialliset näytteet. Kolmannen kuukauden jälkeisiä mittauksia ei tarvitse tehdä, jos virtsa-analyysissa ei havaittu vaikutuksia aiemmin tehdyssä 90 päivän tutkimuksessa, jossa käytettiin vertailukelpoisia annostasoja. Seuraava parametriluettelo on kliinis-kemiallisia tutkimuksia koskevan asiantuntijasuosituksen mukainen (38): ulkonäkö, tilavuus, osmolaliteetti tai ominaistiheys, pH, kokonaisproteiini ja glukoosi. Muita määrityksiä ovat ketoaineet, urobilinogeeni, bilirubiini ja piilevä veri. Myös muita parametreja voidaan tarvittaessa käyttää, jos havaitun vaikutuksen (havaittujen vaikutusten) tutkimusta on laajennettava.

46. Koiratutkimuksissa lähtötilanteen hematologiset ja kliinis-biokemialliset muuttujat on yleensä määritettävä ennen käsittelyn aloittamista, mutta jyrsijätutkimuksissa niitä ei tarvitse määrittää (38). Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömät (katso 58 kohta), näiden tietojen hankkimista on harkittava.

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

47. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Mittaukset voidaan kuitenkin määrätä rajattavaksi (kesken tutkimuksen lopetettavien eläinten ryhmässä tai satelliittiryhmässä) tiettyihin keskeisiin seikkoihin, kuten neurotoksisuuteen tai immunotoksisuuteen (katso 21 kohta). Näille eläimille ei tarvitse tehdä ruumiinavausta eikä jäljempänä olevissa kohdissa kuvattuja toimenpiteitä. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella.

([1]) Ruokinnan siirtämistä yön yli suositellaan monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksissa. Tärkein syy tälle suositukselle on se, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta ruokinnan siirtäminen yön yli voi häiritä eläinten yleistä metaboliaa ja etenkin ruokintatutkimuksissa häiritä päivittäistä altistusta testikemikaalille. Kaikki eläimet on arvioitava samassa fysiologisessa tilassa, ja yksityiskohtaiset tai neurologiset arvioinnit on mieluiten tehtävä eri päivänä kuin näytteenotto kliinistä biokemiaa varten.

48. Elinten painotiedot on kerättävä kaikilta eläimiltä lukuun ottamatta 47 kohdan jälkimmäisessä osassa lueteltuja eläimiä. Lisämunuaiset, aivot, lisäkivekset, sydän, munuaiset, maksa, munasarjat, perna, kivekset ja kilpirauhanen (punnittava kiinnityksen jälkeen lisäkilpirauhasten kanssa) on puhdistettava niihin kiinnittyvistä kudoksista tarkoituksenmukaisella tavalla, ja elinten märkäpaino on punnittava mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi.

49. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (40) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauhanen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen
Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengitysteiden kautta altistusta koskevien tutkimusten yhteydessä hengityselimistön säilytettävien ja tutkittavien kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen luvussa B.8 (9) ja luvussa B.29 (10) annettuja suosituksia. Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

50. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (40). Vähintään seuraavat histopatologiset tutkimukset on tehtävä:

— kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— kohdekudokset tai kudokset, joissa oli käsittelyyn liittyviä muutoksia suuren annoksen ryhmässä; kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä

— parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

HAVAINNOT (KARSINOGEENISUUSVAIHE)

51. Kaikki eläimet on tutkittava sairastuvuuden tai kuolleisuuden havaitsemiseksi yleensä jokaisen päivän aamulla ja illalla myös viikonloppuisin ja lomien aikana. Lisäksi eläimet on tutkittava kerran päivässä tiettyjen, toksikologisesti oleellisten merkkien havaitsemiseksi. Tutkimuksissa, joissa käytetään ruokintaletkua, eläimet on tutkittava heti annostelun jälkeen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä kasvainten kehittymiseen. Jokaisen paljain silmin tai käsin tunnustelemalla havaittavissa olevan kasvaimen toteamisaika, paikka, koko, ulkonäkö ja kehitys on kirjattava.

52. Kaikki eläimet on punnittava käsittelyn alussa, vähintään kerran viikossa ensimmäisen 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Ravinnon kulutus ja painon lisäys on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuukaudessa. Veden kulutus on mitattava vähintään kerran viikossa ensimmäisten 13 viikon ajan ja sen jälkeen vähintään kerran kuussa, kun testikemikaali annetaan juomaveteen sekoitettuna. Veden kulutuksen mittaamista on harkittava myös sellaisissa tutkimuksissa, joissa eläimen juomistottumukset muuttuvat.

Hematologia, kliininen biokemia ja muut mittaukset

53. Jotta tutkimuksesta saadaan mahdollisimman paljon tietoa erityisesti vaikutustapaa koskevia pohdintoja varten, eläimiltä voidaan ottaa tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella verinäytteet hematologisia ja kliinis-biokemiallisia määrityksiä varten. Myös virtsa-analyysi voi olla tarpeen. Näistä parametreista saadaan tietoa tutkimuksen kroonisen myrkyllisyyden vaiheessa, joka kestää yleensä 12 kuukautta (34 kohta), käytettyjä eläimiä koskevien tietojen perusteella. Lisätietoa tällaisten näytteiden ottamisen hyödyllisyydestä osana karsinogeenisuustutkimusta on ohjeasiakirjassa GD 116 (7). Jos verinäytteitä otetaan, ne on kerättävä testijakson lopussa vähän ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Verinäytteet on otettava nimetystä paikasta, esimerkiksi sydänpunktiolla tai silmäntakaisesta laskimopunoksesta anestesiassa. Verinäytteet voidaan valmistella myös tutkimusta varten etenkin, jos kohde-elin vaikuttaa olevan luuydin, joskin verinäytteiden tutkimisen arvoa mahdollisen karsinogeenisuuden/onkogeenisuuden arvioinnissa karsinogeenisuusvaiheen yhteydessä on pidetty kyseenalaisena (38).

PATOLOGIA

Ruumiinavaustutkimukset

54. Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille paitsi erityisvalvonnassa oleville eläimille (katso 20 kohta) on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Erityisvalvonnassa olevien eläinten ruumiinavauksen tarve määräytyy tapauskohtaisesti tutkimuksen johtajan harkinnan perusteella. Yleensä elinten painot eivät kuulu karsinogeenisuutta käsittelevään tutkimukseen, koska geriatriset muutokset ja myöhemmissä vaiheissa kasvainten kehittyminen mitätöi elinten painoa koskevien tietojen käyttökelpoisuuden. Nämä tiedot voivat kuitenkin olla erittäin tärkeitä näyttöön perustuvan arvioinnin toteuttamisessa ja etenkin vaikutustapaa koskevissa pohdinnoissa. Jos ne ovat osa satelliittitutkimusta, ne on kerättävä viimeistään vuoden kuluttua tutkimuksen aloittamisesta.

55. Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyypin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa (40) (hakasulkeissa olevat kudokset ovat valinnaisia):

Kaikki suuret leesiot	Sydän	Haima	Maha (etumaha, rauhasmaha)
Lisämunuainen	Sykkyräsuoli	Lisäkilpirauhanen	[Hampaat]
Aortta	Tyhjäsuoli	Ääreishermo	Kivekset
Aivot (mukaan luettuina osia iso- ja pikkuaivoista sekä aivosillasta)	Munuaiset	Aivolisäke	Kateenkorva
Umpisuoli	Kyynelrauha-nen (silmän ulkopuolelta)	Eturauhanen	Kilpirauhanen

Kohdunkaula	Maksa	Peräsuoli	[Kieli]
Eturauhasen etuosa	Keuhkot	Sylkirauhanen	Henkitorvi
Paksusuoli	Imusolmukkeet (pinnalliset ja syvät)	Rakkularauhanen	Virtsarakko
Pohjukaissuoli	Rintarauhanen (pakollinen naarailla; mikäli selvästi dissekoitavissa, myös uroksilla)	Luurankolihas	Kohtu (mukaan luettuna kohdunkaula)
Lisäkivekset	[Ylähengitystiet, mukaan luettuina nenä, kuorikot ja sivuontelot]	Iho	[Virtsanjohdin]
Silmä (mukaan luettuna verkkokalvo)	Ruokatorvi	Selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka)	[Virtsaputki]
[Reisiluu ja nivel]	[Hajurauhanen]	Perna	Vagina
Sappirakko (muut lajit kuin rotta)	Munasarjat	[Rintalasta]	Osa luuydintä ja/tai tuore luuydinaspiraatti
Harderin rauhaset			

Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on säilytettävä. Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös elimet, joita pidetään testikemikaalin tunnettujen ominaisuuksien perusteella todennäköisinä kohde-eliminä, on säilytettävä. Tutkimuksissa, joissa altistus tapahtuu ihon kautta, on säilytettävä ne elimet, jotka on lueteltu suun kautta altistuksen yhteydessä. On oleellista, että näyte otetaan nimenomaan siitä kohdasta ihoa, johon testikemikaalia on annosteltu, ja että kyseinen ihokohta säilytetään. Hengityksen kautta altistuksen yhteydessä hengityselimistön säilytettyjen ja tutkittujen kudosten luettelon osalta on noudatettava tämän liitteen lukua B.8 (8) ja lukua B.29 (9). Muiden elinten/kudosten osalta (ja hengityselimistöstä otettujen kudosten lisäksi) on tutkittava ne elimet, jotka on mainittu suun kautta altistuksen yhteydessä esitetyssä luettelossa.

Histopatologia

56. Toksikologis-patologisten tutkimusten toteuttamisen parhaista käytännöistä on saatavana ohjeistusta (40). Vähintään seuraavat kudokset on tutkittava:

— Kaikki kudokset suuren annoksen ryhmästä ja verrokkiryhmästä

— Kaikki kudokset tutkimuksen aikana kuolleilta tai lopetetuilta eläimiltä

— Kaikki kudokset, joissa on makroskooppisia poikkeavuuksia

— Jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä histopatologisia muutoksia, samat kudokset on tutkittava kaikilta eläimiltä kaikissa muissa annosryhmissä.

— Parillisten elinten (esimerkiksi munuaisten, lisämunuaisten jne.) osalta molemmat elimet on tutkittava.

TIEDOT JA RAPORTOINTI (KARSINOGEENISUUS JA KROONINEN MYRKYLLISYYS)

Tiedot

57. Jokaisesta eläimestä on ilmoitettava tiedot kaikista arvioiduista parametreista. Yhteenveto tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin testiryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, testin aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, merkkejä myrkyllisyydestä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen myrkyllisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Yhteenvetotaulukoissa on ilmoitettava keskiarvot ja keskihajonnat (jatkuvan testin tietojen osalta) niistä eläimistä, joilla ilmeni myrkyllisiä vaikutuksia tai vaurioita. Myös vaurioiden vaikeusaste on ilmoitettava.

58. Aiemmista vertailutiedoista voi olla apua tutkimuksen tulosten tulkinnassa esimerkiksi silloin, kun näyttää siltä, että samanaikaisista verrokeista saadut tiedot ovat merkittävästi erilaisia verrattuna saman testilaitoksen/kolonian verrokkieläimiltä saatuihin uudempiin tietoihin. Jos aiempia tietoja arvioidaan, niiden on oltava peräisin samasta laboratoriosta ja liityttävä eläimiin, jotka ovat samanikäisiä ja sellaisesta kannasta, joka on tuotettu kyseistä tutkimusta edeltäneen viiden vuoden aikana.

59. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät ja analysoitavat tiedot on valittava tutkimuksen suunnitteluvaiheessa (9 kohta). Valinnassa on otettava huomioon myös eloonjäämistä koskevat korjaukset, mikäli tarpeen.

60. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot

— kemikaalin lähde

— eränumero

— todistus kemiallisesta analyysista.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— kantaja-aineen valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi.

Koe-eläimet:

— käytetty laji/kanta ja perustelut niiden valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli testin alussa

— lähde, elinolosuhteet, ravinto jne.

— kunkin eläimen paino testin alkaessa.

Testiolosuhteet:

— antoreitin ja annoksen valinnan perustelut

— tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset menetelmät tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta / ravintovalmisteesta

— analyysitiedot valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta sekä sen stabiliteetista ja homogeenisuudesta

— antoreitti ja yksityiskohdat testikemikaalin annostelusta

— inhalaatiotutkimuksissa tieto siitä, käytettiinkö vain nasaalista altistusta vai koko kehoon kohdistuvaa altistusta

— todelliset annokset (mg painokiloa kohti päivässä) ja muuntokerroin, jolla ravintovalmisteen/juomaveden testikemikaalipitoisuus (mg/kg tai ppm) muunnetaan todelliseksi annokseksi, mikäli tarpeen

— yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset (tiedot on esitettävä yhteenvetotaulukossa ja jokaisesta eläimestä erikseen):

Yleiset tiedot

— eloonjäämistä koskevat tiedot

— ruumiinpaino / ruumiinpainon muutokset

— ravinnon kulutus, ruumiinpainon lisäystä koskeva laskelmat sekä veden kulutus tarvittaessa

— toksikokineettiset tiedot, jos saatavilla

— silmätutkimuksen tiedot (jos saatavilla)

— hematologiset tiedot (jos saatavilla)

— kliinis-biokemialliset tiedot (jos saatavilla).

Kliiniset löydökset

— myrkyllisyyden merkit

— kaikkien poikkeavuuksien ilmaantuvuus (ja vaikeusaste, jos pisteytetty)

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta).

Ruumiinavaustiedot

— eläimen paino testin lopussa

— elinten painot (ja niiden suhteet tarvittaessa)

— ruumiinavauslöydökset, poikkeavuuksien ilmaantuvuus ja vaikeusaste.

Histopatologia

— muut kuin neoplastiset histopatologiset löydökset

— neoplastiset histopatologiset löydökset

— makroskooppisten ja mikroskooppisten löydösten välinen korrelaatio

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista käsittelyyn liittyvistä histopatologisista löydöksistä sekä niiden vaikeusaste

— raportti objektilasien vertaisarvioinnista.

Tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta, mukaan luettuina seuraavat seikat:

— mallintamistapoja koskeva pohdinta

— annos-vastesuhteet

— aiemmat vertailutiedot

— vaikutustapaa koskeviin tietoihin liittyvä pohdinta

— BMD-, NOAEL- tai LOAEL-arvojen määritykset

— merkitys ihmisten kannalta.

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208

4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.

5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

6) Tämän liitteen luku B.27 (Subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti – toistetuilla annoksilla tehtävä 90 vuorokauden oraalinen myrkyllisyystutkimus muilla kuin jyrsijöillä).

7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.8. (Subakuutti myrkyllisyys hengitettynä: 28 päivän tutkimus)

10) Tämän liitteen luku B.29 (Subkrooninen myrkyllisyys hengitettynä: 90 päivän tutkimus)

11) Tämän liitteen luku B.9 (Toistetun annoksen (28 päivää) myrkyllisyys (ihon kautta nautittavat aineet)).

12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793–801.

13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581–589.

14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51–56.

15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591–653.

16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1–7.

17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9–35.

18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37–68.

19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69–98.

20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729–837.

23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF&Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. S. 279–284.

26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196–1203.

27) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta, EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33.

28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86–23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06–9.

30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15–23.

32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60,

33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.

34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691–704.

35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.

36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599–609.

38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam.&Appl. Toxicol. 29: 198–201.

39) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126–131.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos."

---

7) Korvataan luku B.36 seuraavasti:

"B.36 **TOKSIKOKINETIIKKA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 417 (2010). Testikemikaalin toksikokinetiikkaa tarkastelevien tutkimusten tavoitteena on tuottaa tietoa kemikaalin imeytymisestä, jakautumisesta, biotransformaatiosta (esimerkiksi metaboliasta) ja erittymisestä, jotta pitoisuus tai annos voidaan suhteuttaa havaittuun myrkyllisyyteen ja jotta kemikaalin myrkyllisyyden mekanismia opitaan ymmärtämään paremmin. Toksikokinetiikka voi auttaa ymmärtämään toksikologisia tutkimuksia, sillä sen avulla voidaan osoittaa, että koe-eläimet altistuvat testikemikaalille systemaattisesti. Lisäksi sen avulla voidaan määrittää, mitkä ovat kiertäviä osia (alkuperäinen kemikaali / metaboliitit). Näiden tutkimusten perusteella määritetyt toksikokineettiset perusparametrit tuottavat tietoa myös testikemikaalin mahdollisesta kertyvyydestä kudoksiin ja/tai elimiin sekä testikemikaalille altistumisen aiheuttamasta mahdollisesta biotransformaatiosta.

2. Toksikokineettiset tiedot voivat vaikuttaa myös eläinmyrkyllisyystietojen asianmukaisuuden ja oleellisuuden arviointiin, kun tietoja ekstrapoloidaan ihmisiin kohdistuvien vaarojen ja/tai riskien arviointia varten. Lisäksi toksikokineettisistä tutkimuksista voidaan saada hyödyllistä tietoa annostasojen määrittämisestä myrkyllisyystutkimuksia varten (lineaarinen vs. ei-lineaarinen kinetiikka), antoreittiin liittyvistä vaikutuksista, biologisesta hyötyosuudesta sekä tutkimussuunnitelmaan liittyvistä seikoista. Tietyntyyppisiä toksikokineettisiä tietoja voidaan käyttää fysiologiaan perustuvan toksikokineettisen mallin kehittämisessä.

3. Metaboliitteihin liittyville ja toksikokineettisille tiedoille on tärkeitä käyttötarkoituksia: niiden avulla voidaan esimerkiksi ennustaa mahdollisia myrkyllisyyksiä ja vaikutustapoja sekä niiden suhdetta annostasoon ja altistumisreittiin. Metaboliatiedoista voidaan lisäksi saada hyödyllistä tietoa, jota voidaan käyttää arvioitaessa testikemikaalin eksogeenisesti tuottamille metaboliiteille altistumisen toksikologista merkitystä.

4. Asianmukaisten toksikokineettisten tietojen avulla voidaan vahvistaa kvantitatiivisten rakenne-aktiivisuussuhteiden sekä interpolointiin tai ryhmittelyyn perustuvien toimintatapojen hyväksyttävyyttä ja sovellettavuutta kemikaalien turvallisuuden arvioinnissa. Kinetiikkatietoja voidaan käyttää myös muiden tutkimusten toksikologisen merkityksen arvioinnissa (esimerkiksi *in vivo* / *in vitro*).

5. Tätä testimenetelmää voidaan soveltaa, kun testikemikaalia annetaan suun kautta, ellei muuta antoreittiä ole mainittu (katso etenkin 74–78 kohta).

ALUSTAVAT HUOMIOT

6. Eri luokkiin kuuluvien kemikaalien (esimerkiksi torjunta-aineet, biosidit, teollisuuskemikaalit) toksikokinetiikkaan liittyvien tutkittavien ominaisuuksien ja parametrien mittauksen osalta sääntelyjärjestelmissä on erilaisia vaatimuksia ja tarpeita. Toisin kuin useimmissa testimenetelmissä, tässä testimenetelmässä kuvataan toksikokineettistä testausta, johon sisältyy monia mittauksia ja tutkittavia ominaisuuksia. Tulevaisuudessa saatetaan kehittää lukuisia uusia testimenetelmiä ja/tai ohjeasiakirjoja, joissa kutakin tutkittavaa ominaisuutta kuvataan erikseen ja tarkemmin. Tämän testimenetelmän osalta se, mitä testejä tai arviointeja tehdään, määräytyy kunkin sääntelyjärjestelmän vaatimusten ja/tai tarpeiden mukaisesti.

7. Kun testikemikaalia arvioidaan sääntelytarkoituksia varten, sen toksikokineettisen käyttäytymisen määrittämiseksi voidaan joutua tekemään useita tutkimuksia. Tiettyjen sääntelytarpeiden tai tilanteiden mukaan kaikki mahdolliset tutkimukset eivät kuitenkaan ole välttämättä tarpeen testikemikaalin arvioinnissa. Toksikokineettisten tutkimusten suunnittelussa tarvitaan siis joustavuutta, kun otetaan huomioon tutkittavan testikemikaalin ominaisuudet. Joissakin tapauksissa on selvitettävä vain tietyt kysymykset testikemikaaliin liittyviä vaaroja ja riskejä koskevien huolenaiheiden hälventämiseksi. Joissakin tilanteissa toksikokineettisiä tietoja voidaan kerätä muissa tutkimuksissa tehtävän arvioinnin yhteydessä. Toisissa tilanteissa ylimääräiset ja/tai kattavammat toksikokineettiset tutkimukset voivat olla tarpeen sen mukaan, mitkä ovat sääntelytarpeet ja/tai herääkö testikemikaalin arvioinnin aikana uusia kysymyksiä.

8. Testauslaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista ja sen oleellisista metaboliiteista ja niiden analogeista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen toteuttamista tutkimuksen laadun parantamiseksi ja eläinten käytön minimoimiseksi. Tähän voi sisältyä muiden oleellisten testimenetelmien avulla saatuja tietoja (*in vivo* -tutkimukset, *in vitro* -tutkimukset ja/tai *in silico* -arvioinnit). Seuraavista tiedoista voi olla hyötyä tutkimuksen

suunnittelussa ja tulosten tulkinnassa: kemikaalin fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, kuten oktanoli-vesi-jakaantumiskerroin (ilmaistuna log P_{OW} -arvona), pKa, vesiliukoisuus, höyrynpaine ja molekyylipaino. Ne voidaan määrittää asianmukaisin menetelmin, jotka on kuvattu kulloisissakin testimenetelmissä.

RAJOITUKSET

9. Tätä testimenetelmää ei ole tarkoitettu käytettäväksi erityisolosuhteissa, kuten tiineiden tai imettävien eläinten ja niiden jälkeläisten yhteydessä tai arvioitaessa elintarvikkeita tuottavissa altistuneissa eläimissä olevia mahdollisia jäämiä. Testimenetelmän B.36 mukaisen tutkimuksen tuottamista tiedoista voidaan kuitenkin saada taustatietoa, joka ohjaa nimenomaan näihin seikkoihin liittyvien tutkimusten suunnittelua. Tätä testimenetelmää ei ole tarkoitettu nanomateriaalien testaamiseen. OECD:n testiohjeiden sovellettavuutta nanomateriaaleihin koskevasta alustavasta arvioinnista laadittu raportti viittaa siihen, että testiohje nro 417 (joka vastaa tätä testimenetelmää B.36) ei välttämättä sovellu nanomateriaaleihin (1).

MÄÄRITELMÄT

10. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä.

ELÄINTEN HYVINVOINTIA KOSKEVAT HUOMAUTUKSET

11. Ohjeita eläinten humaanista käsittelystä on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (2). OECD:n ohjeasiakirjaan GD 19 on suositeltavaa tutustua kaikkien tässä testimenetelmässä kuvattujen *in vitro*- ja *in vivo* -tutkimusten yhteydessä.

MENETELMIEN KUVAUS

Esitutkimukset

12. Esitutkimusten käyttö on erittäin suositeltavaa, kun valitaan toksikokineettisten tutkimusten kokeellisia parametreja (kuten metabolia, massatase, analyysimenetelmät, annoksen määritys, uloshengitysilman CO_2-pitoisuus jne.). Kemikaalia ei välttämättä tarvitse leimata radioaktiivisesti luonnehdittaessa joitakin näistä parametreista.

Eläinten valinta

Laji

13. Toksikokinetiikan testauksessa käytettävän eläinlajin (ja kannan) on oltava mieluiten sama kuin muissa kyseisen testikemikaalin yhteydessä toteutetuissa toksikologisissa tutkimuksissa. Yleensä on käytettävä rottaa, koska sitä on käytetty laajalti toksikologisissa tutkimuksissa. Toisten tai ylimääräisten lajien käyttö voi olla perusteltua, jos kriittisistä toksikologisista tutkimuksista on saatu näyttöä merkittävästä myrkyllisyydestä näissä lajeissa tai jos niihin liittyvä myrkyllisyys/toksikokinetiikka osoittautuu olevan ihmisen kannalta merkityksellisempää. Eläinlajin ja kannan valinta on perusteltava.

14. Ellei muuta ole mainittu, tässä testimenetelmässä testilajilla tarkoitetaan rottaa. Tiettyjä menetelmän näkökohtia voi olla tarpeen muokata, jos käytetään muita testilajeja.

Ikä ja kanta

15. Tutkimuksessa tulee käyttää nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä (ikä annostelun aikana yleensä 6–12 viikkoa) (katso myös 13 ja 14 kohta). Jos tutkimuksessa käytetään muita kuin nuoria täysikasvuisia eläimiä, se on perusteltava. Kaikkien eläinten on oltava samanikäisiä tutkimuksen alussa. Yksittäisten eläinten paino saa vaihdella enintään ± 20 prosenttia testiryhmän keskipainosta. Käytettävän kannan on oltava mieluiten sama kuin se, jota on käytetty testikemikaalia koskevan toksikologisen tietokannan laatimisessa.

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

16. Jokaista testattavaa annosta kohti on käytettävä vähintään neljää eläintä, joiden sukupuoli on sama. Käytettävien eläinten sukupuolen valinta on perusteltava. Kummankin sukupuolen (neljän uroksen ja neljän naaraan) käyttöä on harkittava, jos on näyttöä siitä, että myrkyllisyydessä on huomattavia sukupuoleen liittyviä eroja.

Koe-eläintilat ja ruokinta

17. Yleensä eläimet on pidettävä häkeissä yksittäin testijakson ajan. Ryhmähäkeissä pitäminen voi olla perusteltua tietyissä olosuhteissa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää). Koe-eläinhuoneen lämpötilan tulee olla 22 °C (± 3 °C) ja suhteellisen ilmankosteuden 30–70 prosenttia. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa.

Testikemikaali

18. Tutkimuksen kaikissa massataseen ja metaboliittien määrityksissä on käytettävä ^{14}C-leimattua radioaktiivista testikemikaalia. Jos voidaan osoittaa, että

— massatase ja metaboliitit voidaan määrittää asianmukaisesti käyttämällä muuta kuin radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia

— ei-radioaktiivisen testikemikaalin kanssa käytetyn menetelmän analyyttinen tarkkuus ja herkkyys on sama tai parempi kuin se, joka olisi voitu saada radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia käyttäen

radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia ei tarvitse käyttää. Myös muita radioaktiivisia ja vakaita isotooppeja voidaan käyttää varsinkin, jos kyseinen osa aiheuttaa testikemikaalin myrkyllisyyden tai on osa sitä. Jos mahdollista, radioleima on sijoitettava metabolisesti vakaan molekyylin (joka ei ole vaihdettavissa, ei poistu metabolisesti CO_2:na eikä tule osaksi organismin hiilipoolia eli biomassaa) ydinosaan. Molekyyli voi olla tarpeen leimata useista paikoista tai tietyiltä alueilta, jotta testikemikaalin metabolista kulkeutumista voidaan seurata.

19. Radioaktiivisesti leimatut ja leimaamattomat testikemikaalit on analysoitava asianmukaisilla menetelmillä puhtauden ja identiteetin määrittämiseksi. Radioaktiivisen testikemikaalin on oltava radioaktiivisesti niin puhdas kuin tietylle testikemikaalille on mahdollista (puhtausasteen on oltava mieluiten yli 95 prosenttia). Epäpuhtaudet, joiden pitoisuus on vähintään kaksi prosenttia, on pyrittävä tunnistamaan. Puhtaus sekä määritettyjen epäpuhtauksien identiteetti ja pitoisuus on ilmoitettava. Yksittäisissä sääntelyohjelmissa voidaan antaa lisäohjeita seoksista koostuvien testikemikaalien määrittämistä ja spesifikaatioita sekä puhtauden määrittämiseen tarkoitettujen menetelmien valintaa varten.

Annoksen valinta

Esitutkimus

20. Tavallisesti esitutkimukseen riittää kerta-annos suun kautta. Annoksen on oltava myrkytön mutta riittävän suuri, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit ja jotta voidaan täyttää esitutkimuksen ilmoitettu tarkoitus tämän testimenetelmän 12 kohdassa todetun mukaisesti.

Päätutkimukset

21. Päätutkimuksissa on suotavaa käyttää vähintään kahta annosta, sillä vähintään kahdesta annosryhmästä saatavista tiedoista voi olla apua määritettäessä annoksia muihin myrkyllisyystutkimuksiin ja arvioitaessa jo saatavilla olevien myrkyllisyystestien annosvastetta.

22. Kahta annosta käytettäessä molempien on oltava riittävän suuria, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit. Myrkyllisyystiedot on otettava huomioon annoksen valinnassa. Jos tietoja ei ole saatavilla (esimerkiksi akuuteista suun kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä käsittelevistä tutkimuksista, joihin on kirjattu myrkyllisyyden kliiniset merkit, tai toistuvan annoksen myrkyllisyyttä käsittelevistä tutkimuksista), suuremmaksi annokseksi voidaan harkita arvoa, joka on pienempi kuin LD_{50}-estimaatti (suun ja ihon kautta) tai LC_{50}-estimaatti (hengitysteiden kautta) tai akuutin myrkyllisyystason estimaatin pienempi arvo. Pienemmän annoksen tulee olla jokin osuus suuremmasta annoksesta.

23. Jos tutkitaan vain yhtä annostasoa, annoksen on oltava riittävän suuri, jotta eritteistä (ja tarvittaessa plasmasta) voidaan määrittää metaboliitit, mutta annoksen ei tule aiheuttaa ilmeistä myrkyllisyyttä. Lisäksi on perusteltava, miksi tutkimukseen ei sisällytetty toista annostasoa.

24. Jos on määritettävä annoksen vaikutus kineettisiin prosesseihin, kaksi annosta ei välttämättä riitä, ja vähintään yhden annoksen on oltava riittävän suuri näiden prosessien saturoimiseksi. Jos plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala (AUC-arvo) ei ole lineaarinen kahden päätutkimuksessa käytetyn annostason välillä, se on vahva osoitus siitä, että yksi tai useampi kineettinen prosessi saturoituu jossain kohdassa kahden annostason välillä.

25. Sellaisten testikemikaalien yhteydessä, joiden myrkyllisyys on vähäistä, on käytettävä enimmäisannosta 1 000 mg painokiloa kohti (suun ja ihon kautta -antoreitit) (jos annostelu tapahtuu hengitysteiden kautta, katso ohjeet tämän liitteen luvusta B.2; yleensä tämä annos on enintään 2 mg/l). Kemikaalikohtaisten pohdintojen perusteella suurempi annos voi olla tarpeen sen mukaan, mitkä ovat sääntelytarpeet. Annoksen valinta on aina perusteltava.

26. Tiedot kerta-annoksen toksikokinetiikasta ja kudoksiin jakaantumisesta saattavat riittää mahdollisen kertyvyyden ja/tai pysyvyyden määrittämiseksi. Tietyissä olosuhteissa saatetaan kuitenkin tarvita toistuvan annoksen annostelu, jotta i) mahdollista kertyvyyttä ja/tai pysyvyyttä tai toksikokineettisiä muutoksia (esimerkiksi entsyymi-induktiota ja -estoa) voidaan käsitellä tarkemmin, tai ii) jos sovellettava sääntelyjärjestelmä edellyttää sitä. Vaikka tutkimuksissa, joissa käytetään toistuvaa annostelua, pienen annoksen toistuva annostelu yleensä riittää, suuren annoksen toistuva annostelu voi kuitenkin olla tarpeen tietyissä olosuhteissa (katso myös 57 kohta).

Testikemikaalin annostelu

27. Testikemikaali on liuotettava tai suspendoitava tasaisesti samaan kantaja-aineeseen, jota on käytetty muissa testikemikaalilla tehdyissä tutkimuksissa, joissa tarkasteltiin suun kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä ja joissa käytettiin ruokintaletkua, mikäli kantaja-aineesta on saatavilla tällaisia tietoja. Kantaja-aineen valinta on perusteltava. Kantaja-aineen valinta ja annostelutilavuus on otettava huomioon tutkimuksen suunnittelussa. Tavanomainen antotapa on ruokintaletkun kautta, mutta tietyissä tilanteissa kemikaali voi olla parempi antaa gelatiinikapselissa tai ravinnon seassa (kummassakin tapauksessa on esitettävä perustelut). Jokaiselle eläimelle annettu todellinen annos on vahvistettava.

28. Ruokintaletkun kautta kerrallaan annosteltavan nesteen enimmäistilavuus määräytyy koe-eläinten koon, annoksen kantaja-aineen tyypin ja sen mukaan, onko eläin pidetty ravinnotta ennen testikemikaalin antamista. Ravinnon antaminen tai ravinnotta pitäminen ennen annostelua on perusteltava. Yleensä tilavuus on pidettävä niin pienenä kuin vesipitoisten tai muiden kuin vesipitoisten kantaja-aineiden osalta on käytännöllistä. Jyrsijöillä annoksen tilavuus saa yleensä olla enintään 10 ml painokiloa kohti. Lipofiilisempien testikemikaalien kanssa käytettävien kantaja-aineiden aloitustilavuus voi olla 4 ml painokiloa kohti. Toistuvassa annostelussa on harkittava pienempiä annostilavuuksia (esimerkiksi 2–4 ml painokiloa kohti), kun eläinten pitäminen ravinnotta päivittäin on vasta-aiheista. Mikäli mahdollista, on harkittava sen annostilavuuden käyttämistä, joka annettiin suun kautta ruokintaletkulla muissa testikemikaalin tutkimuksissa.

29. Testikemikaali voidaan annostella suonensisäisesti, ja testikemikaalin pitoisuus veressä ja/tai eritteissä voidaan mitata biologisen hyötyosuuden tai suhteellisen oraalisen absorption määrittämiseksi. Suonensisäistä annostelua koskevassa tutkimuksessa testikemikaalia annetaan kerta-annos (joka on yleensä enintään pienemmän suun kautta annettavan annoksen suuruinen, katso annoksen valinta -kohta) käyttäen asianmukaista kantaja-ainetta. Tätä ainetta on annettava sopiva tilavuus (esimerkiksi 1 ml painokiloa kohti) valittuun antopaikkaan vähintään neljälle sopivaa sukupuolta edustavalle eläimelle (molempia sukupuolia voidaan käyttää, mikäli tarpeen, katso 16 kohta). Kun testikemikaalia annetaan suonensisäisesti, annos on valmisteltava siten, että kemikaali on täysin liuennut tai suspendoitunut. Suonensisäisessä annostelussa käytettävä kantaja-aine ei saa rikkoa verisuonia tai häiritä verenvirtausta. Jos testikemikaali annetaan infuusiona, infuusionopeus on ilmoitettava ja se on pidettävä vakiona eläinten välillä, jos käytetään infuusiopumppua. Jos eläimelle asetetaan kanyyli kaulalaskimoon (testikemikaalin antamista ja/tai verinäytteiden ottamista varten) tai jos annosteluun käytetään reisilaskimoa, on käytettävä anestesiaa. Anestesian tyyppi on valittava huolellisen harkinnan perustella, sillä se voi vaikuttaa toksikokinetiikkaan. Eläinten on annettava toipua riittävästi ennen testikemikaalin ja kantaja-aineen annostelua.

30. Muita antoreittejä, kuten suun ja hengitysteiden kautta, (katso 74–78 kohta), voidaan käyttää tiettyjen testikemikaalien yhteydessä, kun otetaan huomioon niiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ja ihmisten odotuksenmukainen käyttö tai altistuminen.

Mittaukset

Massatase

31. Massatase määritetään laskemalla yhteen annetun (radioaktiivisen) annoksen prosenttiosuus, joka on erittynyt virtsaan, ulosteeseen ja uloshengitysilmaan, sekä prosenttiosuus, joka on kudoksissa, eläimen ruumiin jäännöksissä ja koe-eläinhäkin pesuvedessä (katso 46 kohta). Yleensä annostellun (radioaktiivisesti leimatun) testikemikaalin kokonaissaantoja pidetään riittävinä, kun ne ovat vähintään 90 prosenttia.

Imeytyminen

32. Alustava arvio imeytymisestä saadaan vähentämällä maha-suolikanavassa ja/tai ulosteessa olevan annoksen prosenttiosuus määritetystä massataseesta. Katso lisätietoja imeytymisen prosenttiosuuden laskemisesta 33 kohdasta. Lisätietoja eritteiden tutkimisesta on 44–49 kohdassa. Jos suun kautta annostelun jälkeisen imeytymisen määrää ei voida määrittää tarkasti massatasetutkimusten perusteella (esimerkiksi kun ulosteessa on yli 20 prosenttia annetusta annoksesta), lisätutkimukset voivat olla tarpeen. Nämä tutkimukset voivat koostua joko 1) testikemikaalin annostelusta suun kautta ja testikemikaalipitoisuuden mittaamisesta sapessa tai 2) testikemikaalin annostelusta suun kautta ja suonensisäisesti sekä testikemikaalin nettopitoisuuden mittaamisesta virtsassa, uloshengitysilmassa ja eläimen ruumiissa kummankin antoreitin osalta. Kummassakin tutkimusmenetelmässä radioaktiivisuuden mittaus toteutetaan testikemikaalin ja metaboliittien kemikaalikohtaisen analyysin korvaavana menetelmänä.

33. Jos tehdään sappeen erittymistä koskeva tutkimus, käytetään yleensä suun kautta -antoreittiä. Tässä tutkimuksessa kanyloidaan vähintään neljän sopivaa sukupuolta edustavan eläimen (tai tarvittaessa kumpaakin sukupuolta edustavien eläinten) sappitiehyet, ja eläimille annetaan kerta-annos testikemikaalia. Testikemikaalin annostelun jälkeen radioaktiivisuuden/testikemikaalin erittymistä sappeen on seurattava niin pitkään kuin on tarpeen, jotta annetusta annoksesta voidaan arvioida se prosenttiosuus, joka erittyy tätä reittiä. Sen avulla voidaan laskea suoraan suun kautta tapahtuvan imeytymisen määrä seuraavasti:

Imeytymisen prosenttiosuus = (määrä sapessa + virtsassa + uloshengitysilmassa + ruumiissa ilman maha-suolikanavan sisältöä)/annettu annos × 100

34. Tiettyihin luokkiin kuuluvien testikemikaalien osalta imeytynyt annos voi erittyä suolen limakalvojen kautta. Näissä tapauksissa katsotaan, että ulosteessa olevan annoksen prosenttiosuuden mittaus rotilta, joiden sappitiehyt on kanyloitu ja joille annos on annettu suun kautta, ei edusta imeytymätöntä annosta. Kun suoleen erittymistä oletetaan tapahtuvan, on suositeltavaa, että imeytyneen annoksen prosenttiosuus perustuu imeytymiseen, joka lasketaan vertaamalla suun kautta -reitin ja suonensisäisen reitin erittymistä (kanyloimaton tai sappitiehyeen kanyloitu rotta) (katso 35 kohta). Lisäksi suositellaan, että jos suoleen erittymisen kvantifiointia pidetään tarpeellisena, erittyminen mitataan myös rotalta, jonka sappitiehyt on kanyloitu, annoksen suonensisäisen annostelun jälkeen.

Biologinen hyötyosuus

35. Biologinen hyötyosuus voidaan määrittää suun kautta ja suonensisäisen annostelun ryhmien plasman/veren kinetiikasta 50–52 kohdassa kuvatun mukaisesti testikemikaalin ja/tai tärkeimpien metaboliittien spesifisellä kemiallisella analyysilla, jolloin radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia ei tarvita. Testikemikaalin tai tärkeimmän metaboliitin (tärkeimpien metaboliittien) biologinen hyötyosuus (F) voidaan laskea seuraavasti:

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

Tässä yhtälössä AUC on plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala ja exp tarkoittaa testattua antoreittiä (suun, ihon tai hengitysteiden kautta).

36. Systeemisten vaikutusten riskinarvioinnissa myrkyllisen komponentin biologista hyötyosuutta pidetään yleensä ensisijaisena imeytymisen prosenttiosuuteen nähden, kun eläinkokeiden systeemisiä pitoisuuksia verrataan vastaaviin biomonitorointitietoihin, jotka on saatu työntekijöiden altistumistutkimuksista. Tilanne voi muuttua monimutkaisemmaksi, jos annokset ovat ei-lineaarisella alueella, joten on tärkeää, että toksikokineettisessä seulonnassa määritetään lineaarisen alueen annokset.

Kudoksiin jakautuminen

37. Tieto testikemikaalin ja/tai sen metaboliittien jakautumisesta kudoksiin on tärkeää kohdekudosten tunnistamiseksi, myrkyllisyyden taustalla olevien mekanismien ymmärtämiseksi sekä tiedon saamiseksi testikemikaalin ja sen metaboliittien mahdollisesta kertyvyydestä ja pysyvyydestä. Kudoksissa ja eläimen ruumiissa olevan (radioaktiivisen) kokonaisannoksen prosenttiosuus on mitattava vähintään erityskokeen päättyessä (yleensä viimeistään seitsemän päivän kuluttua annoksen antamisesta tai aikaisemmin testikemikaalille tyypillisen käyttäytymisen mukaan). Jos kudoksissa ei havaita testikemikaalia tutkimuksen päättyessä (esimerkiksi sen takia, että testikemikaali on voinut eliminoitua ennen tutkimuksen päättymistä lyhyen puoliintumisajan vuoksi), tulosten tulkinnassa on oltava huolellinen virhetulkintojen välttämiseksi. Tällaisissa tilanteissa kudoksiin jakautumista on tutkittava samalla kun tutkitaan testikemikaalin (ja/tai metaboliitin) huippupitoisuutta plasmassa/veressä (T_{max}) tai virtsaan erittymisen huippunopeutta, mikäli tarpeen (katso 38 kohta). Lisäksi tietyissä aikapisteissä on mahdollisesti otettava kudosnäytteitä, jotta voidaan arvioida testikemikaalin ja/tai sen metaboliittien jakautumista kudoksiin sekä aikariippuvuutta (mikäli tarpeen). Siitä on apua myös massataseen määrittämisessä ja/tai muissa seikoissa sen mukaan, mitä toimivaltainen viranomainen edellyttää. Kudosnäytteet on otettava seuraavista kudoksista: maksa, rasva, maha-suolikanava, munuaiset, perna, kokoveri, eläimen ruumis, kohde-elimen kudokset ja muut sellaiset kudokset, joilla voi olla merkitystä testikemikaalin toksikologisessa arvioinnissa (esimerkiksi kilpirauhanen, punasolut, lisääntymiselimet, iho, silmät (etenkin värillisillä eläimillä)). Ylimääräisten kudosten analyysia samoissa aikapisteissä on harkittava, jotta eläimiä voidaan käyttää mahdollisimman tehokkaasti, ja erityisesti silloin, kun kohde-elimeen kohdistuvaa myrkyllisyyttä havaitaan subkroonisissa tai kroonisissa myrkyllisyystutkimuksissa. (Radioaktiivinen) jäämäpitoisuus ja kudos/plasma-pitoisuussuhde on myös ilmoitettava.

38. Lisäksi kudokseen jakautumisen arviointia voidaan tarvita muissa aikapisteissä, kuten plasman/veren huippupitoisuuden (esimerkiksi T_{max}) tai virtsaan erittymisen huippunopeuden aikana (ne on selvitetty plasman/veren kinetiikkaa tai erittymistä käsittelevissä kokeissa). Myös toimivaltainen viranomainen voi edellyttää näitä arviointeja. Nämä tiedot voivat olla hyödyllisiä, kun pyritään ymmärtämään myrkyllisyyttä sekä testikemikaalin ja metaboliittien kertyvyyttä ja pysyvyyttä. Näytteiden valinta on perusteltava; yleensä analysoitavien näytteiden on oltava samoja kuin edellä mainitut (katso 37 kohta).

39. Radioaktiivisuuden kvantifiointi kudoksiin jakautumista käsittelevissä tutkimuksissa voidaan toteuttaa seuraavilla menetelmillä: elinten dissekointi, homogenisointi, polttaminen ja/tai liuottaminen sekä talteen otettujen jäämien nestetuikelaskenta (LSC). Tietyt tekniikat, esimerkiksi määrällinen koko kehon autoradiografia ja reseptoreiden mikroskooppinen autoradiografia, voivat osoittautua hyödyllisiksi, kun määritetään testikemikaalin jakautumista elimiin ja/tai kudoksiin (3) (4), vaikka näiden tekniikoiden kehitys on eri vaiheessa.

40. Muiden altistumisreittien kuin suun kautta -reitin osalta näytteet on kerättävä ja analysoitava tietyistä kudoksista, esimerkiksi inhalaatiotutkimuksissa keuhkoista ja ihotutkimuksissa ihosta. Katso 74–78 kohta.

Metabolia

41. Eritteistä (ja plasmasta, jos tarpeen) on otettava näytteet, jotta muuttumaton testikemikaali ja metaboliitit voidaan määrittää ja kvantifioida 44–49 kohdassa kuvatun mukaisesti. Näytteiden yhdistäminen metaboliittien määrittämiseksi tietyssä annosryhmässä on hyväksyttävää. Metaboliittien profilointi kultakin ajanjaksolta on suositeltavaa. Jos tämä ei ole mahdollista näytteiden puuttumisen ja/tai radioaktiivisuuden vuoksi, virtsa- ja ulostenäytteiden yhdistäminen eri aikapisteistä on hyväksyttävää. Sen sijaan eri sukupuolilta peräisin olevien tai eri annoksiin liittyvien näytteiden yhdistäminen ei ole hyväksyttävää. Käsiteltyjen eläinten virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman (ja tarvittaessa sapen) radioaktiivisuus on arvioitava käyttäen asianmukaisia laadullisia ja määrällisiä menetelmiä.

42. Kaikki metaboliitit, joiden määrä on vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, on pyrittävä määrittämään, jotta testikemikaalista voidaan laatia metaboliamalli. Testikemikaalit, joiden määrän eritteissä on havaittu olevan vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, on määritettävä. Määrittäminen tarkoittaa komponenttien tarkkaa rakenteellista määrittelemistä. Tavallisesti määritys tehdään joko metaboliitin rinnakkaiskromatografialla tunnettujen standardien mukaisesti käyttäen kahta erilaista järjestelmää tai tekniikoita, joilla positiivinen rakennemääritys on mahdollista. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi massaspektrometria, ydinmagneettiresonanssispektroskopia (NMR) jne. Rinnakkaiskromatografian osalta kromatografiatekniikoita, joissa hyödynnetään samaa paikallaan pysyvää faasia kahden erilaisen liuotinjärjestelmän kanssa, ei pidetä riittävänä kahden menetelmän varmistuksena metaboliitin identiteetille, koska menetelmät eivät ole toisistaan riippumattomia. Rinnakkaiskromatografialla määrittäminen on tehtävä käyttämällä kahta erilaista, analyyttisesti riippumatonta järjestelmää, kuten ohutlevykromatografiaa (käänteisfaasi- ja suorafaasi-TLC:tä) ja korkean suorituskyvyn nestekromatografiaa (HPLC:tä). Jos kromatografinen erottelu on laadultaan hyväksyttävä, spektroskopian keinoin tehtävä lisävahvistus ei ole tarpeen. Selvä määritys voidaan tuottaa vaihtoehtoisesti menetelmillä, joista saadaan rakenteellista tietoa. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi nestekromatografia/massaspektrometria (LC-MS) tai nestekromatografia / kaksivaiheinen massaspektrometria (LC-MS/MS), kaasukromatografia/massaspektrometria (GC-MS) ja NMR-spektrometria.

43. Jos ei ole mahdollista määrittää metaboliitteja, joiden pitoisuus on vähintään viisi prosenttia annetusta annoksesta, loppuraportissa on esitettävä sille perustelut tai selitys. Voi olla tarkoituksenmukaista määrittää myös metaboliitteja, joiden pitoisuus on alle viisi prosenttia annetusta annoksesta. Tämä auttaa ymmärtämään metaboliareittiä testikemikaaliin liittyvien vaarojen ja/tai riskin arvioimisen kannalta paremmin. Rakenne on vahvistettava aina kun mahdollista. Tähän voi sisältyä myös profilointi plasmassa tai veressä tai muissa kudoksissa.

Erittyminen

44. Annetun annoksen erittymisnopeus ja -määrä on määritettävä mittaamalla virtsasta, ulosteesta ja uloshengitysilmasta talteen otetun (radioaktiivisen) annoksen prosenttiosuus. Näistä tiedoista on apua myös massataseen määrittämisessä. Virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman kautta erittyneen testikemikaalin määrät on määritettävä sopivin väliajoin (katso 47–49 kohta). Toistuvan annoksen kokeet on suunniteltava asianmukaisesti siten, että erittymistietojen kerääminen on mahdollista 26 kohdassa kuvattujen tavoitteiden saavuttamiseksi. Tämän avulla vertailu kerta-annoskokeisiin on mahdollista.

45. Jos esitutkimus on osoittanut, ettei testikemikaalia (radioaktiivisuutta) erity uloshengitysilmaan suuria määriä (49 kohdan mukaisesti), varsinaisessa tutkimuksessa ei tarvitse kerätä uloshengitysilmaa.

46. Jokainen eläin on sijoitettava erilliseen metaboliahäkkiin eritteiden (virtsan, ulosteen ja uloshengitysilman) keräämistä varten. Kunkin keräysvaiheen lopuksi (katso 47–49 kohta) metaboliahäkit on huuhdeltava sopivalla liuottimella (tätä kutsutaan "häkin pesuvedeksi"), jotta varmistetaan, että testikemikaalia saadaan talteen mahdollisimman paljon (radioaktiivisuus). Eritteiden kerääminen on lopetettava seitsemäntenä päivänä tai sen jälkeen, kun vähintään 90 prosenttia annetusta annoksesta on saatu talteen sen mukaan, kumpi vaatimus täyttyy ensin.

47. Testikemikaalin (radioaktiivisuuden) kokonaismäärät virtsassa on määritettävä vähintään kahdessa aikapisteessä ensimmäisenä keruupäivänä. Toisen niistä on oltava 24 tuntia annostelun jälkeen. Sen jälkeen tämä on tehtävä päivittäin tutkimuksen päättymiseen saakka. Useamman kuin kahden näytteenottoajankohdan käyttäminen ensimmäisenä päivänä (esimerkiksi 6, 12 ja 24 tunnin kuluttua) on suositeltavaa. Esitutkimusten tulokset tulee analysoida tietojen saamiseksi vaihtoehtoisista tai ylimääräisistä näytteidenkeruun aikapisteistä. Näytteidenkeruuaikataulut on perusteltava.

48. Testikemikaalin (radioaktiivisuuden) kokonaismäärät ulosteessa on määritettävä päivittäin tutkimuksen päättymiseen saakka siten, että ensimmäinen määritys tehdään 24 tunnin kuluttua annoksen antamisesta, elleivät vaihtoehtoiset tai ylimääräiset aikapisteet ole esitutkimusten mukaan tarkoituksenmukaisempia. Vaihtoehtoiset näytteidenkeruuaikataulut on perusteltava.

49. Uloshengitysilman CO_2:n ja muiden haihtuvien aineiden kerääminen voidaan lopettaa tietyssä kokeessa, jos uloshengitysilmassa havaitaan alle yksi prosentti annetusta annoksesta 24 tunnin pituisen keräysjakson aikana.

Aikaan perustuvat tutkimukset

Plasman/veren kinetiikka

50. Näiden tutkimusten tarkoituksena on tuottaa estimaatit testikemikaalin toksikokineettisistä perusparametreista [esimerkiksi C_{max}, T_{max}-puoliintumisaika ($t_{1/2}$), AUC]. Nämä tutkimukset voidaan tehdä yhdellä annoksella, mieluummin kuitenkin kahdella tai useammalla annoksella. Annos on määritettävä kokeen luonteen ja/tai käsiteltävän ongelman mukaan. Kinetiikkatietoja voidaan tarvita tiettyjen ongelmien, kuten testikemikaalin biologisen hyötyosuuden, ratkaisemiseksi tai sen selvittämiseksi, miten annos vaikuttaa puhdistumaan (ts. saturoituuko puhdistuma annoksesta riippuvalla tavalla).

51. Näissä tutkimuksissa tulee käyttää vähintään neljää eläintä sukupuolta ja annosryhmää kohti. Käytettävien eläinten sukupuolen valinta on perusteltava. Kummankin sukupuolen (neljän uroksen ja neljän naaraan) käyttöä on harkittava, jos on näyttöä siitä, että myrkyllisyydessä on huomattavia sukupuoleen liittyviä eroja.

52. (Radioaktiivisesti leimatun) testikemikaalin antamisen jälkeen jokaiselta eläimeltä on otettava verinäyte sopivissa aikapisteissä käyttäen asianmukaista näytteenottomenetelmää. Eläintä kohti otettavien verinäytteiden tilavuutta ja lukumäärää voidaan joutua rajoittamaan siksi, että toistuva näytteenotto saattaa vaikuttaa eläimen terveyteen/fysiologiaan ja/tai analyysimenetelmän herkkyyteen. Jokaisen eläimen näytteet on analysoitava erikseen. Tietyissä olosuhteissa (esimerkiksi metaboliittien luonnehdinta) voi olla tarpeen yhdistää useamman kuin yhden eläimen näytteitä. Yhdistetyt näytteet on merkittävä selvästi, ja yhdistämiselle on esitettävä perustelut. Jos käytetään radioaktiivisesti leimattua testikemikaalia, kokonaisradioaktiivisuuden analyysi voi olla tarkoituksenmukaista. Jos näin on, kokonaisradioaktiivisuus on analysoitava kokoverestä ja plasmasta tai plasmasta ja punasoluista veri-plasmasuhteen laskemiseksi. Muissa tapauksissa tarkemmat tutkimukset, jotka edellyttävät perusyhdisteen ja/tai metaboliittien määrittämistä tai proteiineihin sitoutumisen arviointia, voivat olla tarpeen.

Muu kudoskinetiikka

53. Näiden tutkimusten tarkoituksena on tuottaa aikaan liittyvää tietoa, jotta myrkyllistä vaikutustapaa, biokertyvyyttä ja biopysyvyyttä koskeviin kysymyksiin voidaan vastata määrittämällä testikemikaalin pitoisuudet eri kudoksissa. Kudosten valinta ja arvioitavien aikapisteiden määrä määräytyvät käsiteltävän kudoksen ja testikemikaalia koskevan toksikologisen tietokannan mukaan. Tällaisten ylimääräisten kudoskinetiikkaa käsittelevien tutkimusten suunnittelussa on otettava huomioon kerätyt tiedot 37–40 kohdissa kuvatun mukaisesti. Näissä tutkimuksissa voidaan käyttää kerta-annosta tai toistuvaa annostelua. Käytettävä lähestymistapa on perusteltava yksityiskohtaisesti.

54. Muiden kudoskinetiikkaa käsittelevien tutkimusten toteuttamisen syitä voivat olla esimerkiksi seuraavat:

— Näyttö pidentyneestä puoliintumisajasta veressä, mikä viittaa siihen, että testikemikaali mahdollisesti kertyy eri kudoksiin.

— Tarve selvittää, onko vakaa tila saavutettu tietyissä kudoksissa (esimerkiksi toistuvan annostelun tutkimuksissa, sillä vaikka testikemikaalin näennäinen vakaa tila veressä on saavutettu, voi olla tarpeen varmistaa, että vakaa tila on saavutettu myös kohdekudoksissa).

55. Tämäntyyppisissä aikaan perustuvissa tutkimuksissa vähintään neljälle eläimelle annosta ja aikapistettä kohti on annettava sopiva annos testikemikaalia suun kautta, ja jakautumista valittuihin kudoksiin on seurattava ajan suhteen. Vain yhtä sukupuolta voidaan käyttää, ellei myrkyllisyyden ole havaittu olevan sukupuolikohtaista. Se, analysoidaanko kokonaisradioaktiivisuutta tai alkuperäistä kemikaalia ja/tai metaboliitteja, määräytyy myös käsiteltävän ongelman perusteella. Kudoksiin jakautuminen on arvioitava asianmukaisia tekniikoita käyttäen.

Entsyymi-induktio/-esto

56. Yhdessä tai useammassa jäljempänä luetellussa tapauksessa saatetaan tarvita tutkimuksia, joissa tarkastellaan entsyymi-induktion/-eston mahdollisia vaikutuksia tai tutkittavana olevan testikemikaalin biotransformaatiota.

1) Saatavilla oleva näyttö osoittaa, että testikemikaalin biotransformaation ja lisääntyneen myrkyllisyyden välillä on suhde.

2) Saatavilla olevat myrkyllisyystiedot osoittavat, että annoksen ja metabolian välinen suhde on ei-lineaarinen.

3) Metaboliittien määritystutkimusten tulosten mukaan on määritetty mahdollisesti myrkyllinen metaboliitti, joka on voinut syntyä testikemikaalin indusoimaa entsyymireittiä pitkin.

4) Kun tavoitteena on selittää vaikutuksia, joiden oletetaan liittyvän entsyymi-induktion ilmiöihin.

5) Jos testikemikaalin metabolisessa profiilissa havaitaan toksikologisesti merkittäviä muutoksia joko *in vitro*- tai *in vivo* -kokeissa, jotka on tehty eri lajeilla tai eri olosuhteissa, kyseisen entsyymin (kyseisten entsyymien) luonnehdinta voi olla tarpeen (esimerkiksi I vaiheen entsyymit, kuten sytokromi P450 -riippuvaisen monooksigenaasijärjestelmän isoentsyymit, vaiheen II entsyymit, kuten sulfotransferaasin tai uridiinidifosfaattiglukuronosyylitransferaasin isoentsyymit tai muut oleelliset entsyymit). Näitä tietoja voidaan käyttää lajienvälisten ekstrapolointien asianmukaisuuden arvioinnissa.

57. Kun arvioidaan testikemikaaliin liittyviä muutoksia toksikokinetiikassa, on käytettävä sopivia tutkimusprotokollia, jotka on validoitu ja perusteltu asianmukaisesti. Esimerkinomaisiin tutkimussuunnitelmiin sisältyy leimaamattoman testikemikaalin toistuva annostelu, jonka jälkeen annetaan radioaktiivisesti leimattu kerta-annos päivänä 14, tai radioaktiivisesti leimatun kemikaalin toistuva annostelu ja näytteenotot päivinä 1, 7 ja 14 metaboliittien profiilien määrittelemiseksi. Radioaktiivisesti leimatun testikemikaalin toistuva annostelu voi tuottaa tietoa myös biokertyvyydestä (katso 26 kohta).

TÄYDENTÄVÄT TUTKIMUKSET

58. Tässä testimenetelmässä kuvattujen *in vivo* -kokeiden lisäksi tehtävistä täydentävistä tutkimuksista voidaan saada hyödyllistä tietoa testikemikaalin imeytymisestä, jakautumisesta, metaboliasta ja eliminoitumisesta tietyissä lajeissa.

***In vitro* -tietojen käyttö**

59. *In vitro* -tutkimuksissa, joissa käytetään asianmukaisia testijärjestelmiä, voidaan käsitellä useita testikemikaalin metaboliaan liittyviä kysymyksiä. Mahdollisten metaboliittien tutkimiseen voidaan käyttää maksasta eristettyjä tai kasvatettuja hepatosyyttejä ja subsellulaarisia fraktioita (esimerkiksi mikrosomeja ja sytosolia tai S9-fraktiota). Kohde-elimen, kuten keuhkojen, paikallinen metabolia voi olla tutkimisen arvoinen riskinarvioinnin kannalta. Näihin tarkoituksiin kannattaa hyödyntää kohdekudosten mikrosomaalisia fraktioita. Mikrosomeilla tehtävät tutkimukset voivat olla hyödyllisiä mahdollisten sukupuoleen ja elinkaaren vaiheeseen liittyvien erojen selvittämiseksi ja entsyymiparametrien (K_m ja V_{max}) luonnehtimiseksi, sillä niistä voi olla apua metabolian annosriippuvuuden ja altistustasojen välisen suhteen arvioimisessa. Lisäksi mikrosomit voivat olla hyödyllisiä, kun määritetään tiettyjä testikemikaalin metaboliaan osallistuvia mikrosomaalisia entsyymejä, joilla voi olla merkitystä lajienvälisessä ekstrapoloinnissa (katso myös 56 kohta). Biotransformaation mahdollista indusoitumista voidaan myös tutkia käyttämällä kyseisellä testikemikaalilla esikäsiteltyjen eläinten maksan subsellulaarisia fraktioita (esimerkiksi mikrosomeja ja sytosolia). Sitä voidaan tutkia myös *in vitro* hepatosyyttien induktiotutkimusten tai tiettyjen, oleellisia entsyymejä ilmentävien solulinjojen avulla. Tietyissä tilanteissa ja asianmukaisissa olosuhteissa voidaan harkita myös ihmisten kudoksista peräisin olevien subsellulaaristen fraktioiden käyttöä, kun määritetään biotransformaation mahdollisia lajien välisiä eroja. *In vitro* -tutkimusten tulokset voivat olla käyttökelpoisia myös fysiologiaan perustuvien toksikokineettisten mallien (5) kehittämisessä.

60. Ihon kautta imeytymistä käsittelevistä *in vitro* -tutkimuksista saatetaan saada täydentäviä tietoja imeytymisen luonnehtimiseksi (6).

61. Kun käsitellään samanlaisia kysymyksiä kuin maksan mikrosomien yhteydessä, voidaan käyttää maksasoluista peräisin olevia primaarisia soluviljelmiä ja tuoreita kudosleikkeitä. Joissakin tapauksissa voi olla mahdollista ratkaista tiettyjä kysymyksiä käyttämällä solulinjoja, joiden on määritetty ilmentävän oleellista entsyymiä, tai yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotettuja solulinjoja. Tietyissä tapauksissa kannattaa tutkia tiettyjen sytokromi P450 -isotsyymien (esimerkiksi CYP1A1:n, 2E1:n, 1A2:n ja muiden) ja/tai II vaiheen entsyymien estoa ja induktiota perusyhdisteellä käyttäen *in vitro* -tutkimuksia. Näin hankituista tiedoista saattaa olla hyötyä rakenteeltaan samanlaisten yhdisteiden tutkimuksissa.

Myrkyllisyystutkimuksista peräisin olevien toksikokineettisten tietojen käyttö täydentävinä tietoina

62. Muissa myrkyllisyystutkimuksissa otettujen veri-, kudos- ja/tai eritenäytteiden analyysi voi tuottaa tietoa biologisesta hyötyosuudesta, plasmapitoisuuden muutoksista aikaan nähden (AUC, C_{max}), biokertyvyyspotentiaalista, puhdistumasta sekä sukupuoleen tai elinkaaren vaiheeseen liittyvistä muutoksista metaboliassa ja kinetiikassa.

63. Tutkimussuunnitelmassa voidaan tarkastella esimerkiksi seuraaviin seikkoihin liittyviä kysymyksiä: imeytymisen saturaatio, biotransformaatio- tai erittymisreitit suuremmilla annoksilla, uusien metaboliareittien toiminta suuremmilla annoksilla ja myrkyllisten metaboliittien rajoittuminen suurempiin annoksiin.

64. Muita vaaran arvioinnissa huomioon otettavia seikkoja voivat olla esimerkiksi seuraavat:

— Ikään liittyvä herkkyys, joka johtuu veri-aivoesteen ja munuaisten tilan eroista sekä detoksifikaatiokapasiteeteista

— Alapopulaation herkkyys, joka johtuu biotransformaatiokapasiteettien eroista tai muista toksikokineettisistä eroista

— Sikiön tai poikasen altistumisen laajuus (istukan läpi tai imetyksen kautta kulkeutuvat kemikaalit).

Toksikokineettisen mallintamisen käyttö

65. Toksikokineettiset mallit voivat olla hyödyllisiä vaaran ja riskinarvioinnin eri näkökohtien kannalta, esimerkiksi systeemisen altistuksen ja sisäisen kudosannoksen ennustamisessa. Mallien avulla voidaan käsitellä myös vaikutustapaan liittyviä erityiskysymyksiä. Mallit voivat olla myös perusteena lajienvälisen, altistusreittien ja annostusmallien ekstrapoloinnille sekä ihmisiin kohdistuvan riskin arvioinnille. Fysiologiaan perustuvien toksikokineettisten mallien, jotka koskevat tiettyä testikemikaalia ja tiettyä lajia, kehittämisessä hyödyllisiä tietoja ovat 1) jakaantumiskertoimet, 2) biokemialliset vakiot ja fysiologiset parametrit, 3) reittikohtaiset imeytymisparametrit ja 4) *in vivo* -kinetiikkatiedot mallin arviointia varten (esimerkiksi oleellisten (> 10 prosenttia) erittymisreittien puhdistumaparametrit, metabolian K_m- ja V_{max}-arvot). Mallin kehittämisessä käytetyt kokeelliset tiedot on tuotettava tieteellisesti pätevillä menetelmillä, ja mallin avulla saadut tulokset on validoitava. Testikemikaali- ja lajikohtaiset parametrit, kuten imeytymisasteet, verenkiertoon ja kudoksiin jakaantuminen ja metaboliset nopeusvakiot, määritetään usein siksi, että tilavapaiden (non-compartmental) tai fysiologiaan perustuvien mallien kehittäminen on helpompaa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

66. On suositeltavaa, että tutkimusraportissa on sisällysluettelo.

Raportin rakenne

67. Raportin tulee sisältää tämän testimenetelmän kattamat tiedot, ja ne on järjestettävä eri osiin ja kohtiin seuraavasti:

Yhteenveto

68. Tässä tutkimusraportin osassa on oltava yhteenveto tutkimussuunnitelmasta ja kuvaus käytetyistä menetelmistä. Siinä on myös esitettävä keskeiset löydökset, jotka koskevat massatasetta, metaboliittien luonnetta ja määrää, kudosjäämiä, puhdistumanopeutta, biokertyvyyspotentiaalia, sukupuolten välisiä eroja jne. Yhteenveto on laadittava riittävän yksityiskohtaisesti, jotta löydöksiä voidaan arvioida.

Johdanto

69. Raportin tämän osan tulee sisältää tutkimuksen tavoitteet, perustelut ja tutkimussuunnitelma sekä asianmukaiset viitteet ja taustatiedot.

Aineet ja menetelmät

70. Raportin tässä osassa on esitettävä yksityiskohtainen kuvaus kaikista asianmukaisista tiedoista seuraavasti:

a) Testikemikaali

Tässä alakohdassa on esitettävä testikemikaalista seuraavat tunnistetiedot: kemiallinen nimi, molekyylirakenne, sen kemiallisen koostumuksen laadullinen ja määrällinen määritys, kemiallinen puhtaus ja epäpuhtauksien tyyppi ja määrät, mikäli mahdollista. Myös seuraavat tiedot on esitettävä: fysikaalis-kemialliset ominaisuudet sekä fysikaalinen olomuoto, väri, kokonaisliukoisuus ja/tai jakaantumiskerroin, stabiliteetti ja tarvittaessa syövyttävyys. Mikäli tarpeen, myös isomeerejä koskevat tiedot on esitettävä. Jos testikemikaali on leimattu radioaktiivisella aineella, tähän alakohtaan on sisällyttävä myös seuraavat tiedot: radionuklidin tyyppi, leiman sijainti, spesifinen aktiivisuus ja radiokemiallinen puhtaus.

Kantaja-aineen, laimenteiden, suspendoivien aineiden ja emulgointiaineiden tai muiden testikemikaalin annostelussa käytettyjen aineiden tyyppi tai kuvaus niistä on ilmoitettava.

b) Koe-eläimet

Tässä alakohdassa on esitettävä tiedot koe-eläimistä, mukaan luettuina seuraavat seikat: lajin ja kannan valinta sekä perustelut, eläinten ikä tutkimuksen alkaessa, sukupuoli ja paino, terveydentila ja eläinten hoito.

c) Menetelmät

Tässä alakohdassa on esitettävä yksityiskohdat tutkimussuunnitelmasta ja käytetystä menetelmästä. Alakohdassa on esitettävä myös seuraavat tiedot:

1) Perustelut altistumisreitin ja altistusolosuhteiden muuttamiselle, mikäli tarpeen

2) Perustelut annostasojen valinnalle

3) Kuvaus seurantatutkimusten kokeellisissa osioissa käytetyistä esitutkimuksista, mikäli tarpeen. Tiedot vahvistava esitutkimus on toimitettava.

4) Tiedot siitä, miten annosteluliuos valmistettiin, sekä mahdollisesti käytetyn liuottimen tai kantaja-aineen tyyppi

5) Testiryhmien lukumäärä ja kussakin ryhmässä olleiden eläinten lukumäärä

6) Annostelutasot ja tilavuus (ja annoksen spesifinen aktiivisuus, jos käytettiin radioaktiivista ainetta)

7) Antoreitti (-reitit) ja -menetelmät

8) Annostelutiheys

9) Paastojakso (jos käytetty)

10) Eläinkohtainen kokonaisradioaktiivisuus

11) Eläinten käsittely

12) Näytteiden kerääminen ja käsittely

13) Metaboliittien erottelussa, kvantifioinnissa ja määrittämisessä käytetyt analyysimenetelmät

14) Käytettyjen menetelmien havaitsemisrajat

15) Muut käytetyt kokeelliset mittaukset ja menettelyt (sekä metaboliittien analysoinnissa käytettyjen menetelmien validointi)

d) Tilastollinen analyysi

Jos tutkimustulosten analysoinnissa käytetään tilastollista analyysia, analyysimenetelmästä ja käytetystä tilastoohjelmasta on esitettävä tarpeeksi tietoa, jotta puolueeton arvioija/tilastotieteilijä voi arvioida ja rekonstruoida analyysin uudestaan.

Järjestelmien mallintamistutkimusten (kuten fysiologiaan perustuvat toksikokineettiset mallit) osalta on esitettävä täydellinen kuvaus mallista, jotta malli voidaan rekonstruoida ja validoida riippumattomasti (katso 65 kohta ja lisäys: Määritelmät).

Tulokset

71. Yhteenveto kaikista tiedoista on esitettävä taulukossa asianmukaisen tilastollisen arvioinnin kanssa, ja tiedot on kuvattava tämän osan tekstissä. Yhteenveto radioaktiivisuuden laskentatiedoista on esitettävä tutkimuksen kannalta tarkoituksenmukaisella tavalla, yleensä mikrogramman tai milligramman ekvivalentteina näytteen massaa kohti, joskin myös muita yksiköitä voidaan käyttää. Tämän osan on sisällettävä kaavioita, jotka kuvaavat löydöksiä, jäljennöksiä edustavista kromatografia- ja spektrometriatiedoista, metaboliittien määrittämistä/kvantifiointia sekä ehdotettuja metaboliareittejä metaboliittien molekyylirakenne mukaan luettuna. Lisäksi tämän osan on sisällettävä seuraavat tiedot, mikäli tarpeen:

1) Radioaktiivisuuden määrä ja saanto virtsassa, ulosteessa, uloshengitysilmassa sekä häkin pesuvedessä olevassa virtsassa ja ulosteessa.

— Ihotutkimusten osalta on sisällytettävä myös tiedot käsitellyltä iholta talteenotetusta testikemikaalista, ihohuuhteluista ja ihon jäännösradioaktiivisuudesta, mukaan luettuina laitteet ja metaboliayksikkö sekä ihonpesututkimuksen tulokset. Katso lisätietoja 74–77 kohdasta.

— Inhalaatiotutkimusten osalta on sisällytettävä myös tiedot testikemikaalin saannosta keuhkoista ja nenän kudoksista (8). Katso lisätietoja 78 kohdasta.

2) Kudoksiin jakautuminen (ilmoitettava prosenttiosuutena annetusta annoksesta ja pitoisuudesta (mikrogramman ekvivalentteina kudosgrammaa kohti)) ja kudoksista verenkiertoon tai kudoksista plasmaan -suhteet.

3) Jokaisen tutkimuksen perusteella laadittu ainetase sekä kudosten ja eritteiden analyysi.

4) Plasmapitoisuudet ja toksikokineettiset parametrit (biologinen hyötyosuus, AUC, Cmax, Tmax, puhdistuma, puoliintumisaika) sen jälkeen, kun kemikaalia on annettu oleellista altistumisreittiä (oleellisia altistumisreittejä) pitkin.

5) Testikemikaalin imeytymisnopeus ja -laajuus sen jälkeen, kun sitä on annettu oleellista altistumisreittiä (oleellisia altistumisreittejä) pitkin.

6) Eritteistä talteenotettujen testikemikaalin ja metaboliittien määrät (ilmoitetaan prosenttiosuutena annetusta annoksesta).

7) Viittaus liitteessä esitettäviin tietoihin, jotka sisältävät jokaisen eläimen tiedot kaikista mittaustuloksista (esimerkiksi annoksen annostelu, saannon prosenttiosuus, pitoisuudet, toksikokineettiset parametrit jne.)

8) Kuva ehdotetuista metaboliareiteistä ja metaboliittien molekyylirakenteista.

Pohdinta ja päätelmät

72. Tässä osassa kirjoittajan (kirjoittajien) on

1) esitettävä ehdotettu metaboliareitti, joka perustuu metaboliaa koskeviin tuloksiin ja testikemikaalin jakautumiseen eri komponentteihin

2) pohdittava mahdollisia lajien ja sukupuolten välisiä eroja testikemikaalin jakautumisessa ja/tai biotransformaatiossa

3) taulukoitava seuraavat tiedot ja pohdittava niitä: metaboliittien määrittäminen ja niiden lukumäärä, puhdistumanopeudet, biokertyvyyspotentiaali sekä perusaineen ja/tai metaboliitin (metaboliittien) kudosjäämäpitoisuus ja toksikokineettisten parametrien mahdolliset annosriippuvaiset muutokset, mikäli tarpeen

4) sisällytettävä tähän osaan kaikki oleelliset myrkyllisyystutkimusten aikana saadut toksikokineettiset tiedot

5) esitettävä ytimekkäät päätelmät, joita tutkimuksen tulokset tukevat

6) lisättävä osia (jos tarpeen).

73. Muita osia tulee käyttää tutkimusta tukevien kirjallisuustietojen, taulukoiden, kuvien, liitteiden jne. lisäämiseksi raporttiin.

VAIHTOEHTOISET ALTISTUMISREITIT

Ihon kautta altistus

Ihon kautta käsittely

74. Tässä osassa esitetään spesifistä tietoa ihon kautta annetun testikemikaalin toksikokinetiikan tutkimisesta. Ihon kautta imeytymisen osalta on luettava tämän liitteen luku B.44 [Ihon kautta imeytyminen: *in vivo* -menetelmä (9)]. Muiden tutkittavien ominaisuuksien, kuten jakautumisen ja metabolian, osalta voidaan käyttää tätä testimenetelmää B.36. Ihon kautta käsittelyssä testikemikaalista tulee käyttää yhtä tai useampaa annostasoa. Testikemikaalin (testikemikaalia sisältävä laimentamaton tai laimennettu materiaali tai formulaatio, joka applikoidaan iholle) on oltava sama kuin se, jolle ihmiset tai muut kohdelajit voivat altistua, tai kyseisen kemikaalin realistinen korvike. Annostaso(t) on valittava tämän testimenetelmän 20–26 kohdan mukaisesti. Ihon kautta annettavan annoksen valinnassa voidaan ottaa huomioon seuraavat seikat: oletettu ihmisten altistuminen ja/tai annokset, joissa on havaittu myrkyllisyyttä muissa ihon kautta välittyvää myrkyllisyyttä koskevissa tutkimuksissa. Ihon kautta annettava annos (annettavat annokset) on tarvittaessa liuotettava sopivaan kantaja-aineeseen, ja annosteltavan määrän on oltava halutun annoksen kannalta riittävä. Juuri ennen kokeen alkua eläinten selästä poistetaan karvapeite leikkaamalla. Karvapeite voidaan myös ajella, mutta se tulee tehdä noin vuorokautta ennen testin alkua. Karvapeitettä poistettaessa on varottava vahingoittamasta ihoa, sillä se voi muuttaa ihon läpäisykykyä. Noin 10 prosenttia ruumiin pinnasta on oltava ajeltuna, jotta siihen voidaan annostella testikemikaalia.

Erittäin myrkyllisten kemikaalien yhteydessä tämä alue voi olla pienempi kuin 10 prosenttia, mutta mahdollisimman suuri osa alueesta on peitettävä ohuella ja yhtenäisellä kerroksella testikemikaalia. Samaa käsittelyaluetta on käytettävä kaikissa testiryhmissä, joissa tutkitaan ihon kautta altistusta. Käsitellyt alueet on suojattava sopivalla paikalleen kiinnitettävällä suojuksella. Eläimet on pidettävä omissa häkeissään.

75. Ihonpesututkimus on tehtävä, jotta voidaan arvioida, mikä määrä testikemikaalin annetusta annoksesta voi poistua iholta, kun käsitelty ihoalue pestään miedolla saippualla ja vedellä. Tästä tutkimuksesta voi myös olla apua määritettäessä massatasetta, kun testikemikaali annostellaan ihon kautta. Tässä ihonpesututkimuksessa on annettava kerta-annos testikemikaalia kahdelle eläimelle. Annostaso valitaan tämän testimenetelmän 23 kohdan mukaisesti (katso lisätietoja ihokontaktiajasta myös 76 kohdasta). Pesuvesistä talteenotetut testikemikaalimäärät on määritettävä, jotta voidaan arvioida sitä, miten tehokkaasti pesutoimenpide poistaa testikemikaalia.

76. Ellei syövyttävyys estä sitä, testikemikaalia on pidettävä iholla vähintään kuusi tuntia. Kun suojus poistetaan, käsitelty alue on pestävä ihonpesututkimuksessa kuvatun menettelyn mukaisesti (katso 75 kohta). Sekä suojuksesta että pesuvesistä on analysoitava testikemikaalin jäämät. Tutkimuksen päättyessä jokainen eläin on lopetettava humaanisti viitteen (2) mukaisesti, ja käsitelty ihoalue on irrotettava. Käsitellystä ihosta on analysoitava tarkoituksenmukainen osa testikemikaalijäämien (radioaktiivisuuden) määrittämiseksi.

77. Lääkkeiden toksikokineettisessä arvioinnissa saatetaan tarvita muita toimenpiteitä asianmukaisen sääntelyjärjestelmän mukaisesti.

Inhalaatio

78. Testikemikaalista on käytettävä yhtä pitoisuutta (tai useampaa, mikäli tarpeen). Pitoisuus (pitoisuudet) on valittava tämän testimenetelmän 20–26 kohdan mukaisesti. Inhalaatiokäsittelyt on tehtävä käyttäen nenäkartiota tai vain pää -laitetta muita altistumisreittejä pitkin tapahtuvan imeytymisen estämiseksi (8). Jos käytetään muita inhalaatioaltistusolosuhteita, niiden perustelut on dokumentoitava. Inhalaatioaltistuksen kesto on määriteltävä; yleensä altistus kestää 4–6 tuntia.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.

4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40,

5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.

6) Tämän liitteen luku B.45 (Ihon kautta imeytyminen: *in vitro* -menetelmä)

7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9) Tämän liitteen luku B.44 (Ihon kautta imeytyminen: *in vivo* -menetelmä)

10) Barton HA, *et al*. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.

11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

Lisäys

MÄÄRITELMÄT

ADME: Lyhennesana englanninkielisistä sanoista ”Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion” (imeytyminen, jakautuminen, metabolia ja erittyminen).

Ainetase: Katso ”Massatase”.

Antoreitti: (suun kautta, suonensisäisesti, ihon kautta, hengitysteiden kautta jne.): Tarkoittaa sitä tapaa, jolla kemikaalit annostellaan elimistöön (esimerkiksi suun kautta ruokintaletkulla, suun kautta ravinnon seassa, hengitysteiden kautta, suonensisäisesti jne.).

AUC: (Area under the plasma concentration-time curve eli plasman pitoisuus-aikakäyrän alle jäävä pinta-ala): Testikemikaalin pitoisuutta plasmassa ajan suhteen kuvaavan käyrän alapuolinen pinta-ala. Se edustaa elimistöön imeytyneen testikemikaalin kokonaismäärää ennalta määritetyn ajanjakson aikana. Lineaarisissa olosuhteissa AUC (ajasta nolla ääretömyyteen saakka) on verrannollinen elimistöön imeytyneen testikemikaalin kokonaismäärään imeytymisnopeudesta riippumatta.

Autoradiografia: (koko kehon autoradiografia): Käytetään radioaktiivisen testikemikaalin sijainnin määrittämiseen kudoksessa (laadullisesti ja/tai määrällisesti). Tässä tekniikassa käytetään röntgenkuvausfilmiä tai nykyään ennemminkin digitaalista kuvantamista fosforilevylle radioaktiivisesti leimattujen molekyylien tai niiden fragmenttien saamiseksi näkyviin tallentamalla tutkittavan kohteen lähettämää säteilyä. Elinten dissekointiin verrattuna määrällisestä koko kehon autoradiografiasta voi olla joitakin etuja arvioitaessa testikemikaalin jakautumista ja määritettäessä radioaktiivisen materiaalin kokonaissaantoa ja hajoamista kudoksissa. Eräs merkittävä etu on esimerkiksi se, että sitä voidaan käyttää värillisiä eläimiä koskevassa mallissa, jolloin voidaan arvioida testikemikaalin ja melaniinin välistä mahdollista suhdetta, sillä melaniini voi sitoa tiettyjä molekyylejä. Vaikka tämä tekniikka voi olla hyödyllinen koko kehoon kohdistuvissa arvioinneissa sellaisten sitoutumispaikkojen osalta, joiden kapasiteetti on suuri mutta affiniteetti pieni, se voi olla rajallinen tunnistettaessa tiettyjä kohdepaikkoja, esimerkiksi reseptoreihin sitoutumisen paikkoja, jolloin havaitseminen edellyttää suhteellisen suurta resoluutiota ja herkkyyttä. Autoradiografiaa käytettäessä kokeet, joiden tavoitteena on määrittää annostellun yhdisteen massatase, on tehtävä kudoksiin jakautumiskokeesta erillisessä ryhmässä tai erillisenä tutkimuksena, jossa kaikki eritteet (joihin voi sisältyä myös uloshengitysilma) ja kokonaiset ruumiit homogenisoidaan ja analysoidaan nestetuikelaskennalla.

Biokertyvyys: Katso ”Kertyvyys”.

Biologinen hyötyosuus: Annetun annoksen se fraktio, joka pääsee systeemiseen verenkiertoon tai fysiologiseen vaikutuspaikkaan. Testikemikaalin biologisella hyötyosuudella tarkoitetaan yleensä perusyhdistettä, mutta sillä voidaan tarkoittaa myös sen metaboliitteja. Se koskee ainoastaan yhtä kemiallista muotoa. *Huomio:* biologinen hyötyosuus ja imeytyminen eivät ole sama asia. Esimerkiksi suun kautta imeytymisen (jolloin ainetta on suolen seinämässä ja porttiverenkierrossa) ja biologisen hyötyosuuden (jolloin ainetta on systeemisessä verenkierrossa ja kudoksissa) välinen ero voi syntyä esimerkiksi kemiallisesta hajoamisesta, joka johtuu aineen metabolisoitumisesta suolen seinämässä, ulosvirtauskuljetuksesta takaisin suoliston onteloon tai presysteemisestä metaboliasta maksassa (10). Myrkyllisen komponentin (perusyhdisteen tai metaboliitin) biologinen hyötyosuus on kriittinen parametri ihmisiin kohdistuvan riskin arvioinnissa (ekstrapolointi suuresta pieneen annokseen tai reitistä toiseen), jotta ulkoisista NOAEL- tai BMD-arvoista (sovellettu annos) voidaan johtaa sisäinen arvo. Suun kautta annostelun yhteydessä aiheutuvien maksavaikutusten osalta riittää suun kautta imeytyminen. Kaikkien muiden vaikutusten, jotka ilmenevät muualla kuin aineen antokohdassa, biologinen hyötyosuus on kuitenkin imeytymistä luotettavampi parametri käytettäväksi riskinarvioinnissa.

Biopysyvyys: Katso ”Pysyvyys”.

Biotransformaatio: Tutkittavan testikemikaalin (yleensä entsymaattinen) kemiallinen muuntuminen eri kemikaaliksi elimistössä. ”Metabolian” synonyymi.

C_{max}: Joko enimmäis- tai huippupitoisuus veressä (plasmassa/seerumissa) annostelun jälkeen tai enimmäis- tai huippuerittyminen (virtsaan tai ulosteeseen) annostelun jälkeen.

Detoksifikaatioreitit: Vaihesarja, joka johtaa myrkyllisten kemikaalien eliminoitumiseen kehosta joko metabolisen muuntumisen tai erittymisen kautta.

Eksogeeninen: Organismin tai järjestelmän ulkopuolella aiheutettu tai tuotettu (asia).

Ekstrapolointi: Yhden tai useamman arvon päättely sen perusteella, mitä tiedetään tai mitä on havaittu.

Entsymaattiset parametrit: K_m: Michaelisin vakio ja V_{max}: enimmäisnopeus.

Entsyymit/isotsyymit: Kemiallisia reaktioita katalysoivia (nopeuttavia) proteiineja. Isotsyymit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat samanlaisia kemiallisia reaktioita mutta joiden aminohapposekvenssi on erilainen.

Erittyminen: Prosessi(t), jonka (joiden) kautta annosteltu testikemikaali ja/tai sen metaboliitit poistuvat kehosta.

Herkkyys: Menetelmän tai välineen kyky erotella mittausvasteita siten, että ne edustavat kyseisen muuttujan eri tasoja.

Huippupitoisuus veressä (plasmassa/seerumissa): Veren (plasman/seerumin) enimmäis- tai huippupitoisuus annostelun jälkeen (katso myös "C_{max}").

Imeytyminen: Kemikaalien siirtyminen kudoksiin tai niiden läpi. Imeytymisellä tarkoitetaan perusyhdistettä ja kaikkia sen metaboliitteja. Sitä ei tule sekoittaa biologinen hyötyosuus -käsitteeseen.

Induktio/entsyymi-induktio: Ympäristön ärsykkeen tai induktorimolekyylin aiheuttama entsyymisynteesi.

Interpolointi: Kohdekemikaaliin liittyvän ominaisuuden ennustamisessa käytetään tietoja yhden tai useamman kemikaalin ominaisuuksista.

Jakaantumiskerroin: Tunnetaan myös nimellä jakautumiskerroin; se on kahdessa liuottimessa olevan kemikaalin erilaisen liukoisuuden mittari.

Jakautuminen: Testikemikaalin ja sen johdannaisten leviäminen koko organismiin.

Järjestelmien mallintaminen (fysiologiaan perustuva toksikokinetiikka, farmakokinetiikkaan, fysiologiaan perustuva farmakokinetiikka, biologiaan perustuva jne.): Abstrakti malli, jossa käytetään matemaattista kieltä kuvaamaan järjestelmän käyttäytymistä.

Kertyvyys (biokertyvyys): Testikemikaalin määrän lisääntyminen kudoksissa ajan myötä (yleensä rasvakudoksissa toistuvan altistuksen jälkeen). Jos testikemikaalia syötetään elimistöön enemmän kuin sitä eliminoituu, organismiin kertyy testikemikaalia, jolloin saatetaan saavuttaa myrkyllisiä testikemikaalipitoisuuksia.

Kohdekudos: Kudos, jossa myrkyllisen aineen pääasiallinen haittavaikutus ilmenee.

Kudoksiin jakautuminen: Testikemikaalin palautuva liike elimistön yhdestä paikasta toiseen. Kudoksiin jakautumista voidaan tutkia elinten dissektion, homogenisoinnin, polttamisen tai nestetuikelaskennan avulla tai koko kehon laadullisella ja/tai määrällisellä autoradiografialla. Edellinen on hyödyllinen määritettäessä pitoisuutta ja saantoa kudoksista sekä jäljellä olevasta ruumiista samoilla eläimillä, mutta sen tarkkuus voi olla riittämätön kaikkien kudosten osalta ja sen kokonaissaanto voi olla tarkoituksenmukaista pienempi (< 90 prosenttia). Katso jälkimmäisen määritelmä edeltä.

Lineaarisuus / lineaarinen kinetiikka: Kinetiikan kannalta prosessi on lineaarinen silloin, kun kaikki eri osien väliset siirtymisnopeudet ovat verrannollisia määriin tai pitoisuuksiin nähden (eli ensimmäisen kertaluvun reaktio). Tällöin puhdistuma- ja jakautumistilavuudet ovat vakioita, kuten myös puoliintumisajat. Saavutetut pitoisuudet ovat verrannollisia annostelumäärään (altistukseen), ja kertymisen ennustaminen on helpompaa. Lineaarisuutta/ei-lineaarisuutta voidaan arvioida vertailemalla oleellisia parametreja (kuten AUC-arvoa) eri annosten tai kerrallisen ja toistuvan altistuksen jälkeen. Annosriippuvuuden puute saattaa viitata siihen, että yhdisteen metaboliaan osallistuvat entsyymit ovat saturoituneet. AUC-arvon suureneminen toistuvan altistuksen jälkeen (verrattuna kerta-altistukseen) saattaa viitata metabolian estymiseen, ja AUC-arvon pieneneminen saattaa puolestaan viitata metabolian indusoitumiseen [katso myös (11)].

Mallien validointi: Prosessi, jossa arvioidaan, kuvaako jokin malli käytettävissä olevia toksikokineettisiä tietoja yhdenmukaisesti. Malleja voidaan arvioida vertailemalla mallin avulla saatuja ennusteita ja kokeellisia arvoja yhteiseen riippumattomaan muuttujaan (esimerkiksi aikaan). Arvioinnin laajuus on perusteltava suhteessa mallin käyttötarkoitukseen.

Massatase: Järjestelmään tulevan ja siitä poistuvan testikemikaalin määrä.

Metabolia: "Biotransformaation" synonyymi.

Metaboliitit: Metabolian tai metabolisten prosessien tuotteet.

Myrkyllisyyden mekanismi / myrkyllisyyden vaikutustapa: Vaikutusmekanismi tarkoittaa tiettyjä biokemiallisia interaktioita, joiden kautta testikemikaalin vaikutus syntyy. Vaikutustapa tarkoittaa yleisempiä reittejä, joiden kautta testikemikaalin myrkyllisyys aiheutuu.

Osa: Kehon, kudoksen tai solun rakenteellinen tai biokemiallinen osio (tai yksikkö), joka on muista osista erillinen.

Puhdistumanopeus: Määrällinen mittari, jolla mitataan sitä nopeutta, jolla testikemikaali poistuu verestä, plasmasta tai tietystä kudoksesta aikayksikköä kohti.

Puoliintumisaika ($t_{1/2}$): Aika, jossa testikemikaalin pitoisuus pienenee puoleen tietyssä osassa. Yleensä sillä tarkoitetaan plasmapitoisuutta tai testikemikaalin määrää koko kehossa.

Pysyvyys (biopysyvyys): Kemikaalin pitkäaikainen läsnäolo (biologisessa järjestelmässä) sen vuoksi, että se hajoaa/eliminoituu hitaasti.

Reseptorien mikroskooppinen autoradiografia (tai reseptorien mikroautoradiografia): Tätä tekniikkaa voidaan käyttää tutkittaessa tiettyjen kudospaikkojen tai solupopulaatioiden välistä ksenobioottista vuorovaikutusta, esimerkiksi reseptoreihin sitoutumista tai tiettyä vaikutustapaa koskevissa tutkimuksissa, joissa voidaan tarvita suurta resoluutiota ja suurta tarkkuutta, mikä taas ei ole mahdollista koko kehon autoradiografiassa.

Sappieritys: Erittyminen sappiteiden kautta.

Saturaatio: Tila, jolloin yksi tai useammin kineettinen prosessi (esimerkiksi imeytyminen, metabolia tai puhdistuma) on suurimmillaan (eli saturoitunut).

Suun kautta imeytyminen: Prosenttiosuus antopaikasta (esimerkiksi maha-suolikanavasta) imeytyneestä testikemikaaliannoksesta. Tätä kriittistä parametria voidaan käyttää, jotta saadaan selville, mikä fraktio annostellusta testikemikaalista pääsee porttilaskimoon ja sen jälkeen maksaan.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu kemikaali tai seos.

T_{max}: C_{max}-arvon saavuttamiseen tarvittava aika.

Toksikokinetiikka (farmakokinetiikka): Kemikaalien imeytymistä, jakautumista, metaboliaa ja erittymistä aikaan nähden käsittelevä tutkimus.

Vakaan tilan pitoisuus veressä (plasmassa): Avoimen järjestelmän tasapainotila, jossa kaikki järjestelmään vaikuttavat tekijät ja vastakkaiset tekijät ovat tasapainossa siten, että sen kaikkien komponenttien pitoisuus on vakaa, vaikka aine virtaa järjestelmän läpi."

8) Lisätään luku B.52:

"B.52 AKUUTTI MYRKYLLISYYS HENGITETTYNÄ – AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 436 (2009). Ensimmäinen akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskeva testiohje nro 403 hyväksyttiin vuonna 1981, ja sitä on sen jälkeen tarkistettu (katso tämän liitteen luku B.2 (1)). Myrkyllinen hengitettynä -altistusta koskevan akuutin toksisuusluokan (ATC) menetelmän kehittäminen (2) (3) (4) katsottiin tarpeelliseksi sen jälkeen, kun tarkistettu akuutin toksisuusluokan menetelmä oli hyväksytty myrkyllinen suun kautta -altistusta varten (tämän liitteen luku B.1 b) (5). Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevan akuutin toksisuusluokan testimenetelmän takautuva arviointi osoitti, että menetelmä sopii käytettäväksi luokitukseen ja merkintöihin liittyviin tarkoituksiin (6). Myrkyllisyyttä hengitettynä koskevan akuutin toksisuusluokan testimenetelmän avulla kiinteitä kohdepitoisuuksia voidaan käyttää vaiheittain testikemikaalin myrkyllisyyden luokittelemiseksi. Keskeinen tutkittava ominaisuus on kuolleisuus, mutta vakavasta kivusta tai tuskasta kärsivät tai kuolemaisillaan olevat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla kärsimyksen minimoimiseksi. Ohjeita eläinkokeiden humaaneista lopettamiskriteereistä on OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (7).

2. Tämän testimenetelmän mukaisten tutkimusten toteuttamista ja tulosten tulkintaa koskevat ohjeet ovat OECD:n ohjeasiakirjassa GD 39, jossa käsitellään akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä koskevaa testausta (8).

3. Tämän testimenetelmän yhteydessä käytetyt määritelmät ovat lisäyksessä 1 ja ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

4. Testimenetelmä antaa tietoa vaarallisista ominaisuuksista, ja sen avulla testikemikaali voidaan määrittää ja luokitella akuuttia myrkyllisyyttä aiheuttavien kemikaalien luokittelua koskevan asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaisesti (9). Jos tarvitaan LC_{50}-arvojen piste-estimaatteja tai pitoisuus-vasteanalyyseja, on käytettävä tämän liitteen luvun B.2 (1) mukaista testimenetelmää. Lisätietoja testimenetelmän valinnasta on ohjeasiakirjassa GD 39 (8). Tätä testimenetelmää ei ole varsinaisesti tarkoitettu erikoismateriaalien, kuten huonosti liukenevien isometristen tai kuituisten materiaalien tai teollisesti valmistettujen nanomateriaalien testaukseen.

ALUSTAVAT HUOMIOT

5. Ennen tämän testimenetelmän mukaista testausta testauslaboratorion on hankittava kaikki saatavilla olevat tiedot testattavasta kemikaalista, mukaan luettuina olemassa olevat tutkimukset, joissa olevien tietojen ansiosta lisätestit voidaan jättää mahdollisesti tekemättä, jotta eläinten käyttö voidaan minimoida. Tietoihin, joista voi olla apua sopivimman lajin, kannan, sukupuolen, altistustavan ja asianmukaisten testipitoisuuksien valinnassa, sisältyvät testattavan kemikaalin identiteetti, kemiallinen rakenne ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, *in vitro*- tai *in vivo* -toksisuustestien tulokset, odotettavissa oleva käyttö (olevat käytöt) ja ihmisten altistumisen mahdollisuus sekä saatavilla olevat (Q)SAR-tiedot ja toksikologiset tiedot rakenteellisesti samankaltaisista aineista. Tällä testimenetelmällä ei tule testata pitoisuuksia, joiden odotetaan aiheuttavan vakavaa kipua ja kärsimystä syövyttävien [1] tai vaikeasti ärsyttävien vaikutusten vuoksi [katso ohjeasiakirja GD 39 (8)].

TESTIN PERIAATE

6. Testin periaatteena on, että testikemikaalin akuutista myrkyllisyydestä hengitettynä kerätään riittävästi tietoa vaiheittaisen menettelyn avulla neljän tunnin pituisen altistusjakson aikana, jotta kemikaali voidaan luokitella. Myös muunpituisia altistuksia voidaan soveltaa tiettyihin sääntelytarkoituksiin. Jokaisessa määritetyn pitoisuuden vaiheessa testataan kolme eläintä kumpaakin sukupuolta. Sen mukaan, montako eläintä on kuollut ja/tai kuolemaisillaan, kaksi vaihetta voi riittää testikemikaalin akuutin myrkyllisyyden arvioimiseksi. Jos on näyttöä siitä, että toinen sukupuoli on toista herkempi, testiä voidaan jatkaa vain herkemmällä sukupuolella. Aiemman vaiheen tuloksen perusteella määritellään seuraava vaihe, joka on jokin seuraavista:

a) Lisätestausta ei tarvita.

b) On testattava kolme eläintä kumpaakin sukupuolta.

c) On testattava vain kuusi eläintä herkemmästä sukupuolesta, eli toksisuusluokan alarajan estimaattien on perustuttava kuuteen eläimeen testipitoisuusryhmää kohti sukupuolesta riippumatta.

7. Kuolemaisillaan olevat, selvästi kärsivät tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavat eläimet on lopetettava humaanilla tavalla, ja koetulosten tulkinnassa ne on otettava huomioon samalla tavalla kuin kokeessa kuolleet eläimet. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa GD 19 (7) on esitetty kriteerit, joiden perusteella tehdään päätös kuolemaisillaan olevan tai voimakkaasti kärsivän eläimen lopettamisesta. Lisäksi siinä on annettu ohjeita ennustettavan tai uhkaavan kuoleman tunnistamiseksi.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

8. On käytettävä terveitä, nuoria ja täysikasvuisia yleisesti käytettyjä koe-eläinkantoja. Suositeltavin laji on rotta, ja jos käytetään muita lajeja, sille on esitettävä perustelut.

Eläinten valmistelu

9. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Altistuspäivänä on käytettävä 8–12 viikon ikäisiä nuoria aikuisia eläimiä, joiden ruumiinpainon on oltava ± 20 prosenttia aiemmin altistettujen samanikäisten eläinten keskimääräisestä painosta kummankin sukupuolen osalta. Eläimet valitaan satunnaistetusti ja merkitään niin, että yksilöt voidaan erottaa toisistaan. Eläimet pidetään häkeissä vähintään viiden päivän ajan ennen testin aloittamista, jotta ne tottuvat laboratorio-olosuhteisiin. Eläimet on totutettava myös testilaitteistoon vähän ennen testausta, sillä se vähentää uuteen ympäristöön tutustumisesta aiheutuvaa stressiä.

Eläinten hoito

10. Koe-eläintilan lämpötilan on oltava 22 ± 3 °C. Suhteellinen ilmankosteus on pidettävä mielellään 30–70 prosentin välillä, mikä ei välttämättä ole mahdollista, jos kantaja-aineena käytetään vettä. Ennen altistuksia ja niiden jälkeen eläimet on eroteltava häkkeihin sukupuolen ja pitoisuuden mukaisiin ryhmiin, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä kunkin eläimen selkeää havainnointia, ja määrä on pidettävä sellaisena, että kannibalismista ja tappelusta johtuvat hävikit voidaan minimoida. Jos eläimet altistetaan vain nasaalisesti, ne voi olla tarpeen totuttaa immobilisointiputkiin. Immobilisointiputket eivät saa aiheuttaa eläimille tarpeetonta fyysistä, lämpöön tai liikkumattomuuteen liittyvää stressiä. Immobilisointi voi vaikuttaa fysiologisiin tutkittaviin ominaisuuksiin, kuten ruumiinlämpöön (hypertermia) ja/tai hengityksen minuuttitilavuuteen. Jos saatavilla on rinnakkaistietoja, jotka osoittavat, ettei tällaisia muutoksia juuri ilmene, immobilisointiputkiin totuttaminen ei ole tarpeen. Eläimet, jotka altistetaan aerosolille kokonaan, on laitettava kokeen ajaksi häkkiin yksittäin, jotta

[1] Syövyttävyyden arviointi voi perustua asiantuntijan lausuntoon, ja näyttönä voidaan käyttää esimerkiksi ihmisistä ja eläimistä saatuja tietoja, olemassa olevia (*in vitro* -) tietoja, kuten tämän liitteen lukua B.40 (10) ja B.40a tai OECD:n testiohjetta nro 435 (12), pH-arvoja, tietoja samanlaisista kemikaaleista tai muita asiaankuuluvia tietoja.

testattava aerosoli ei suodatu muiden häkissä olevien eläinten karvapeitteen kautta. Tavallista ja sertifioitua laboratorioruokavaliota voidaan käyttää muulloin paitsi altistuksen aikana, eikä tavallisen juomaveden määrää tule rajoittaa. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa / 12 tuntia pimeää).

Inhalaatiokammiot

11. Testikemikaalin luonne ja testin tavoite on otettava huomioon inhalaatiokammiota valittaessa. Ensisijainen altistumistapa on vain nasaalisesti (tähän termiin kuuluvat myös altistustavat vain pään kautta, vain nasaalisesti tai vain nokan kautta). Vain nasaalista altistusta suositellaan yleensä tutkittaessa nestemäisiä tai kiinteitä aerosoleja sekä sellaisia höyryjä, jotka saattavat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Tutkimuksen tietyt tavoitteet voidaan saavuttaa paremmin käyttämällä koko kehoon kohdistuvaa altistusta, mutta se on perusteltava tutkimusraportissa. Jotta kammion ilma voidaan pitää vakaana koko kehon kammiossa, koe-eläinten viemä tila saa olla korkeintaan viisi prosenttia kammion tilavuudesta. Vain nasaalisesti ja koko kehon kautta tapahtuvan altistuksen tekniikoiden periaatteet sekä niiden erityiset hyödyt ja haitat on kuvattu ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

ALTISTUSOLOSUHTEET

Pitoisuuksien annostelu

12. Altistuksen kestoksi suositellaan kiinteää aikaa, joka on neljä tuntia, pois luettuna tasapainotilan saavuttamiseen kuluva aika. Muunpituiset altistukset voivat olla tarpeen tiettyjen vaatimusten täyttämiseksi, mutta tämä on perusteltava tutkimusraportissa [katso ohjeasiakirja GD 39 (8)]. Eläimille, joita altistetaan aerosoleille koko kehon kammioissa, on järjestettävä oma häkki sen estämiseksi, etteivät muut häkissä olevat eläimet niele testikemikaalia, kun ne hoitavat toistensa turkkia. Eläimiä ei saa ruokkia altistusjakson aikana. Vettä saa antaa koko kehoon kohdistuvan altistuksen ajan.

13. Eläimet altistetaan testikemikaalille, kun se on kaasuna, höyrynä, aerosolina tai niiden sekoituksena. Testattava fyysinen olomuoto määräytyy testikemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, valitun pitoisuuden ja/tai testikemikaalin käsittelyssä ja käytössä todennäköisen fyysisen muodon perusteella. Hygroskooppiset ja kemiallisesti reaktiiviset testikemikaalit on testattava kuivaa ilmaa käyttäen. Räjähtävien pitoisuuksien tuottamista on vältettävä huolellisesti.

Hiukkaskokojakauma

14. Hiukkasten koko on mitattava kaikista aerosoleista ja sellaisista höyryistä, jotka voivat tiivistyä ja muodostaa siten aerosoleja. Jotta kaikki hengityselimistön oleelliset osat altistuvat aineelle, on suositeltavaa käyttää aerosoleja, joiden massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) on 1–4 µm ja joiden geometrinen keskihajonta (σ_g) sijoittuu välille 1,5–3,0 (8) (13) (14). Tämä vaatimus on pyrittävä täyttämään kaikin keinoin, mutta jos se ei onnistu, on esitettävä asiantuntijan lausunto. Esimerkiksi metallihuurut voivat olla tätä vaatimusta pienempiä, kun taas varautuneet hiukkaset, kuidut ja hygroskooppiset materiaalit (joiden koko kasvaa hengitystie-elimistön kosteassa ympäristössä) voivat olla vaatimusta suurempia.

Testikemikaalin valmistelu kantaja-aineessa

15. Jotta ilmakehään saadaan testikemikaalista sopiva pitoisuus ja hiukkaskoko, voidaan käyttää kantaja-ainetta. Pääsääntöisesti on käytettävä vettä. Hiukkasmateriaaleja voidaan joutua käsittelemään mekaanisesti vaaditun hiukkaskokojakauman saavuttamiseksi, mutta se on tehtävä varovasti, jotta testikemikaali ei hajoa tai muutu. Jos mekaanisen prosessin oletetaan muuttaneen testikemikaalin koostumusta (esimerkiksi kitkan vuoksi liiallisen jauhamisen aiheuttamat hyvin korkeat lämpötilat), testikemikaalin koostumus on varmennettava analyyttisesti. Riittäviä varotoimia on noudatettava, jotta testikemikaali ei kontaminoidu. Murenemattomia raemateriaaleja, jotka on tarkoituksella valmistettu sellaisiksi, ettei niitä voi hengittää, ei tarvitse testata. Hankauskoe on tehtävä sen osoittamiseksi, ettei raemaisen materiaalin käsittelyssä synny hengitettäviä hiukkasia. Jos hankauskoe tuottaa hengitettäviä hiukkasia, on tehtävä sisäänhengityksen kautta aiheutuvaa myrkyllisyyttä koskeva testi.

Verrokkieläimet

16. Samanaikaista negatiivista (ilma-) verrokkiryhmää ei tarvita. Jos testi-ilmakehän tuottamisessa käytetään apuna muuta kantaja-ainetta kuin vettä, kantaja-aineverrokkiryhmää on käytettävä ainoastaan silloin, kun saatavilla ei ole aiempia tietoja sisäänhengityksen kautta aiheutuvasta myrkyllisyydestä. Jos kantaja-aineessa valmistellun testikemikaalin myrkyllisyystutkimus osoittaa, ettei kemikaali ole myrkyllinen, se tarkoittaa, että kantaja-aine on myrkytön testattuna pitoisuutena, joten kantaja-aineverrokkia ei tarvita.

ALTISTUSOLOSUHTEIDEN SEURANTA

Kammion ilmavirtaus

17. Ilman virtausta kammion läpi on valvottava tarkasti ja seurattava jatkuvasti, ja sitä koskevat tiedot on kirjattava vähintään kerran tunnissa jokaisen altistuksen aikana. Testi-ilmakehän pitoisuuden (tai stabiiliuden) seuranta kuuluu olennaisena osana kaikkien dynaamisten parametrien mittaamiseen, ja se on myös epäsuora keino valvoa

kaikkia oleellisia dynaamisia parametreja, joita tarvitaan ilmakehän tuottamiseen. Erityistä huomiota on kiinnitettävä siihen, että uudelleenhengittäminen vältetään vain nasaalisen altistuksen kammioissa niissä tapauksissa, kun altistusjärjestelmän läpi kulkeva ilmavirtaus ei riitä tuottamaan dynaamista testikemikaali-ilmakehän virtaa. On tiettyjä menetelmiä, joita voidaan käyttää osoittamaan, ettei valituissa toimintaolosuhteissa tapahdu uudelleenhengittämistä (8) (15). Happipitoisuuden on oltava vähintään 19 prosenttia, eikä hiilidioksidipitoisuus saa ylittää yhtä prosenttia. Jos on aihetta olettaa, ettei näitä vaatimuksia voida täyttää, happi- ja hiilidioksidipitoisuudet on mitattava.

Kammion lämpötila ja suhteellinen kosteus

18. Kammion lämpötila on pidettävä välillä 22 ± 3 °C. Eläinten hengitysilman suhteellista kosteutta on seurattava sekä nasaalisissa että koko kehoon kohdistuvissa altistuksissa, ja se on kirjattava vähintään kolmesti enintään neljä tuntia kestävien altistusten osalta ja tunneittain lyhyempien altistusten osalta. Suhteellisen kosteuden tulisi olla välillä 30–70 prosenttia, mutta tämä ei ole välttämättä mahdollista (esimerkiksi testattaessa vesipohjaisia seoksia) tai mitattavissa, koska testikemikaali häiritsee testimenetelmää.

Testikemikaali: nimellispitoisuus

19. Aina kun mahdollista, altistuskammion nimellispitoisuus on laskettava ja kirjattava. Nimellispitoisuus on tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammiojärjestelmän läpi virtaavan ilman kokonaistilavuudella. Nimellispitoisuudella ei luonnehdita eläinten altistumista, vaan nimellispitoisuuden ja varsinaisen pitoisuuden vertailusta saadaan tietoa testijärjestelmän generointitehokkuudesta, ja sitä voidaan siis käyttää generointiongelmien havaitsemiseen.

Testikemikaali: varsinainen pitoisuus

20. Todellinen pitoisuus on testikemikaalin pitoisuus eläinten hengitysilmassa inhalaatiokammiossa. Todelliset pitoisuudet saadaan tietyillä menetelmillä (esimerkiksi suoralla näytteenotolla, adsorptiivisilla tai kemiallisesti reaktiivisilla menetelmillä ja tulosten analyyttisella luonnehtimisella) tai muilla menetelmillä, kuten suodatukseen perustuvalla gravimetrisella analyysilla. Gravimetrisen analyysin käyttö on hyväksyttävää vain yksikomponenttisten jauhemaisten aerosolien tai heikosti haihtuvista nesteistä koostuvien aerosolien yhteydessä, ja sitä on tuettava asianmukaisella esitutkimuksella, jossa käsitellään testikemikaalia koskevia luonnehdintoja. Monikomponenttisten jauhemaisten aerosolien pitoisuus voidaan myös määrittää gravimetrisen analyysin avulla. Siihen tarvitaan kuitenkin analyysitietoja, jotka osoittavat, että ilmassa leijuvan materiaalin koostumus on sama kuin lähtömateriaalin. Jos näitä tietoja ei ole saatavilla, testikemikaali voi olla tarpeen analysoida uudelleen (mieluiten ilmassa leijuvassa muodossaan) säännöllisin väliajoin tutkimuksen aikana. Sellaisten aerosolisoituvien aineiden osalta, jotka voivat höyrystyä tai sublimoitua, on osoitettava, että valitulla menetelmällä kerättiin kaikki faasit. Tutkimusraportissa on ilmoitettava tavoitepitoisuus, nimellinen pitoisuus ja todellinen pitoisuus, mutta tilastollisissa analyyseissa käytetään vain todellisia pitoisuuksia tappavien pitoisuuksien arvoja laskettaessa.

21. Jos mahdollista, on käytettävä yksi erä testikemikaalia, ja testinäyte on säilytettävä sen puhtauden, homogeenisuuden ja stabiiliuden säilyttävissä olosuhteissa. Ennen tutkimuksen aloittamista testikemikaalista on laadittava luonnehdinta, johon on sisällyttävä sen puhtaus ja – mikäli teknisesti mahdollista – identiteetti sekä tunnistettujen kontaminanttien ja epäpuhtauksien määrät. Tämä voidaan osoittaa esimerkiksi seuraavien tietojen avulla: retentioaika ja piikin suhteellinen pinta-ala sekä molekyylipaino, joka on saatu massaspektroskopialla tai kaasukromatografia-analyyseista, tai muut estimaatit. Vaikka testinäytteen identiteetti ei kuulu testauslaboratorion vastuulle, sen voi olla järkevää vahvistaa rahoittajan laatima luonnehdinta ainakin tietyssä määrin (esimerkiksi väri, fysikaalinen olomuoto jne.).

22. Altistusilmakehä on pidettävä mahdollisimman muuttumattomana, ja sitä on tarkkailtava jatkuvasti ja/tai ajoittain analyysimenetelmän mukaisesti. Jos näytteitä otetaan ajoittain, kammion ilmakehästä on otettava näytteitä vähintään kahdesti neljän tunnin tutkimuksen aikana. Jos se ei ole mahdollista vähäisen ilmanvirtauksen tai pienten pitoisuuksien vuoksi, koko altistusjakson ajalta voidaan ottaa yksi näyte. Jos näytteiden välillä ilmenee suurta vaihtelua, seuraavia pitoisuuksia testattaessa on otettava neljä näytettä kutakin altistusta kohti. Yksittäiset kammion pitoisuusnäytteet eivät saa poiketa keskimääräisestä pitoisuudesta enempää kuin enintään ± 10 prosenttia kaasujen ja höyryjen osalta tai enintään ± 20 prosenttia nestemäisten tai kiinteiden aerosolien osalta. Kammion tasapainotukseen kulunut aika (t_{95}) on laskettava ja kirjattava. Altistuksen kesto käsittää ajan, jolloin testikemikaali muodostetaan, mikä otetaan huomioon t_{95}-ajan saavuttamiseen tarvittavissa ajoissa. Ohjeita t_{95}-ajan arvioimiseksi on ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

23. Hyvin monimutkaisten, kaasuista/höyryistä koostuvien seosten ja aerosolien (esimerkiksi polttokammiot ja tietyn tarkoituksen mukaisten lopputuotteiden/-laitteiden perusteella kehitetyt testikemikaalit) osalta kukin faasi voi käyttäytyä inhalaatiokammiossa eri tavoin, joten jokaisesta faasista (kaasu/höyry ja aerosoli) on valittava vähintään yksi indikaattoriaine (analyytti), yleensä seoksen pääasiallinen vaikuttava aine. Kun testikemikaali on seos, on ilmoitettava seoksen analyyttinen pitoisuus, ei siis pelkästään vaikuttavan aineen tai komponentin (analyytin) pitoisuutta. Lisätietoja todellisista pitoisuuksista on ohjeasiakirjassa GD 39 (8).

Testikemikaali: hiukkaskokojakauma

24. Aerosolien hiukkaskokojakauma on määritettävä vähintään kahdesti jokaisen neljän tunnin mittaisen altistuksen aikana käyttämällä kaskadierotinta tai jotain toista laitetta, kuten aerodynaamista hiukkaskokoluokittelijaa. Jos kaskadierottimella tai muulla laitteella saatujen tulosten välinen vastaavuus voidaan osoittaa, kyseistä muuta laitetta voidaan käyttää koko tutkimuksen ajan. Ensisijaisen laitteen rinnalla on käytettävä toissijaista laitetta, esimerkiksi gravimetrista suodatinta tai törmäytintä/kuplituslaitetta ensisijaisen laitteen keräystehon vahvistamiseksi. Hiukkaskoon analyysista saadun massapitoisuuden on sijoituttava kohtuullisessa määrin suodatusanalyysilla saadun massapitoisuuden rajoihin [katso GD 39 (8)]. Jos vastaavuus voidaan osoittaa tutkimuksen varhaisessa vaiheessa, myöhemmät vahvistavat mittaukset voidaan jättää tekemättä. Eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä tietojen epävarmuus on pyrittävä minimoimaan, jotta altistusta ei tarvitse toistaa. Höyryjen osalta on määritettävä hiukkaskoko, jos on mahdollista, että höyryn tiivistyessä muodostuu aerosolia, tai jos höyrykammiossa, jossa faasien sekoittuminen on mahdollista, havaitaan hiukkasia (katso 14 kohta).

MENETTELY

Päätutkimus

25. Jokaisessa vaiheessa käytetään kolmea eläintä kumpaakin sukupuolta tai kuutta eläintä herkemmästä sukupuolesta. Jos muita jyrsijöitä kuin rottia altistetaan vain nasaalisesti, altistuksen enimmäiskestoaikoja voidaan muuttaa lajikohtaisen stressin minimoimiseksi. Aloitusannoksena käytettävä pitoisuus valitaan 1–4 kiinteästä pitoisuustasosta. Aloituspitoisuuden on oltava sellainen, että se todennäköisimmin aiheuttaa myrkyllisiä vaikutuksia joillekin eläimistä, joille testikemikaalia on annettu. Kaasujen, höyryjen ja aerosolien testausmalleissa testataan CLP-luokkien 1–4 raja-arvoilla, jotka ovat kaasujen osalta 100, 500, 2 500 ja 20 000 ppm/4h (lisäys 2), höyryjen osalta 0,5, 2, 10 ja 20 mg/l/4h (lisäys 3) ja aerosolien osalta 0,05, 0,5, ja 1,5 mg/l/4h (lisäys 4). Luokka 5, jota ei käytetä asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (9), koskee pitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin kyseiset rajapitoisuudet. Jokaisen aloituspitoisuuden osalta sovelletaan vastaavaa testausmallia. Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleiden eläinten lukumäärän mukaan testimenettelyssä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti, kunnes luokitus voidaan tehdä.

26. Altistusryhmien välinen aika määritellään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Eläinten altistusta seuraavalla pitoisuudella on lykättävä, kunnes on saatu riittävä varmuus jo testattujen eläinten eloonjäämisestä. Kunkin pitoisuustason välissä on suositeltavaa pitää kolmen tai neljän päivän mittainen tauko, jotta voidaan tarkkailla, ilmenevätkö myrkyllisyyden merkit viipeellä. Aikaväliä voidaan tarvittaessa mukauttaa esimerkiksi epävarmojen vasteiden yhteydessä.

Rajatesti

27. Rajatestiä käytetään silloin, kun testikemikaalin tiedetään tai oletetaan olevan periaatteessa myrkytön eli aiheuttavan toksisen vasteen vain lakisääteistä rajapitoisuutta suuremmilla pitoisuuksilla. Tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä voidaan hankkia samanlaisia testattuja kemikaaleja koskevista tiedoista, jolloin on otettava huomioon niiden komponenttien identiteetti ja prosenttiosuus, joilla tiedetään olevan toksikologista merkitystä. Tilanteissa, joissa tietoa testikemikaalin myrkyllisyydestä on vain vähän tai sitä ei ole lainkaan tai jos testikemikaalin oletetaan olevan myrkyllinen, on toteutettava päätutkimus [lisäohjeita on ohjeasiakirjassa GD 39 (8)].

28. Normaalissa menettelyssä kolme eläintä kumpaakin sukupuolta tai kuusi eläintä herkemmästä sukupuolesta altistetaan pitoisuuksille, jotka ovat kaasujen osalta 20 000 ppm, höyryjen osalta 20 mg/l ja pölyjen/sumutteiden osalta 5 mg/l (mikäli saavutettavissa), mikä katsotaan tässä testimenetelmässä rajatestiksi. Aerosolien testauksessa ensisijaisena tavoitteena tulee olla hengitettävän hiukkaskoon (MMAD 1–4 µm) saavuttaminen. Useimpien kemikaalien osalta tämä on mahdollista, kun niiden pitoisuus on 2 mg/l. Aerosolien testaamista suurempina pitoisuuksina kuin 2 mg/l on yritettävä vain, jos hengitettävä hiukkaskoko voidaan saavuttaa [katso GD 39 (8)]. GHS-järjestelmän (16) mukaan rajapitoisuuden ylittävien testien tekeminen ei ole suositeltavaa eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä GHS-järjestelmän luokan 5 (16), jota ei käytetä asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 (9), mukaista testausta tulee harkita vain, jos on erittäin todennäköistä, että tällaisen testin tulokset ovat suoraan merkityksellisiä ihmisten terveyden suojelemisessa, ja se on perusteltava tutkimusraportissa. Mahdollisesti räjähtäviä testikemikaaleja on käsiteltävä varovasti räjähdykselle suotuisien olosuhteiden välttämiseksi. Jotta vältetään eläinten tarpeeton käyttö, ennen rajatestiä on tehtävä testiajo ilman eläimiä sen varmistamiseksi, että rajatestin edellyttämät kammio-olosuhteet voidaan saavuttaa.

HAVAINNOT

29. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti ja säännöllisesti altistumisjakson aikana. Altistuksen jälkeen kliinisiä havaintoja on tehtävä vähintään kahdesti altistuspäivän aikana tai useammin, jos eläinten vaste käsittelyyn antaa siihen aihetta, ja vähintään kerran päivässä sen jälkeen yhteensä 14 päivän ajan. Havaintojakson pituus ei ole kiinteä, vaan se on määritettävä kliinisten merkkien luonteen ja alkamisajankohdan sekä toipumisajan pituuden perusteella. Ne ajankohdat, jolloin myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat ja häviävät, ovat tärkeitä varsinkin, jos myrkyllisyyden merkit ilmaantuvat viipeellä. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti jokaisesta eläimestä erikseen. Kuolevat eläimet, selvästi kärsivät eläimet ja/tai eläimet, jotka osoittavat selviä merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä, on lopetettava humaanisti eläinten hyvinvointiin liittyvien periaatteiden vuoksi. Kun tutkitaan myrkyllisyyden kliinisiä merkkejä, on kiinnitettävä huomiota siihen, ettei altistusmenettelystä johtuvaa

huonoa ulkonäköä ja ohimeneviä muutoksia hengityksessä pidetä erehdyksessä merkkeinä kemikaaliin liittyvästä myrkyllisyydestä. Eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa ohjeasiakirjassa esitetyt periaatteet ja perustelut on otettava huomioon (7). Humaaneista syistä lopetettujen tai kuolleena löydettyjen eläinten kuolinajankohta tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti.

30. Häkin vieressä tehtyihin havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen hermoston ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymisen muutokset. Mikäli mahdollista, paikallisten ja systeemisten vaikutusten väliset erot on merkittävä muistiin. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan. Lämmön mittaaminen peräsuolesta voi antaa tukevaa näyttöä refleksinomaisesta bradypneasta tai käsittelyyn tai ahtaaseen tilaan liittyvästä tai hypo-/hypertermiasta.

Eläinten painot

31. Kunkin eläimen paino on kirjattava kerran sopeutumisvaiheen aikana, altistuspäivänä ennen altistusta (päivä 0) ja vähintään päivinä 1, 3 ja 7 (ja myöhemmin viikoittain) sekä kuolinhetkellä tai lopettamisen yhteydessä, jos se tapahtuu päivän 1 jälkeen. Ruumiinpaino on tunnetusti erittäin tärkeä myrkyllisyyden indikaattori, joten eläimiä, joiden paino on jatkuvasti vähintään 20 prosenttia pienempi ennen tutkimusta mitattuihin arvoihin verrattuna, on seurattava tarkasti. Elossa olevat eläimet punnitaan ja lopetetaan humaanisti altistumisen jälkeisen jakson lopussa.

Patologia

32. Kaikki koe-eläimet, myös kokeen aikana kuolleet tai eläinten hyvinvointia koskevien periaatteiden vuoksi lopetetut ja tutkimuksesta poistetut, avataan. Jos avausta ei voida tehdä heti kuolleen eläimen löytämisen jälkeen, eläintä on säilytettävä riittävän kylmässä lämpötilassa (ei pakastimessa) autolyysin minimoimiseksi. Ruumiinavaukset on tehtävä mahdollisimman pian, yleensä yhden tai kahden päivän kuluessa. Kunkin eläimen kaikki makroskooppiset muutokset tulee kirjata, ja erityistä huomiota on kiinnitettävä hengitysteissä oleviin muutoksiin.

33. Myös tutkimussuunnitelmaan ennalta sisällytettyjen lisätutkimusten käyttöä voidaan harkita tutkimuksen tulkinnallisen arvon lisäämiseksi. Tällaisia tutkimuksia ovat esimerkiksi eloonjääneiden rottien keuhkojen painon punnitus ja/tai todisteiden hankkiminen ärsyttävyydestä hengitysteiden mikroskooppitutkimuksella. Tutkittaviin elimiin voi sisältyä myös vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten makroskooppisia muutoksia sisältävät elimet ja elimet, joissa tiedetään tai oletetaan olevan kemikaalin aiheuttamia vaikutuksia. Koko hengityselimistön mikroskooppitutkimus voi antaa hyödyllistä tietoa veden kanssa reagoivista testikemikaaleista, kuten hapoista ja hygroskooppisista testikemikaaleista.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

34. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot ruumiinpainoista ja ruumiinavaustuloksista on esitettävä. Kliiniset havaintotiedot tulee esittää yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin testiryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, myrkyllisyyden oireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleena löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinajankohta, myrkyllisten vaikutusten ja palautuvuuden kuvaus ja niiden ajallinen esiintyminen sekä ruumiinavauslöydökset.

Testiraportti

35. Testiraporttiin tulee mahdollisuuksien mukaan sisällyttää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet ja niiden hoito

— kuvaus häkkiolosuhteista, mukaan luettuina seuraavat tiedot: yhdessä häkissä olevien eläinten lukumäärä (tai lukumäärän muutos), alustamateriaali, lämpötila ja suhteellinen kosteus, valoisa aika ja tiedot ravinnosta

— käytetyt lajit/kanta ja perustelu muun lajin kuin rotan käyttämiselle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— satunnaistamismenetelmä

— tiedot ruoan ja veden laadusta (sekä ravinnon tyyppi/lähde, veden lähde)

— kuvaus testiä edeltäneestä tilanteesta ja tiedot ravinnosta, karanteenista ja sairauden hoidosta.

Testikemikaali

— fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (mukaan luettuna isomeria)

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään.

Kantaja-aine

— perustelut kantaja-aineen käyttämiselle ja sen valinnalle (jos se on muu kuin vesi)

— aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saadut tiedot, jotka osoittavat, ettei kantaja-aine vaikuta tutkimuksen tulokseen.

Inhalaatiokammio

— kuvaus inhalaatiokammiosta sekä sen mitat ja tilavuus

— kuvaus eläinten altistukseen ja ilmakehän tuottamiseen käytetystä laitteistosta ja sen alkuperä

— lämmön, kosteuden, hiukkaskoon ja todellisen pitoisuuden mittauslaitteet

— ilmanlähde, tulo- ja poistoilman käsittely sekä ilmanvaihtojärjestelmä

— menetelmät, joilla laitteisto on kalibroitu yhtenäisen testi-ilmakehän varmistamiseksi

— paine-ero (yli- vai alipaine)

— kunkin kammion altistusportit (vain nasaalinen altistus); eläinten sijainti järjestelmässä (koko kehoon kohdistuva altistus)

— testi-ilmakehän ajallinen yhtenäisyys/stabiilius

— lämpötila- ja kosteusantureiden sekä testi-ilmakehän näytteenottopaikan sijainti kammiossa

— ilman virtausnopeudet, ilman virtausnopeus kussakin altistusportissa (vain nasaalinen altistus) tai eläinkuorma/kammio (koko kehoon kohdistuva altistus)

— tiedot hapen ja hiilidioksidin mittauslaitteistosta, jos tarpeen

— inhalaatiokammion tasapainotilan saavuttamiseen kulunut aika (t_{95})

— tilavuusmuutosten määrä tunneittain

— annostelulaitteet (tarvittaessa).

Altistustiedot

— päätutkimuksen tavoitepitoisuuden valinnan peruste

— nimellispitoisuudet (altistuskammioon tuotetun testikemikaalin massa jaettuna kammion läpi virtaavan ilman tilavuudella)

— eläinten hengitysilmasta kerätyt testikemikaalin todelliset pitoisuudet; epäyhtenäisiä fyysisiä muotoja (kaasuja, höyryjä, aerosoleja) tuottavien seosten osalta jokainen voidaan analysoida erikseen

— kaikki ilmapitoisuudet on ilmoitettava massayksikköinä (esimerkiksi mg/l, mg/m^3, jne.), tilavuusyksiköt (esimerkiksi ppm, ppb jne.) voidaan ilmoittaa sulkeissa

— hiukkaskokojakauma, massan aerodynaamisen halkaisijan mediaani (MMAD) ja geometrinen keskihajonta (σg) sekä niiden laskentamenetelmät. Yksittäiset hiukkaskokoanalyysit on myös esitettävä.

Testiolosuhteet

— tiedot testikemikaalin valmistelusta, mukaan luettuina tiedot kiinteiden materiaalien hiukkaskoon pienentämisessä tai testikemikaaliliuosten valmistamisessa käytetyistä menetelmistä. Jos mekaaniset prosessit ovat voineet muuttaa kemiallista koostumusta, on ilmoitettava analyysien tulokset testikemikaalin koostumuksen vahvistamiseksi.

— kuvaus (mieluiten kaavio) testi-ilmakehän tuottamiseen ja eläinten altistamiseen testi-ilmakehälle käytetystä laitteistosta

— tiedot käytetystä kemiallisesta analyysimenetelmästä ja sen validointimenetelmästä (myös tiedot siitä, miten tehokasta testikemikaalin saanto oli näytteenottokohdasta)

— testipitoisuuksien valintaperuste.

Tulokset

— kammion lämpötila, kosteus ja ilmanvirtaus (taulukkomuodossa)

— tiedot nimellisistä ja todellisista pitoisuuksista kammiossa (taulukkomuodossa)

— hiukkaskokotiedot sekä analyyttiset tiedot näytteen keräämisestä, hiukkaskokojakaumasta ja MMAD-arvon ja σ_g-arvon laskelmat (taulukkomuodossa)

— vastetiedot ja pitoisuustaso jokaisesta eläimestä (ts. eläimet, joissa oli merkkejä myrkyllisistä vaikutuksista, ja tiedot kuolleisuudesta sekä vaikutusten luonteesta, vaikeusasteesta, alkamisajankohdasta ja kestosta) (taulukkomuodossa)

— tutkimuksen aikana kerätyt tiedot yksittäisten eläinten ruumiinpainoista, kuolinpäivä ja -aika, jos se tapahtui ennen suunniteltua lopetusta, kunkin eläimen myrkyllisyysoireiden alkamisajankohta ja niiden mahdollinen palautuminen

— kunkin eläimen ruumiinavauslöydökset ja histopatologiset löydökset, mikäli saatavilla

— CLP-luokitus ja LC_{50}-raja-arvo.

Tulosten pohdinta ja tulkinta

— On kiinnitettävä erityistä huomiota niiden menetelmien kuvaukseen, joita tämän testimenetelmän vaatimusten (esimerkiksi rajapitoisuus tai hiukkaskoko) täyttämisessä käytettiin.

— Hiukkasten hengitettävyyttä on käsiteltävä kaikkien löydösten kannalta etenkin, jos hiukkaskokoon liittyvää kriteeriä ei voitu täyttää.

— Tutkimuksen kokonaisarviointiin on sisällytettävä tiedot nimellisten ja todellisten pitoisuuksien määrittelemiseen käytettyjen menetelmien yhtenäisyydestä sekä todellisen ja nimellisen pitoisuuden suhde.

— Raportissa on käsiteltävä myös todennäköistä kuolinsyytä ja pääasiallisesta vaikutustavasta (systeeminen vs. paikallinen).

— Jos kärsiviä tai voimakkaasta ja jatkuvasta kivusta merkkejä osoittavia eläimiä oli lopetettava humaanisti eläinkokeiden humaaneja lopettamiskriteereitä koskevassa OECD:n ohjeasiakirjassa (7) olevien perustelujen mukaisesti, siitä on esitettävä selvitys.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Tämän liitteen luku B.2 – Akuutti myrkyllisyys hengitettynä.

2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.

3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.

4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129–134.

5) Tämän liitteen luku B.1 b: Akuutti myrkyllisyys hengitettynä – akuutin toksisuuden luokittelua koskeva menetelmä

6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1272/2008, annettu 16 päivänä joulukuuta 2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta, EUVL L 353, 31.12.2008, s. 1.

10) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihon sähkövastusmääritystesti (TER).

11) Tämän liitteen luku B.40 *In vitro* ihosyövyttävyys: Ihmisihomallitesti.

12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Saatavilla internetosoitteessa: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.

15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄ

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Lisäys 2

Kaasut: jokaisen aloituspitoisuuden (PPM/4 H) yhteydessä noudatettava menettely

Yleisiä huomioita [1]

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 2 a: Aloituspitoisuus on 100 ppm.

Lisäys 2 b: Aloituspitoisuus on 500 ppm.

Lisäys 2 c: Aloituspitoisuus on 2 500 ppm.

Lisäys 2 d: Aloituspitoisuus on 20 000 ppm.

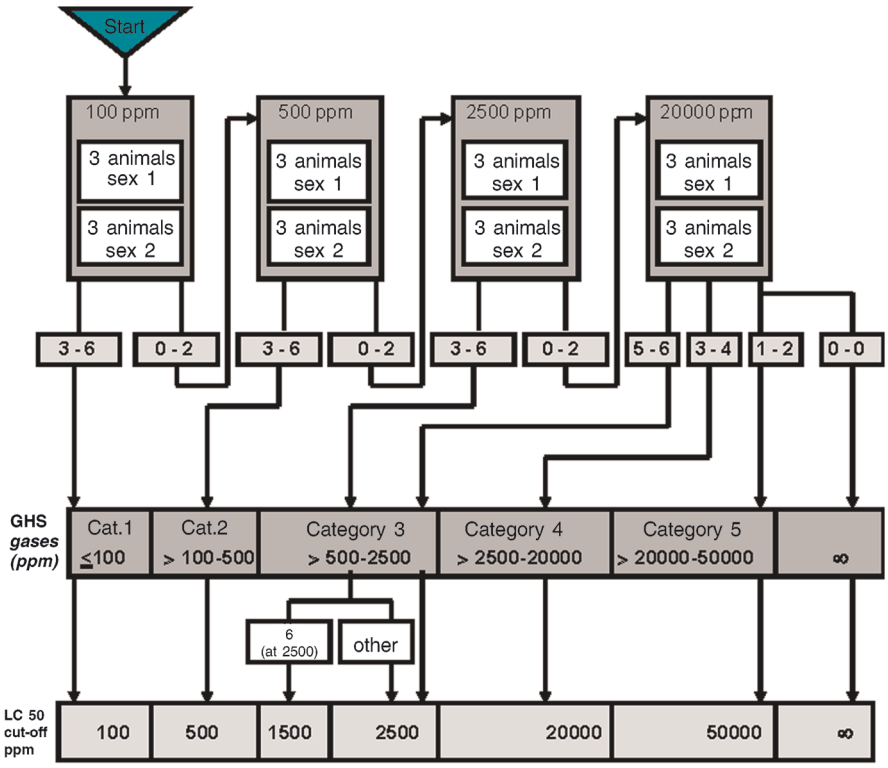
Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

[1] Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

Lisäys 2 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

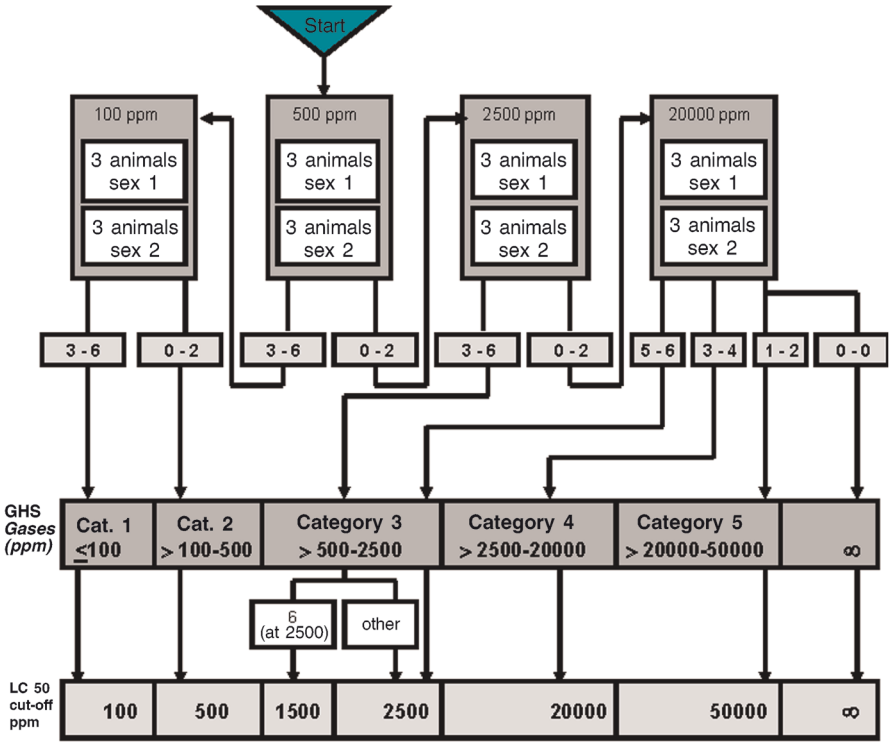
— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 2 b

Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

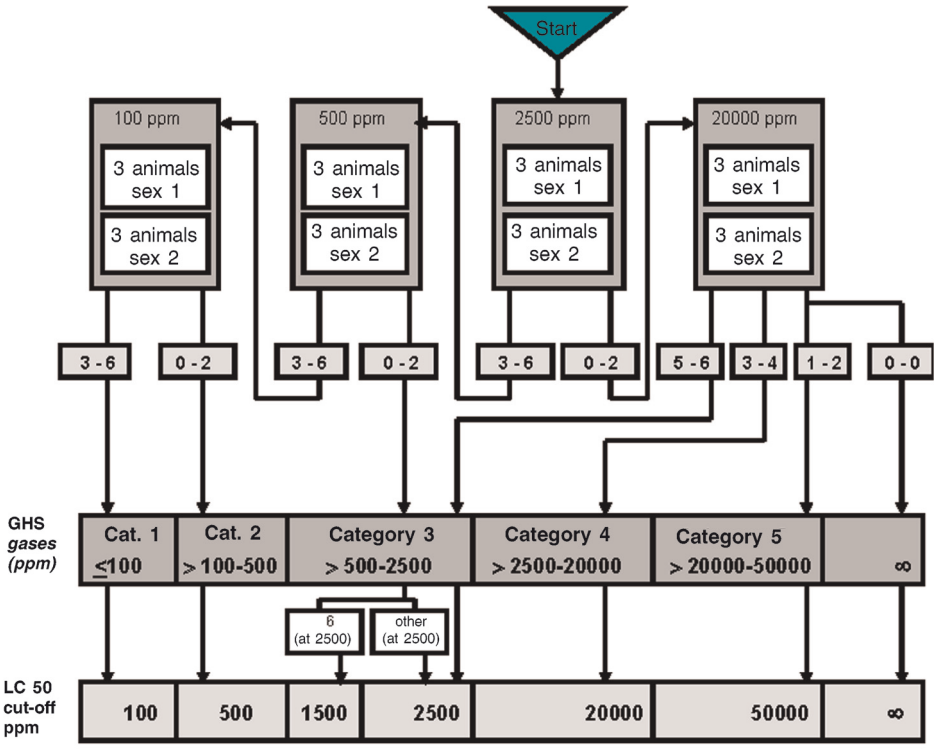
— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 2 c

Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

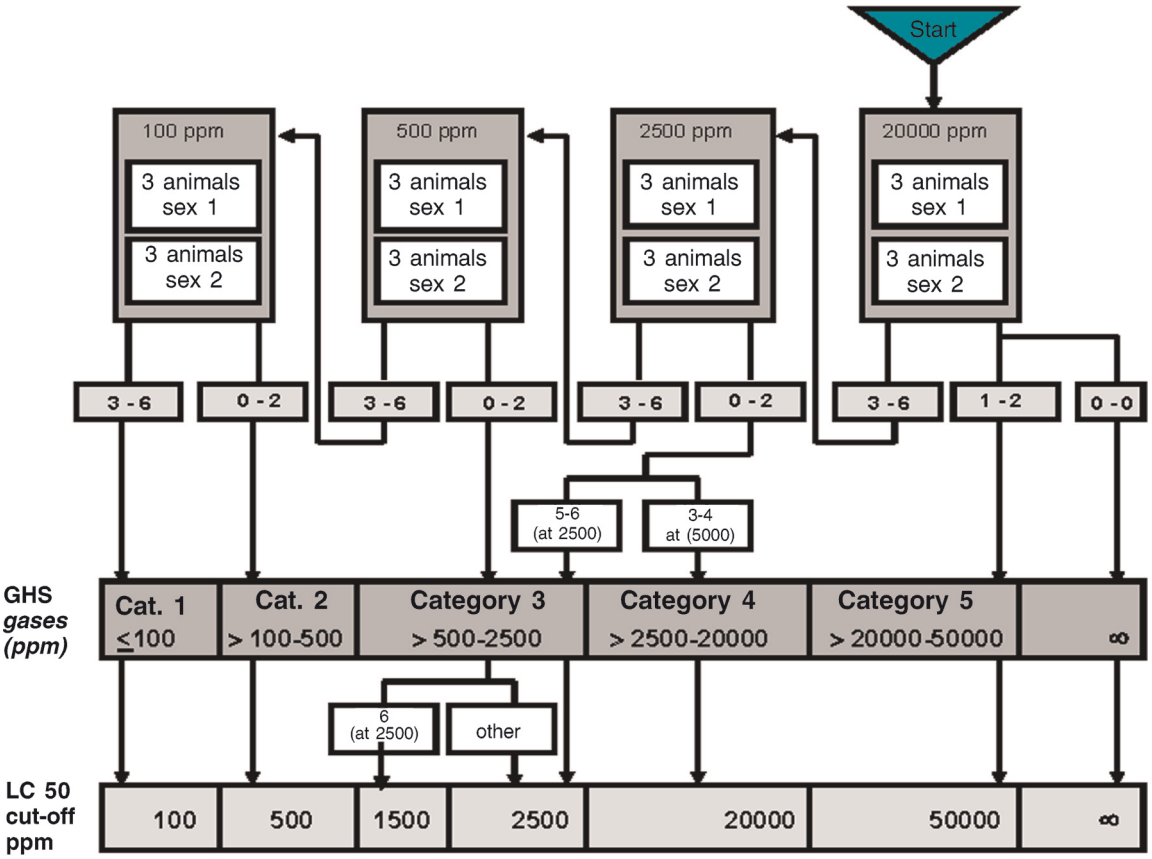
— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 2 d

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 3

Höyryt: jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä noudatettava menettely (mg/l/4h)

Yleisiä huomioita [1]

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 3 a: Aloituspitoisuus on 0,5 mg/l.

Lisäys 3 b: Aloituspitoisuus on 2,0 mg/l.

Lisäys 3 c: Aloituspitoisuus on 10 mg/l.

Lisäys 3 d: Aloituspitoisuus on 20 mg/l.

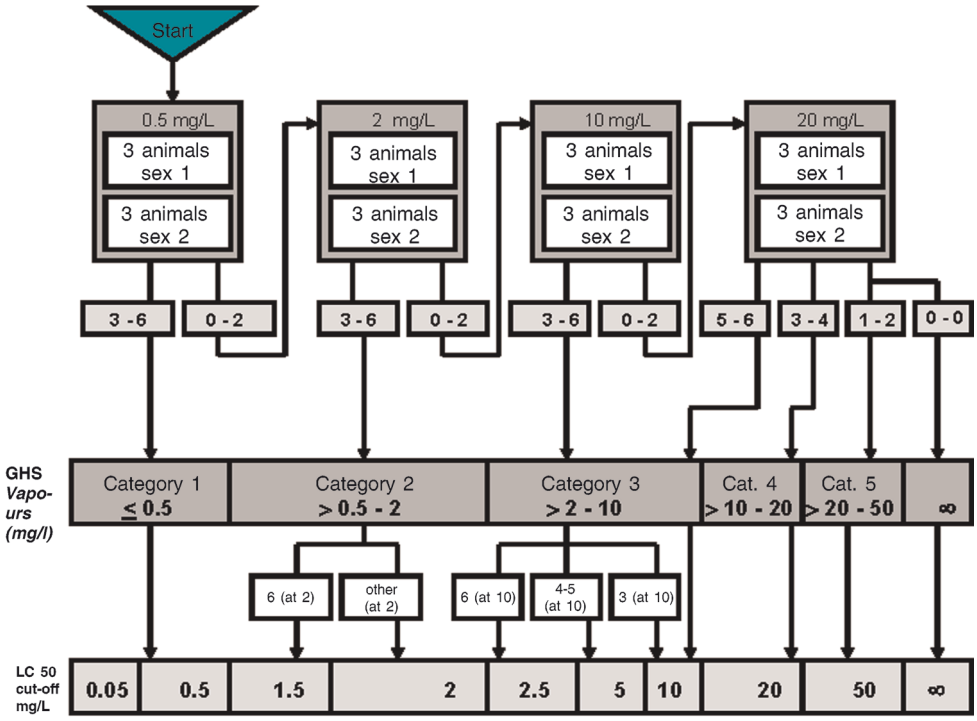
Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

[1] Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

Lisäys 3 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours

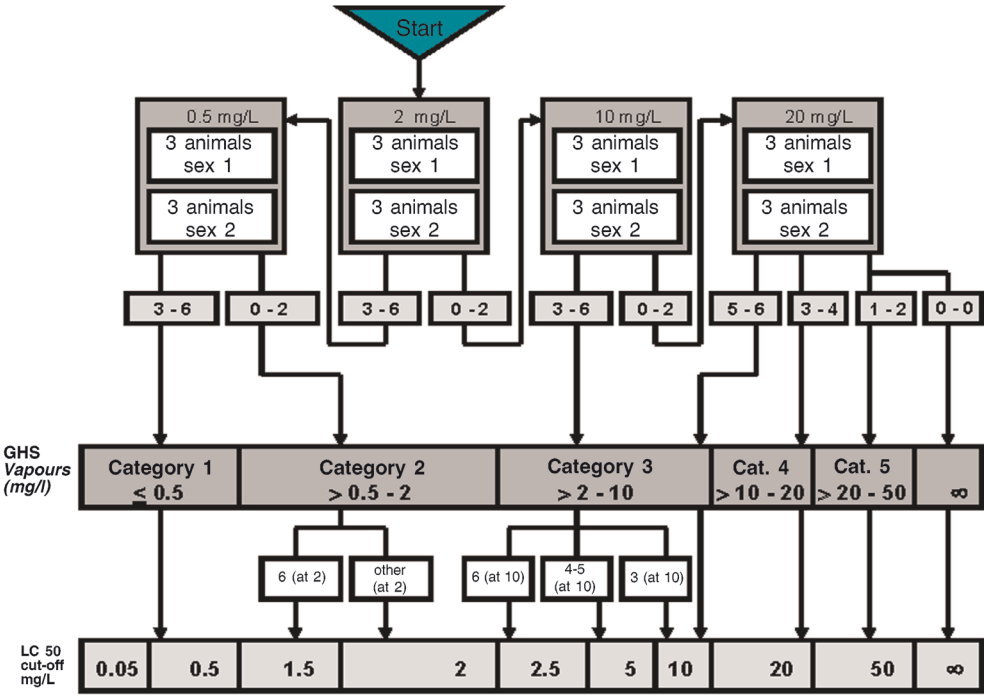


- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 3 b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

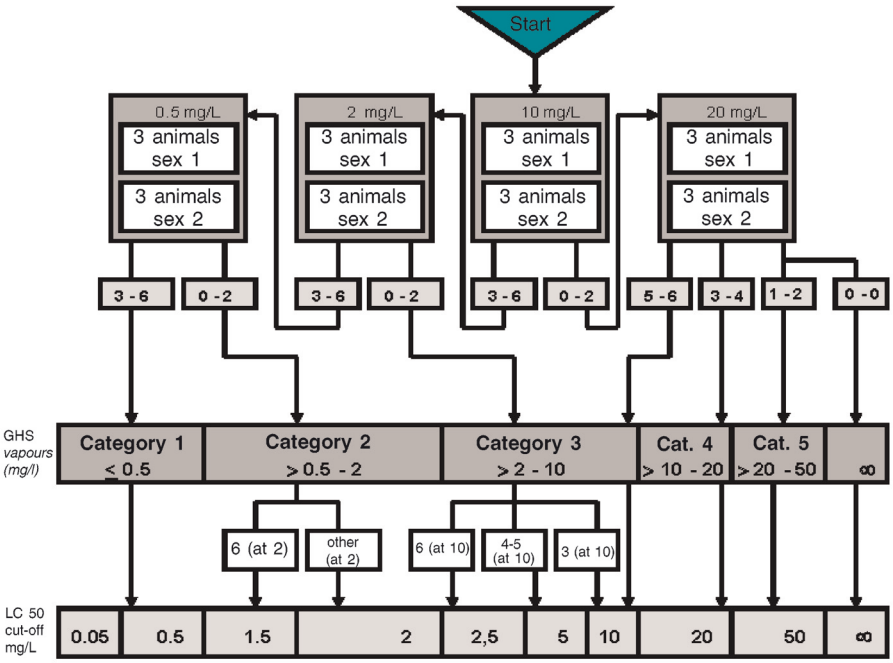
— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 3 c

Acute Inhalation Toxicity:

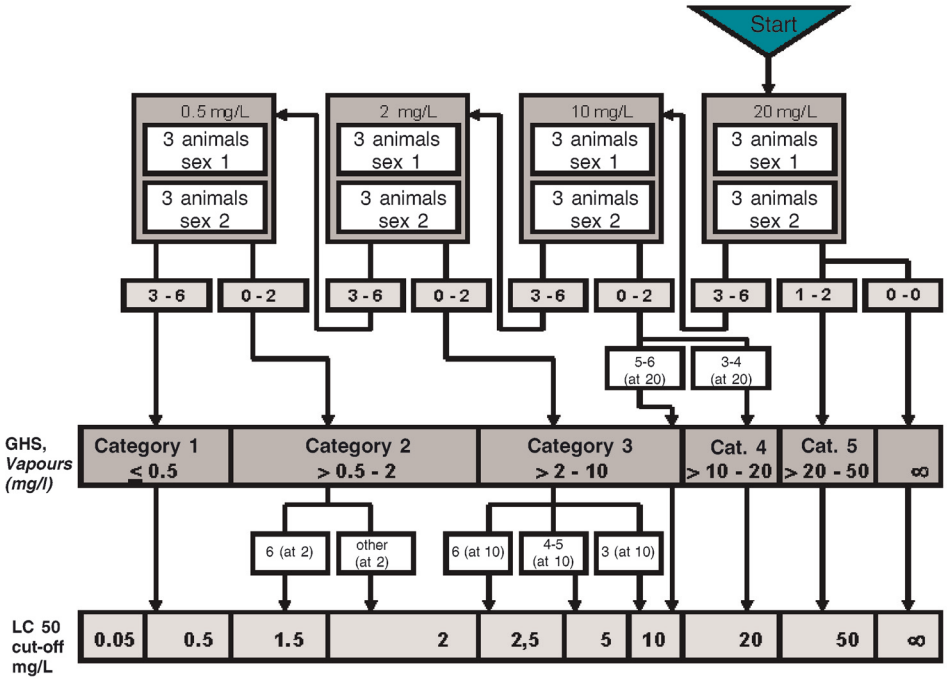
Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step
- 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 3 d

Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

Lisäys 4

Aerosolit: jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä noudatettava menettely (mg/l/4h)

Yleisiä huomioita [1]

Jokaisen aloituspitoisuuden yhteydessä on noudatettava tässä lisäyksessä olevan testimallin mukaista menettelyä.

Lisäys 4 a: Aloituspitoisuus on 0,05 mg/l.

Lisäys 4 b: Aloituspitoisuus on 0,5 mg/l.

Lisäys 4 c: Aloituspitoisuus on 1 mg/l.

Lisäys 4 d: Aloituspitoisuus on 5 mg/l.

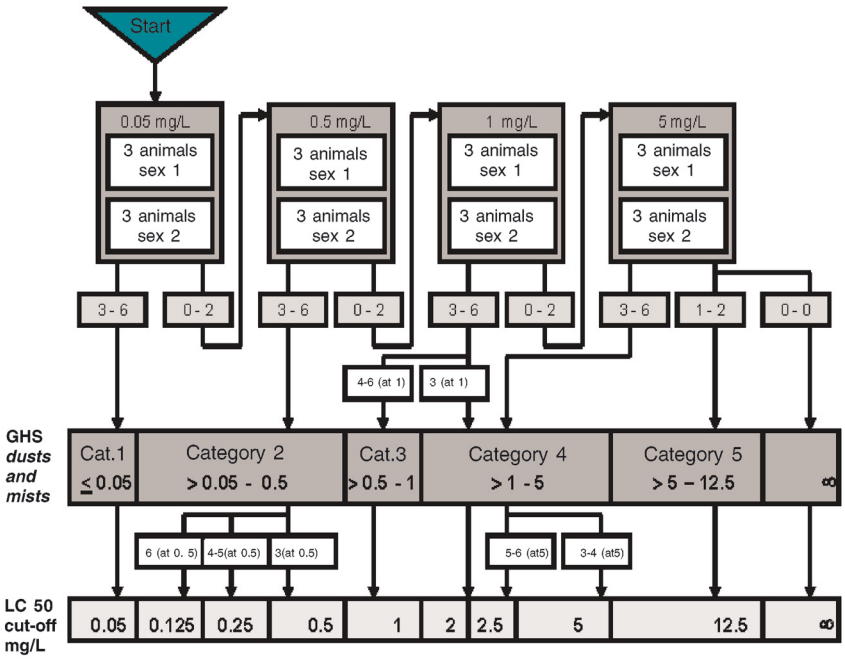
Testimenetelmässä edetään merkittyjen nuolten mukaisesti sen mukaan, kuinka monta eläintä on lopetettu humaaneista syistä tai kuinka monta eläintä on kuollut.

[1] Seuraavissa taulukoissa tarkoitetaan yhdenmukaistettua kemikaalien luokitus- ja merkintäjärjestelmää (GHS). EU:ssa sitä vastaa asetus (EY) N:o 1272/2008. Akuuttia myrkyllisyyttä hengitettynä tutkittaessa asetuksessa (EY) N:o 1272/2008 ei käytetä luokkaa 5.

Lisäys 4 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,05 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

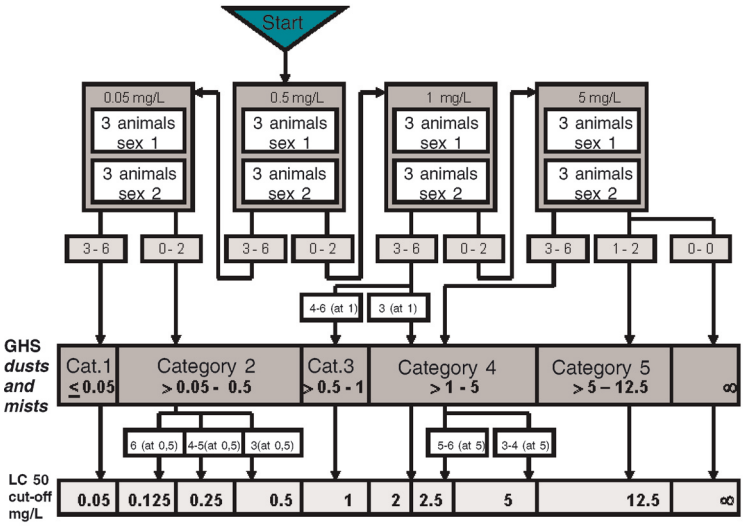
— ∞: unclassified

— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 4 b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

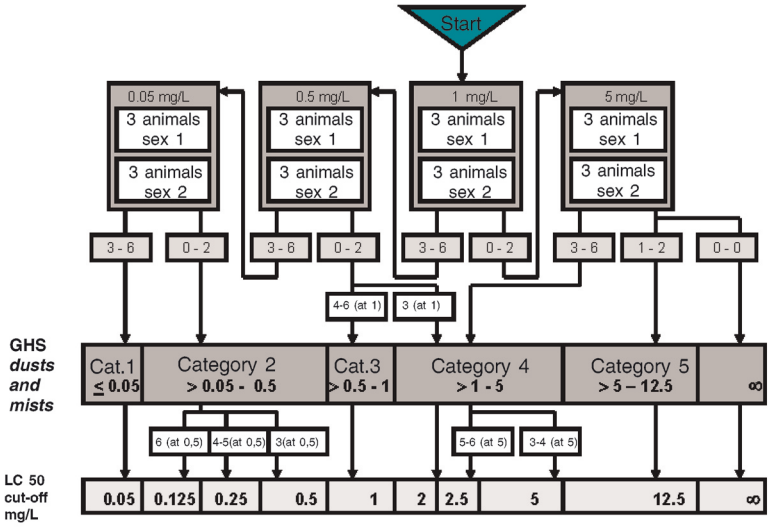
— ∞: unclassified

— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 4 c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

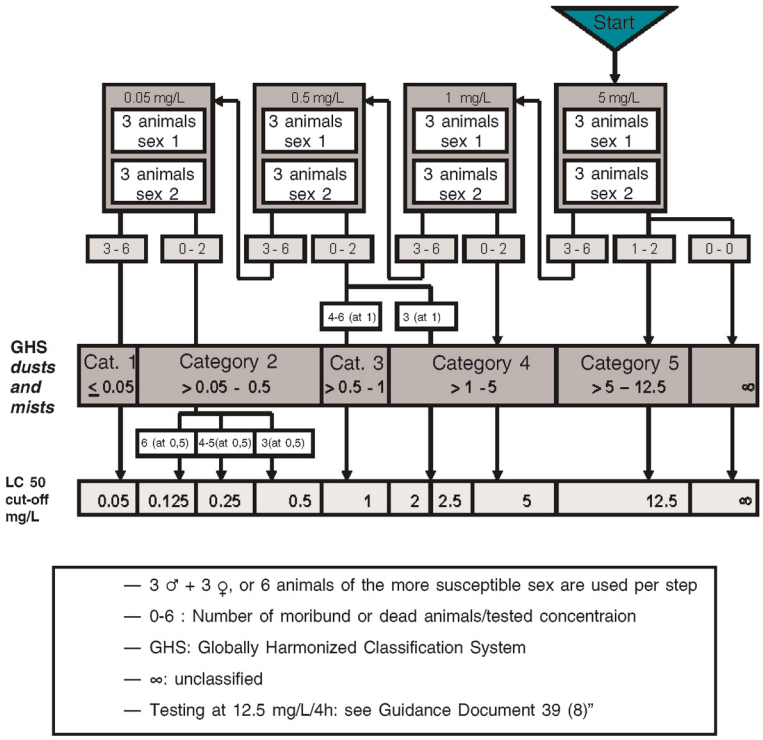
— ∞: unclassified

— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

Lisäys 4 d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



9) Korvataan luku C.10 seuraavasti:

”C.10 **SIMULAATIOTUTKIMUS: AEROBINEN VIEMÄRILIETTEEN KÄSITTELY: C.10-A: AKTIIVILIETEYKSIKÖT – C.10-B: BIOKALVOT**

C.10-A: Aktiivilieteyksiköt

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 303 (2001). 1950-luvulla havaittiin, että uudet pinta-aktiiviset aineet aiheuttivat liiallista vaahtoutumista jätevedenpuhdistamoissa ja joissa. Aerobinen käsittely ei poistanut niitä kokonaan, ja ne rajoittivat joissakin tapauksissa muun orgaanisen aineksen poistoa. Tästä syystä käynnistettiin useita tutkimuksia siitä, miten pinta-aktiiviset aineet voidaan poistaa jätevesistä ja miten jäteveden puhdistus tehoaa teollisuuden tuottamiin uusiin kemikaaleihin. Tähän tarkoitukseen käytettiin malliyksiköitä, jotka edustivat kahta aerobisen biologisen jäteveden puhdistuksen päätyyppiä (aktiivilietettä ja biosuodatusta eli tihkusuodatusta). Olisi ollut epäkäytännöllistä ja hyvin kallista jakaa jokaista uutta kemikaalia ja seurata kaikkia suuria jätevedenpuhdistamoja edes paikallisesti.

ALUSTAVAT HUOMIOT

Aktiivilieteyksiköt

2. Simuloitujen aktiivilieteyksikköjen kooksi on ilmoitettu 300–2 000 ml. Osa jäljitteli tarkasti täyden mittakaavan puhdistamoja, ja niissä oli lietteen selkeytyssäiliö, josta selkeytetty liete pumpattiin takaisin ilmastusaltaaseen, kun taas toisissa ei ollut lainkaan selkeytystiloja. Tästä esimerkkinä Swisher (1). Laitteen koko on kompromissi: toisaalta sen on oltava riittävän iso, jotta se on mekaanisesti toimiva eikä näytteiden tarvittava tilavuus häiritse sen toimintaa, mutta toisaalta ei saa olla niin iso, että se vaatii liian suuren tilan tai liikaa materiaaleja.

3. Kaksi laitetyyppiä, joita on käytetty laajasti tyydyttävin tuloksin, ovat Husmannin yksiköt (2), joita käytettiin pinta-aktiivisten aineiden tutkimuksissa, ja huokoiset astiat (3)(4). Nämä on kuvattu tässä testimenetelmässä. Myös muita laitteita, kuten Eckenfelderin (5), on käytetty onnistuneesti. Koska tämän simulaatiotutkimuksen toteuttaminen on melko kallista ja työlästä, rinnalla tutkittiin yksinkertaisempia ja halvempia seulontatestejä, jotka on kuvattu tämän liitteen luvun C.4 kohdassa A-F (6). Kokemus monista pinta-aktiivisista aineista ja muista kemikaaleista on osoittanut, että ne, jotka läpäisivät seulontatestit (helposti biohajoavat), hajosivat myös simulaatiotutkimuksessa. Osa aineista, jotka eivät läpäisseet seulontatestejä, läpäisi luontaisen biohajoavuuden testit (tämän liitteen luvut C.12 (7) ja C.19 (8)), mutta vain osa jälkimmäisistä hajosi simulaatiotutkimuksessa, kun taas ne kemikaalit, jotka eivät läpäisseet luontaisen biohajoavuuden testejä, eivät hajonneet simulaatiotutkimuksissa (9)(10)(11).

4. Simulaatiotutkimukset, joissa käytetään yhtä testiolosuhteiden joukkoa, ovat riittäviä joihinkin tarkoituksiin. Tulokset ilmaistaan testikemikaalin tai liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) poistumaprosentteina. Tällainen testi kuvataan tässä testimenetelmässä. Tässä tekstissä on useita eri muunnelmia toisin kuin tämän luvun edellisessä versiossa, jossa kuvattiin vain yhdentyyppinen laite, jolla käsiteltiin synteettistä jätevettä yhdistettyinä yksikköinä käyttämällä suhteellisen yksinkertaista lietteen poistumatapaa. Tekstissä kuvataan vaihtoehtoisia laitetyyppejä, toimintatapoja sekä jäteveden ja lietteen poistumatapoja. Tämä teksti seuraa tarkasti ISO 11733 -standardin (12) tekstiä, joka on tarkistettu huolellisesti, joskaan testimenetelmää ei ole validoitu laboratorioiden välisessä tutkimuksessa.

5. Muissa tarkoituksissa testikemikaalin pitoisuus poistovirrassa on tiedettävä tarkemmin, ja kattavampi menetelmä on tarpeen. Esimerkiksi lietteen poistumanopeutta on kontrolloitava tarkasti joka päivä ja koko testin keston ajan, ja yksiköitä on käytettävä eri poistumanopeuksilla. Jos halutaan käyttää täysin kattavaa menetelmää, testit on tehtävä kahdessa tai kolmessa eri lämpötilassa. Birch (13)(14) kuvaa tällaisen menetelmän, josta on yhteenveto lisäyksessä 6. Nykytietojen perusteella ei kuitenkaan voida päätellä, mitä kineettisiä malleja voidaan soveltaa kemikaalien biologiseen hajoamiseen jäteveden puhdistuksessa ja yleensä vesiympäristössä. Monodin kineettinen malli, joka on annettu esimerkkinä lisäyksessä 6, soveltuu ainoastaan kemikaaleihin, joiden pitoisuus on vähintään 1 mg/l, mutta joidenkin mielestä tätäkään ei ole vielä näytetty toteen. Lisäyksessä 7 on viitattu testeihin, joissa pitoisuudet vastaavat paremmin todellisia pitoisuuksia jätevesissä, mutta nämä testit sekä lisäyksessä 6 luetellut testit on kuvattu vain lisäyksissä, eikä niitä ole annettu erillisinä testimenetelminä.

Suodattimet

6. Simuloidut biosuodattimet ovat jääneet paljon vähemmälle huomiolle, kenties siksi, että ne ovat hankalampia ja isokokoisempia kuin simuloidut aktiivilietelaitokset. Gerike *et al* kehittivät biologisia suodatinyksiköitä ja käyttivät niitä yhdistettyinä yksiköinä (15). Nämä suodattimet olivat suhteellisen suuria (korkeus 2 m, tilavuus 60 l), ja kuhunkin tarvittiin jätevettä jopa 2 l/h. Baumann *et al* (16) simuloivat biologisia suodattimia upottamalla polyesterifleeceliuskoja konsentroituun aktiivilietteeseen puoleksi tunniksi ja kiinnittämällä liuskat sitten 1 m:n putkiin (sisähalkaisija 14 mm). Testikemikaali, joka oli mineraalisuolaliuoksen ainoa C-lähde, syötettiin pystysuuntaiseen putkeen, ja biologinen hajoaminen arvioitiin mittaamalla DOC poistovirrassa ja CO_2 syntyneessä kaasussa.

7. Biosuodattimia on simuloitu toisella tavalla (15). Pyöriviin putkiin, jotka oli kallistettu pieneen vaakasuuntaiseen kulmaan, syötettiin jätevettä (noin 250 ml/h) testikemikaalin kanssa ja ilman testikemikaalia, ja kerätystä poistovirrasta analysoitiin DOC ja/tai spesifinen testikemikaali.

TESTIN PERIAATE

8. Tämän menetelmän tarkoitus on määrittää poistuma ja aerobisten mikro-organismien aiheuttama vesiliukoisten orgaanisten kemikaalien primaarinen ja/tai lopullinen biohajoaminen jatkuvatoimisessa testijärjestelmässä, joka simuloi aktiivilieteprosessia. Helposti biohajoava orgaaninen aine ja orgaaninen testikemikaali ovat mikro-organismien hiilen ja energian lähteet.

9. Kahta jatkuvatoimista testiyksikköä (aktiivilietelaitoksia tai huokoisia astioita) käytetään rinnakkain identtisissä, testin tarkoitukseen soveltuvissa olosuhteissa. Normaalisti hydraulisen retentioajan keskiarvo on 6 h ja lietteen iän keskiarvo (retentioaika) on 6–10 päivää. Lietettä poistetaan kahdella eri menetelmällä. Lisättävän testikemikaalin pitoisuus on tavallisesti 10–20 mg/l liuennutta orgaanista hiiltä (DOC), ja sitä lisätään vain toisen yksikön tuloveteen (orgaaninen aine). Toista yksikköä käytetään kontrolliyksikkönä, jolla määritetään orgaanisen aineen biologinen hajoaminen.

10. Poistovedestä otetaan usein näytteitä, joista määritetään mieluiten DOC tai sitten kemiallinen hapenkulutus (COD) ja testikemikaalin pitoisuus (tarvittaessa) tekemällä sen yksikön poistoveden ominaisanalyysi, johon testikemikaalia lisätään. Poistoveden DOC- tai COD-pitoisuuden erot testi- ja kontrolliyksiköissä johtuvat oletettavasti testikemikaalista tai sen orgaanisista metaboliiteista. Tätä eroa verrataan tuloveden DOC- tai COD-pitoisuuteen, joka johtuu testikemikaalin lisäämisestä, jotta testikemikaalin poistuma voidaan määrittää.

11. Biologinen hajoaminen voidaan tavallisesti erottaa biosorptiosta tarkastelemalla huolellisesti poistuma-aikakäyrää, ja se voidaan yleensä vahvistaa biohajoamisen testillä käyttämällä akklimatisoitua inokulaattia yksiköstä, johon lisätään testikemikaalia.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

12. Testikemikaalin puhtauden, vesiliukoisuuden sekä haihtuvuus- ja adsorptio-ominaisuuksien on oltava tiedossa, jotta tulokset voidaan tulkita oikein. Haihtuvia ja liukenemattomia kemikaaleja ei tavallisesti voida testata ilman erityisiä varotoimia (katso lisäys 5). Kemiallisen rakenteen tai vähintään empiirisen kaavan on oltava tiedossa, jotta voidaan laskea teoreettiset arvot ja/tai tarkistaa mitatut parametriarvot, kuten teoreettinen hapenkulutus (ThOD), liuennut orgaaninen hiili (DOC) ja kemiallinen hapenkulutus (COD).

13. Tieto testikemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille (katso lisäys 4) voi olla hyödyllinen soveltuvia testipitoisuuksia valittaessa ja olennainen matalien biohajoavuusarvojen oikean tulkinnan kannalta.

KYNNYSARVOT

14. Tämän pinta-aktiivisten aineiden primaarisen biologisen hajoamisen simulaatiotutkimuksen (toteamiskokeen) alkuperäisessä sovelluksessa spesifisen kemikaalin poistuman on oltava vähintään 80 prosenttia, jotta pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida. Jos 80 prosentin arvoa ei saavuteta, tätä simulaatiotutkimusta (toteamiskoetta) voidaan soveltaa ja pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida vain, jos yli 90 prosenttia spesifisestä kemikaalista poistuu. Yleensä ei ole epäselvää, läpäisevätkö kemikaalit testin, ja saatua poistumaprosenttia voidaan käyttää laskettaessa todennäköistä pitoisuutta ympäristössä, jota käytetään kemikaalin vaarallisuuden arvioinnissa. Tulokset noudattavat yleensä kaikki tai ei mitään -periaatetta. Useissa puhtaiden kemikaalien tutkimuksissa DOC:n poistumaprosentti oli yli 90 prosenttia yli kolmessa neljäsosassa tapauksista ja yli 80 prosenttia yli 90 prosentissa kemikaaleista, joissa ilmeni merkittävää biohajoavuutta.

15. Suhteellisen harvaa kemikaalia (esim. pinta-aktiivista ainetta) esiintyy jätevedessä tässä testissä käytettyinä pitoisuuksina (noin 10 mg C/l). Osa kemikaaleista saattaa olla inhiboivia näinä pitoisuuksina, kun taas toisten kemikaalien poistumiskinetiikka saattaa olla erilainen, kun pitoisuus on pieni. Hajoamista voidaan arvioida tarkemmin käyttämällä muunneltuja menetelmiä ja realistisen pieniä testikemikaalin pitoisuuksia, ja kerättyjen tietojen perusteella voidaan laskea kineettiset vakiot. Tarvittavia kokeellisia tekniikoita ei ole kuitenkaan vielä validoitu täysin eikä kineettisiä malleja, jotka kuvaavat biohajoamisreaktioita, ole määritetty (katso lisäys 7).

VERTAILUKEMIKAALIT

16. Jotta voidaan varmistaa, että kokeellinen menetelmä suoritetaan oikein, testikemikaaleja tutkittaessa on hyvä testata välillä kemikaaleja, joiden käyttäytyminen on tiedossa. Tällaisia kemikaaleja ovat esimerkiksi adipiinihappo, 2-fenyylifenoli, 1-naftoli, difeenihappo ja 1-naftoehappo (9)(10)(11).

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

17. Simulaatiokokeiden tutkimuksista on laadittu paljon vähemmän raportteja kuin biohajoavuuskokeiden tutkimuksista. (Samanaikaisten) rinnakkaisnäytteiden toistettavuus on hyvä (10–15 %), kun testikemikaali on hajonnut vähintään 80-prosenttisesti, mutta vaihteluväli on suurempi, jos kemikaalin hajoavuus on heikompi. Lisäksi joiden rajatapausten osalta on kirjattu hyvinkin erilaisia tuloksia (kuten 10 % ja 90 %) eri ajankohtina 9-viikkoisen testijakson aikana.

18. Kahdella erityyppisellä laitteella saaduissa tuloksissa ei ole havaittu juurikaan eroa, mutta tietyt kemikaalit hajoavat kotitalousjätevedessä kattavammin ja yhtenäisemmin kuin OECD:n synteettisessä jätevedessä.

TESTAUSMENETELMÄN KUVAUS

Laite

Testijärjestelmä

19. Yhden testikemikaalin testijärjestelmään kuuluu testiyksikkö ja kontrolliyksikkö, mutta jos tehdään vain ominaisanalyysit (primaarinen biohajoaminen), tarvitaan pelkästään testiyksikkö. Yhtä kontrolliyksikköä voidaan käyttää useita testiyksikköjä varten huolimatta siitä, käytetäänkö testiyksiköissä samaa vai eri testikemikaaleja. Jos yksiköt yhdistetään (lisäys 3), jokaista testiyksikköä varten on oltava oma kontrolliyksikkö. Testijärjestelmä voi olla simuloitu aktiivilietelaitos, Husmannin yksikkö (lisäys 1, kuva 1) tai huokoinen astia (lisäys 1, kuva 2). Joka tapauksessa tarvitaan riittävän isot säiliöt tulo- ja poistovedelle sekä pumput, joilla annostellaan tulovesi joko testikemikaalin kanssa sekoitettuna tai erikseen.

20. Jokaisessa aktiivilietelaitoksessa on ilmastusastia, jonka tunnettu tilavuus on noin 3 litraa aktiivilietettä, ja erotusastia (toissijainen selkeytin), johon mahtuu noin 1,5 litraa. Tilavuuksia voidaan muuttaa hieman säätämällä erotusastian korkeutta. Astiat voivat olla erikokoisia, jos hydraulinen kuormitus on vastaava. Jos testihuoneen lämpötilaa ei voida pitää halutulla alueella, on suositeltavaa käyttää astioita, joissa on vesivaippa, ja lämpötilasäädeltyä vettä. Aktiiviliete kierrätetään paineilmapumpulla tai annostelupumpulla erottimesta ilmastusastiaan joko jatkuvasti tai säännöllisin väliajoin.

21. Huokoisten astioiden järjestelmään kuuluu huokoinen kartiokulmapohjainen sisäsylinteri, joka on vähän isommassa samanmuotoisessa astiassa, joka on tehty läpäisemättömästä muovista. Huokoiseen astiaan soveltuva materiaali on huokoinen polyeteeni, jonka suurin huokoskoko on 90 µm ja paksuus 2 mm. Liete erottuu käsitellystä orgaanisesta aineesta kulkeutuessaan huokoisen seinämän läpi. Poistovirrat keräytyvät rengasmaiseen tilaan, josta tapahtuu ylivuotoa keräämisastiaan. Selkeytymistä ei tapahdu, joten lietettä ei palauteta. Koko järjestelmä voidaan asentaa lämpösäädeltyyn vesihauteeseen. Huokoiset astiat tukkeutuvat, joten ylivuotoa voi tapahtua alkuvaiheissa. Jos näin käy, vaihda huokoinen sisäkappale. Ota ensin liete lapolla astiasta puhtaaseen ämpäriin ja poista tukkeutunut sisäkappale. Pyyhi läpäisemätön ulkosylinteri, asenna puhdas sisäkappale paikalleen ja pane liete takaisin astiaan. Kaavi tukkeutuneen sisäkappaleen reunoihin tarttunut liete huolellisesti ja siirrä se puhtaaseen astiaan. Puhdista tukkeutuneet astiat ensin hienolla vesisuihkulla, jotta jäljelle jäänyt liete poistuu, ja liota niitä ensin laimennetussa natriumhypokloriittiliuoksessa ja sitten vedessä. Huuhtele astiat lopuksi huolellisesti vedellä.

22. Kummankin järjestelmän ilmastusastioissa tapahtuvaan lietteen ilmastukseen on käytettävä soveltuvaa tekniikkaa, kuten sintrattuja kuutioita ja paineilmaa. Ilma puhdistetaan tarvittaessa kuljettamalla se soveltuvan suodattimen läpi ja pesemällä se. Järjestelmän läpi täytyy kulkea riittävästi ilmaa, jotta aerobiset olosuhteet säilyvät ja lietehiutaleet pysyvät suspendoituneina koko testin ajan.

Suodatinlaite tai sentrifugi

23. Kalvosuodatin, jonka huokoskoko on sopiva (aukon nimellishalkaisija 0,45 µm) ja joka adsorboi liukoisia orgaanisia kemikaaleja ja vapauttaa mahdollisimman vähän orgaanista hiiltä. Jos käytettävät suodattimet vapauttavat orgaanista hiiltä, poista orgaaninen hiili pesemällä suodattimet huolellisesti kuumalla vedellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää sentrifugia, jolla voidaan saavuttaa 40 000 m/s^2:n kiihtyvyys.

Analyysilaitteet

24. Laite, joka tarvitaan seuraavien seikkojen määrittämiseen:

— DOC (liuennut orgaaninen hiili) ja TOC (orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus) tai COD (kemiallinen hapenkulutus)

— spesifinen kemikaali, jos tarpeen

— suspendoitunut kiintoaines, pH, happipitoisuus vedessä

— lämpötila, happamuus ja emäksisyys

— ammonium, nitriitti ja nitraatti, jos testi tehdään nitrifioivissa olosuhteissa.

Vesi

25. Vesijohtovesi, jossa DOC on alle 3 mg/l. Määritä emäksisyys, jos se ei ole tiedossa.

26. Deionisoitu vesi, jossa DOC on alle 2 mg/l.

Orgaaninen aine

27. Orgaanisena aineena voidaan käyttää synteettistä jätevettä, kotitalousjätevettä tai näiden yhdistelmää. On osoitettu (11)(14), että pelkän kotitalousjäteveden käyttö nostaa usein DOC:n poistumaprosenttia ja sallii jopa sellaisten kemikaalien poistumisen ja biologisen hajoamisen, jotka eivät hajoa biologisesti käytettäessä OECD:n synteettistä jätevettä. Lisäksi kotitalousjäteveden jatkuva tai ajoittainen lisääminen stabiloi usein aktiivilietettä, olennaisen tärkeä hyvä selkeytyvyys mukaan lukien. Niinpä kotitalousjäteveden käyttö on suositeltavaa. Mittaa jokaisen uuden orgaanisen aine-erän DOC- tai COD-pitoisuus. Orgaanisen aineen happamuuden tai emäksisyyden täytyy olla tiedossa. Orgaaniseen aineeseen voi olla tarpeen lisätä soveltuvaa puskuria (natriumvetykarbonaattia tai kaliumdivetyfosfaattia), jos happamuus tai emäksisyys on matala, jotta ilmastusastian pH on 7,5 ± 0,5 testin aikana. Lisättävän puskurin määrä ja lisäämisen ajankohta on päätettävä tapauskohtaisesti. Kun seoksia käytetään jatkuvasti tai ajoittaisesti, seoksen DOC-arvo (tai COD-arvo) on pidettävä suurin piirtein samana esimerkiksi laimentamalla seosta vedellä.

Synteettinen jätevesi

28. Liuota yhteen litraan vesijohtovettä: 160 mg peptonia, 110 mg lihauutetta, 30 mg ureaa, 28 mg vedetöntä dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4), 7 mg natriumkloridia (NaCl), 4 mg kalsiumkloridihydraattia ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg magnesiumsulfaattiheptahydraattia. Tämä OECD:n synteettinen jätevesi on esimerkki, ja siinä tulovirtauksen DOC-pitoisuuden keskiarvo on noin 100 mg/l. Vaihtoehtoisesti voi käyttää muita koostumuksia, joiden DOC-pitoisuus on suunnilleen sama ja jotka ovat lähempänä oikeaa jätevettä. Jos tarvitaan tulovettä, jonka pitoisuus on pienempi, laimenna synteettistä jätevettä (esimerkiksi 1:1) vesijohtovedellä, jotta pitoisuudeksi saadaan noin 50 mg/l. Nitrifioivat organismit kasvavat hyvin tällaisessa laimeassa tulovedessä, ja laimennus on hyvä tehdä, jos aikomuksena on tutkia nitrifioivien jätevedenpuhdistamojen simulointia. Tätä synteettistä jätevettä voidaan valmistaa tislattuun veteen väkevöidyssä muodossa. Se säilyy viikon noin 1 °C:n lämpötilassa. Laimenna tarvittaessa vesijohtovedellä. (Tämä aine ei ole tyydyttävä, sillä esimerkiksi typpipitoisuus on hyvin korkea ja hiilipitoisuus suhteellisen matala, mutta parempia ehdotuksia ei ole tehty, lukuun ottamatta fosfaatin lisäämistä puskurina ja peptonin lisäämistä).

Kotitalousjätevesi

29. Käytä tuoretta selkeytettyä jätevettä, jota kerätään päivittäin puhdistamosta, johon tulee pääasiassa kotitalousjätevettä. Jätevesi kerätään ennen primaarista sedimentaatiota primaarisen sedimentaatioaltaan ylivuotokanavasta tai aktiivilietelaitoksen syötöstä, eikä siinä saa juurikaan olla karkeita hiukkasia. Jätevettä voidaan käyttää, kun sitä on säilytetty usea päivä (ei kuitenkaan yleensä yli seitsemän päivää) noin 4 °C:n lämpötilassa, jos voidaan todistaa, että DOC (tai COD) ei ole laskenut merkittävästi (alle 20 %) säilytyksen aikana. Jotta järjestelmän häiriöitä voidaan välttää, jokaisen uuden erän DOC (tai COD) on säädettävä ennen käyttöä soveltuvaan vakioarvoon esimerkiksi vesijohtovedellä laimentamalla.

Aktiiviliete

30. Ota aktiivilietettä ymppäystä varten asianmukaisesti toimivan jätevedenpuhdistamon ilmastussäiliöstä tai laboratoriolaitoksesta, johon syötetään pääosin kotitalouksista tulevaa jätevettä.

Testikemikaalin kantaliuokset

31. Jos kemikaalin liukoisuus on riittävä, valmista kantaliuokset, joiden pitoisuus on soveltuva (esim. 1–5 g/l), deionisoituun veteen tai synteettisen jäteveden mineraaleihin. (Liukenemattomat ja haihtuvat kemikaalit, katso lisäys 5.) Määritä kantaliuoksen DOC ja orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) ja toista mittaukset jokaiselle uudelle erälle. Jos DOC- ja TOC-arvon ero on yli 20 prosenttia, tarkista testikemikaalin vesiliukoisuus. Varmista, että saanto on riittävän hyvä (tavallisesti > 90 prosenttia on odotettavissa), vertaamalla nimellisarvoon DOC-arvoa tai testikemikaalin pitoisuutta, joka on mitattu kantaliuoksen ominaisanalyysilla. Varmista etenkin dispersioiden osalta, voidaanko DOC-arvoa käyttää analyyttisenä parametrina vai voidaanko käyttää ainoastaan testikemikaalikohtaista analyysimenetelmää. Näytteet on sentrifugoitava, jos kyseessä on dispersio. Mittaa jokaisen uuden erän DOC, COD tai testikemikaali ominaisanalyysilla.

32. Määritä kantaliuoksen pH. Äärimmäiset arvot viittaavat siihen, että kemikaalin lisääminen saattaa vaikuttaa testijärjestelmän aktiivilietteen pH-arvoon. Jos näin käy, neutraloi kantaliuos pienillä määrillä epäorgaanista happoa tai emästä, kunnes pH on 7 ± 0,5, mutta vältä testikemikaalin saostumista.

MENETTELY

33. Menettely kuvataan aktiivilietelaitoksia varten. Sitä on muokattava hieman, jos käytössä on huokoisten astioiden järjestelmä.

Siirrosaineen valmistelu

34. Testijärjestelmään lisätään testin alussa siirrosaineena aktiivilietettä tai siirrosainetta, joka sisältää pienen määrän mikro-organismeja. Pidä siirrosaine ilmastettuna huoneenlämmössä käyttöön asti ja käytä se 24 tunnin kuluessa. Jos käytetään aktiivilietettä, ota aktiivilietenäyte tehokkaan biologisen jätevedenpuhdistamon ilmastussäiliöstä tai laboratoriopuhdistamosta, johon tulee lähinnä kotitalousjätevettä. Jos tarkoituksena on simuloida nitrifioivia olosuhteita, ota lietettä nitrifioivasta jätevedenpuhdistamosta. Määritä suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuus ja väkevöi liete tarvittaessa selkeyttämällä, jotta testijärjestelmään lisättävä tilavuus on mahdollisimman pieni. Varmista, että kuiva-aineen alkupitoisuus on noin 2,5 g/l.

35. Jälkimmäisessä tapauksessa inokulaattina käytetään 2–10 ml/l biologisen jätevedenpuhdistamon poistovettä. Jotta saadaan mahdollisimman monta eri bakteerilajia, voi olla hyvä lisätä eri lähteistä, kuten esimerkiksi pintavedestä, saatuja inokulaatteja. Tällöin aktiiviliete kehittyy ja kasvaa testijärjestelmässä.

Orgaanisen aineen annostelu

36. Varmista, ettei tulo- ja poistoveden säiliössä tai tuloveden säiliöistä tulevissa ja poistoveden säiliöön johtavissa putkissa ole mikrobikasvustoja puhdistamalla ne huolellisesti ennen testiä ja testin aikana. Kokoa testijärjestelmät huoneessa, jonka lämpötilaa säädellään (tavallisesti 20–25 °C) tai käytä testiyksiköitä, joissa on vesivaippa. Valmista riittävä määrä tarvittavaa orgaanista ainetta (kohdat 27–29). Täytä ilmastusastia ja erotin aluksi orgaanisella aineella ja lisää inokulaatti (kohdat 34 ja 35). Aloita ilmastus siten, että liete pysyy suspensiossa ja aerobisessa tilassa, ja aloita tuloveden annostelu ja selkeytetyn lietteen kierrätys. Annostele orgaanista ainetta säiliöistä testi- ja kontrolliyksiköiden ilmastusastioihin (kohdat 20 ja 21) ja kerää poistovedet vastaaviin säiliöihin. Jotta hydraulinen retentioaika on normaali eli 6 h, orgaanista ainetta pumpataan nopeudella 0,5 l/h. Varmista nopeus mittaamalla päivittäin annosteltu orgaaninen aine sen perusteella, paljonko säiliöissä olevan aineen tilavuus on pienentynyt. Toinen annostelutapa on tarpeen, jos halutaan määrittää kemikaalien ajoittaisen vapautumisen tai äkkikuormituksen vaikutuksia.

37. Jos orgaanista ainetta valmistetaan päivää pidemmäksi ajaksi, se on jäähdytettävä noin 4 °C:ssä tai säilytettävä muulla soveltuvalla tavalla, jotta mikrobien kasvu ja biologinen hajoaminen voidaan estää testiyksiköiden ulkopuolella (kohta 29). Jos käytetään synteettistä jätevettä, voidaan valmistaa väkevöitetty kantaliuos (esim. kymmenen kertaa normaalia väkevämpi, kohta 28), jota voidaan säilyttää noin 4 °C:ssa. Tämä kantaliuos voidaan sekoittaa hyvin sopivaan määrään vesijohtovettä ennen käyttöä tai se voidaan pumpata suoraan samalla, kun sopiva määrä vesijohtovettä pumpataan erikseen.

Testikemikaalin annostelu

38. Lisää sopiva määrä testikemikaalin kantaliuosta (kohta 31) tuloveden säiliöön tai annostele se suoraan ilmastusastiaan erillisellä pumpulla. Tuloveden testipitoisuuden keskiarvon on normaalisti oltava 10–20 mg/l (DOC), eikä suurin pitoisuus saa olla yli 50 mg/l. Jos testikemikaalin vesiliukoisuus on alhainen tai toksisia vaikutuksia on odotettavissa, laske pitoisuus arvoon 5 mg/l DOC tai jopa sen alle, mutta vain silloin, jos soveltuva ominaisanalyysi on käytettävissä ja sellainen tehdään (dispergoidut testikemikaalit, jotka liukenevat huonosti veteen, voidaan lisätä erityisillä annostelumenetelmillä, katso lisäys 5).

39. Aloita testikemikaalin lisääminen, kun järjestelmän toiminta on vakiintunut ja se poistaa DOC:ta orgaanisesta aineesta tehokkaasti (noin 80 %). Ennen testikemikaalin lisäämistä on tärkeää tarkistaa, että kaikki yksiköt toimivat yhtä tehokkaasti. Jos näin ei ole, yleensä auttaa, kun lietteet sekoitetaan keskenään ja jaetaan uudelleen yhtä suuriin osiin eri yksiköihin. Kun käytössä on aktiivilieteinokulaatti (noin) 2,5 g/l (kuivapaino), testikemikaalia voidaan lisätä testin alusta saakka, sillä suurenevien määrien lisäämisessä suoraan on se etu, että aktiiviliete saattaa adaptoitua testikemikaaliin paremmin. Huolimatta siitä, millä tavalla testikemikaalia lisätään, virtausnopeus ja/tai säiliön tai säiliöiden tilavuudet on suositeltavaa mitata säännöllisin väliajoin.

Aktiivilietteen käsittely

40. Aktiivilietteen kiintoaineksen pitoisuus stabiloituu tavallisesti raja-arvojen sisään testin kuluessa käytetystä inokulaatista huolimatta. Alue on 1–3 g/l (kuivapaino) orgaanisen aineen laadun ja pitoisuuden, käyttöolosuhteiden, mikro-organismien luonteen ja testikemikaalin vaikutuksen mukaan.

41. Määritä suspendoitunut kiintoaines ilmastusastioissa vähintään kerran viikossa ja heitä ylimääräinen liete pois, jotta pitoisuus pysyy alueella 1–3 g/l (kuivapaino), tai kontrolloi, että lietteen iän keskiarvo pysyy vakiona eli yleensä 6–10 päivää. Jos lietteen retentioajaksi valitaan esimerkiksi 8 päivää, poista joka päivä 1/8 aktiivilietteen ilmastusastiassa olevasta tilavuudesta ja hävitä se. Toista sama päivittäin tai käytä automaattista jaksoittaisesti toimivaa pumppua, jos mahdollista. Suspendoituneen kiintoaineksen pitoisuuden pitäminen vakiona tai tarkoin rajatulla alueella ei pidä vakiona lietteen retentioaikaa (SRT). Se on muuttuja, joka määrittää testikemikaalin pitoisuusarvon poistovedessä.

42. Poista testin aikana vähintään kerran päivässä ilmastusastian ja erotusastian seiniin tarttunut liete, jotta se suspendoituu uudelleen. Estä biokalvon kasvu tarkastamalla ja puhdistamalla kaikki putket ja letkut säännöllisesti. Kierrätä selkeytetty liete erotusastiasta ilmastusastiaan mieluiten jaksoittaisella pumppauksella. Huokoisia astioita käytettäessä kierrätystä ei tehdä, mutta varmista, että puhtaat sisäastiat ovat paikallaan, ennen kuin astian tilavuus nousee merkittävästi (kohta 21).

43. Husmannin yksiköissä lietteen selkeytyminen voi olla heikkoa ja lietettä voi hävitä. Tilanteen voi korjata käyttämällä testi- ja kontrolliyksiköissä rinnakkain yhtä tai useaa seuraavista menetelmistä:

— tuoretta lietettä tai hiutaloittamisainetta (esimerkiksi 2 ml/astia, 50 g/l $FeCl_3$) voidaan lisätä säännöllisin väliajoin, kuten kerran viikossa, mutta varmista, ettei $FeCl_3$ aiheuta testikemikaalin reaktioita tai saostumista

— paineilmapumpun tilalle voidaan vaihtaa peristalttinen pumppu, jolloin voidaan käyttää lietteen kierrätysvirtausta, joka vastaa suunnilleen tuloveden virtausta, ja selkeytettyyn lietteeseen voi kehittyä anaerobinen alue (paineilmapumpun geometria rajoittaa palautetun lietteen vähimmäisvirtausnopeuden noin 12-kertaiseksi tulovirtaukseen verrattuna)

— lietettä voidaan pumpata jaksoittaisesti erottimesta ilmastusastiaan (esim. 5 minuutin pumppaus 2,5 tunnin välein, kun kierrätetään 1–1,5 l/h)

— vaahtoamisen aiheuttamaa poistumista voidaan estää käyttämällä myrkytöntä vaahtoutumatonta ainetta (kuten silikoniöljyä), jonka pitoisuus on pienin mahdollinen

— ilmaa voidaan kuljettaa erottimessa olevan lietteen läpi lyhyinä sykäyksinä (esim. 10 sekuntia kerran tunnissa)

— orgaanista ainetta voidaan annostella jaksoittaisesti ilmastusastiaan (esim. 3–10 minuuttia kerran tunnissa).

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

44. Mittaa säännöllisin väliajoin ilmastusastioissa olevan aktiivilietteen liuenneen hapen pitoisuus, lämpötila ja pH-arvo. Varmista, että happea on aina riittävästi (> 2 mg/l) ja että lämpötila pysyy vaaditulla alueella (yleensä 20–25 °C). Pidä pH arvossa 7,5 ± 0,5 annostelemalla ilmastusastiaan tai tuloveteen pieniä määriä epäorgaanista emästä tai happoa tai nostamalla orgaanisen aineen puskurointitehoa (katso kohta 27). Kun nitrifikaatiota tapahtuu, syntyy happoa. Kun 1 mg typpeä hapettuu, syntyvä määrä vastaa noin 7:ää mg CO_3:ta. Mittaustiheys määräytyy mitattavan parametrin ja järjestelmän vakauden mukaan ja voi vaihdella päivästä viikkoon.

45. Mittaa kontrolli- ja testiastioiden tuloveden DOC tai COD. Mittaa testikemikaalin pitoisuus testitulovirrasta ominaisanalyysillä tai arvioi se kantaliuoksen pitoisuuden (kohta 31), käytetyn tilavuuden ja testiyksikköön annostellun lietemäärän perusteella. Testikemikaalin pitoisuuden laskeminen on suositeltavaa, sillä se vähentää pitoisuustietojen vaihtelua.

46. Ota kerätystä poistovedestä soveltuvat näytteet (esim. 24 h:n komposiitit) ja suodata ne sellaisen kalvon läpi, jonka huokoskoko on 0.45 µm, tai sentrifugoi kiihtyvyydellä 40 000 m/s^2 noin 15 minuutin ajan. Sentrifugointia käytetään, jos suodattaminen on hankalaa. Mittaa lopullinen biohajoaminen määrittämällä DOC tai COD vähintään kaksi kertaa sekä tarvittaessa primaarinen biohajoaminen testikemikaalin ominaisanalyysilla.

47. COD-arvon käytöstä voi seurata analyyttisiä ongelmia, jos pitoisuus on pieni, joten on suositeltavaa käyttää tarpeeksi suurta testipitoisuutta (noin 30 mg/l). Jos kemikaali on voimakkaasti adsorboiva, adsorboituneen kemikaalin määrä lietteessä on suositeltavaa mitata testikemikaalikohtaisella analyysimenetelmällä.

48. Näytteenottotiheys määräytyy testin odotetun keston mukaan. Suositeltu tiheys on kolmesti viikossa. Kun yksiköt toimivat tehokkaasti, odota testikemikaalin lisäämisen jälkeen 1–6 viikkoa, jotta tasapainotila saavutetaan. Tasannevaiheessa (kohta 59), joka kestää yleensä 3 viikkoa, on suositeltavaa määrittää vähintään 15 kelvollista arvoa testituloksen arviointia varten. Testi voidaan lopettaa, kun poistumisaste on riittävä (esim. > 90 %) ja käytettävissä ovat nämä 15 arvoa, jotka edustavat joka päivä 3 viikon ajan tehtyjä analyyseja. Yleensä testin ei ole tarkoitus kestää yli 12:ta viikkoa testikemikaalin lisäämisen jälkeen.

49. Jos liete nitrifioituu ja jos testikemikaalin vaikutusta nitrifikaatioon halutaan tutkia, analysoi ammonia ja/tai nitriitti ja nitraatti testi- ja kontrolliyksiköiden poistoveden näytteistä vähintään kerran viikossa.

50. Kaikki analyysit on tehtävä mahdollisimman pian. Tämä koskee erityisesti typen määritystä. Jos analysointia on lykättävä, säilytä näytteitä täysissä ja tiiviisti suljetuissa pulloissa pimeässä tilassa, jonka lämpötila on noin 4 °C. Jos näytteitä on säilytettävä yli 48 h, säilytä ne pakastamalla, hapottamalla (esim. 10 ml/l rikkihappoliuosta, jonka pitoisuus on 400 g/l) tai lisäämällä soveltuvaa myrkyllistä ainetta (esim. 20 ml/l elohopea(II)kloridiliuosta, jonka pitoisuus on 10 g/l). Varmista, ettei säilömistapa vaikuta analyysin tuloksiin.

Testiyksiköiden yhdistäminen

51. Jos yksiköt yhdistetään pareiksi (lisäys 3), vaihda päivittäin sama määrä aktiivilietettä (150–1 500 ml, kun ilmastusastiassa on 3 litraa nestettä) testiyksikön ja sen kontrolliyksikön ilmastusastioiden välillä. Jos testikemikaali adsorboituu voimakkaasti lietteeseen, vaihda vain erottimien kelluva neste. Käytä kummassakin tapauksessa korjauskerrointa, kun lasket testituloksia (kohta 55).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

52. Laske testikemikaalin DOC- tai COD-poistumaprosentti jokaisen ajoitetun arvioinnin osalta käyttämällä kaavaa:

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

jossa

D_t = DOC- tai COD-poistumaprosentti aikana t

C_s = testikemikaalista johtuva DOC tai COD tulovedessä, mieluiten kantaliuoksesta arvioituna (mg/l)

E = testipoistovirrasta mitattu DOC- tai COD-arvo aikana t (mg/l)

E_o = kontrollipoistovirrasta mitattu DOC- tai COD-arvo aikana t (mg/l)

53. Orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumisaste kontrolliyksikössä auttaa arvioimaan aktiivilietteen biologista hajoamistoimintaa testin aikana. Laske poistumaprosentti seuraavan kaavan avulla:

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

jossa

D_B = kontrolliyksikön orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumaprosentti aikana t

C_M = DOC tai COD kontrollitulovirran orgaanisessa aineessa (mg/l)

Orgaanisen aineen ja testikemikaalin aiheuttaman DOC- tai COD-poistumaprosentin testiyksikössä voi halutta-essa laskea kaavalla:

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

jossa

D_T = testitulovirran DOC- tai COD-poistumaprosentti yhteensä

C_T = testitulovirran DOC tai COD yhteensä tai laskettuna kantaliuoksista (mg/l)

54. Laske testikemikaalin poistuma, jos se on mitattu ominaisanalyysillä jokaisella arviointikerralla, seuraavalla kaavalla:

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

jossa

D_{ST} = testikemikaalin primaarinen poistumaprosentti aikana t

S_i = testikemikaalin mitattu tai arvioitu pitoisuus testitulovirrassa (mg/l)

S_e = testikemikaalin mitattu pitoisuus testipoistovirrassa aikana t (mg/l)

55. Jos yksiköt oli yhdistetty, kompensoi lietteen vaihtamisen aiheuttama testikemikaalin laimentuminen ilmastusastiassa korjauskertoimella (katso lisäys 3). Jos hydraulisen retentioajan keskiarvo oli 6 h ja puolet ilmastusastian aktiivilietetilavuudesta vaihdettiin, määritetyt päivittäiset poistuma-arvot (D_t, kohta 52) on korjattava seuraavalla kaavalla, jotta saadaan testikemikaalin todellinen poistuma-aste, D_{tc}:

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

Testitulosten ilmaiseminen

56. Esitä poistumaprosentti D_t (tai D_{tc}) ja D_{st}, jos käytettävissä, graafisesti ajan funktiona (katso lisäys 2). Testikemikaalin (sellaisenaan tai COD:na) poistumakäyrän muodosta voidaan tehdä joitakin päätelmiä poistumaprosessista.

Adsorptio

57. Jos testikemikaalin DOC-poistuma on korkea testin alusta saakka, testikemikaali poistuu todennäköisesti adsorboitumalla aktiivilietteen kiintoainekseen. Tämän voi todistaa määrittämällä adsorboituneen testikemikaalin ominaisanalyysillä. Adsorboituvien kemikaalien DOC-poistuma ei yleensä pysy korkeana koko testin ajan. Tavallisesti poistumisaste on korkea aluksi ja laskee sitten hiljalleen tasapainoarvoon. Jos adsorboituva testikemikaali aiheutti kuitenkin tavalla tai toisella mikrobipopulaation adaptoitumista, testikemikaalin DOC-poistuma nousee myöhemmin ja saavuttaa korkean tasannearvon.

Lag-vaihe

58. Samoin kuin staattisissa seulontatesteissä, monet testikemikaalit vaativat lag-vaiheen eli latenssiajan, ennen kuin biologinen hajoaminen on täydellistä. Lag-vaiheen aikana hajoavat bakteerit sopeutuvat tai adaptoituvat eikä testikemikaalia poistu juuri lainkaan. Sen jälkeen alkaa näiden bakteerien alkukasvu. Tämä vaihe loppuu ja hajoamisvaiheen katsotaan alkavan, kun noin 10 prosenttia testikemikaalin alkuperäisestä määrästä on poistunut (adsorptio huomioiden, jos sitä tapahtuu). Lag-vaihe on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Tasannevaihe

59. Jatkuvassa testissä poistumakäyrän tasannevaihe on vaihe, jossa hajoaminen on maksimaalista. Tasannevaiheen on kestettävä vähintään 3 viikkoa, ja sen aikana on mitattava noin 15 kelvollista arvoa.

Testikemikaalin keskimääräinen poistumisaste

60. Laske testikemikaalin tasannevaiheen poistumisarvojen (D_t) keskiarvo. Kun se pyöristetään lähimpään kokonaislukuun (1 %), saadaan testikemikaalin poistumisaste. On myös suositeltavaa laskea keskiarvon 95 prosentin luottamusväli.

Orgaanisen aineen poistuminen

61. Esitä kontrolliyksikön orgaanisen aineen DOC- tai COD-poistumaprosentti (D_B) graafisesti ajan funktiona. Ilmoita poistumisasteen keskiarvo samoin kuin testikemikaalin osalta (kohta 60).

Viite biologisesta hajoamisesta

62. Jos testikemikaali ei adsorboidu merkittävästi aktiivilietteeseen ja poistumakäyrän muoto vastaa tyypillistä biologisen hajoamisen käyrää, jossa näkyvät lag-, hajoamis- ja tasannevaihe (kohdat 58 ja 59), mitattua poistumaa voidaan pitää biologisesta hajoamisesta johtuvana. Jos poistuminen on aluksi runsasta, simulaatiotutkimuksella ei voida erottaa biologisia ja abioottisia eliminaatioprosesseja. Jos näin käy tai jos biologisesta hajoamisesta on muuten epävarmuutta (esim. haihtumista tapahtuu), analysoi adsorboituneet testikemikaalit tai testaa biologista hajoavuutta tilastotieteellisillä lisätesteillä niiden parametrien perustella, jotka viittaavat selvästi biologisiin prosesseihin. Tällaisia testejä ovat hapen kulutuksen menetelmät (tämän liitteen luvut C.4 D, E ja F (6)), hiilidioksidin tuotannon mittaustesti (tämän liitteen luku C.4 C (6)) ja ISO Headspace -menetelmä (18) käyttämällä simulaatiotutkimuksessa altistunutta inokulaattia. Jos sekä DOC-poistuma että spesifisen kemikaalin poistuma on mitattu, poistumaprosenttien merkittävät erot (ensimmäinen on matalampi kuin jälkimmäinen) viittaavat siihen, että poistovedessä on orgaanisia välituotteita, jotka saattavat hajota heikommin kuin lähtökemikaali.

Testitulosten luotettavuus

63. Inokulaatin tavanomaisesta biohajoamiskäyttäytymisestä saadaan tietoa, jos orgaanisen aineen poistumisaste (kohta 53) kontrolliyksikössä määritetään. Testi on luotettava, jos DOC- tai COD-poistumisaste kontrolliyksikössä tai -yksiköissä on > 80 prosenttia kahden viikon kuluttua eikä epätavallisia havaintoja ole tehty.

64. Jos käytettiin helposti biohajoavaa vertailukemikaalia, biologisen hajoavuuden asteen (D_t, kohta 52) pitäisi olla yli 90 prosenttia.

65. Jos testi tehdään nitrifioivissa olosuhteissa, keskimääräisen ammoniumtypen pitoisuuden poistovesissä pitäisi olla < 1 mg/l ja nitriittitypen < 2 mg/l.

66. Jos nämä kriteerit (kohdat 63–65) eivät täyty, toista testi käyttämällä inokulaattia, joka on peräisin toisesta lähteestä, testaa vertailukemikaali ja tarkista kaikki kokeelliset menetelmät.

Testiraportti

67. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä.

Testiolosuhteet:

— testijärjestelmän tyyppi, mahdolliset haihtuvien ja liukenemattomien kemikaalien testausta varten tehdyt muutokset

— orgaanisen aineen tyyppi

— teollisuusjäteveden osuus jätevedestä ja sen ominaisuudet, jos tiedossa

— inokulaatti, ominaisuudet ja näytteenottopaikka tai -paikat, pitoisuus ja mahdollinen esikäsittely

— testikemikaalin kantaliuos: DOC- ja TOC-pitoisuus, valmistustapa, mahdollinen suspensio, käytetty testipitoisuus, syyt jos DOC ei ole alueella 10–20 mg/l, lisäystapa, ensimmäisen lisäyksen päivämäärä, mahdolliset muutokset

— lietteen keskimääräinen ikä ja keskimääräinen hydraulinen retentioaika, lietteen poistumatapa, tilavuuden kasvun estämistavat, lietteen häviäminen jne.

— käytetyt analyyttiset tekniikat

— testilämpötila

— lietteen tilavuuden kasvun ominaisuudet, lietteen tilavuusindeksi (SVI), kiinteiden aineiden osuus liuoksessa (MLSS)

— mahdolliset poikkeamat standardimenetelmistä ja olosuhteet, jotka ovat voineet vaikuttaa tuloksiin.

Testitulokset:

— kaikki mitatut tiedot (DOC, COD, ominaisanalyysit, pH, lämpötila, happipitoisuus, suspendoitunut kiintoaines, N-kemikaalit, mikäli aiheellista)

— kaikki lasketut D_t- (tai D_{tc}-), D_B- ja D_{St}-arvot taulukoituina sekä poistumakäyrät

— lag- ja tasannevaiheen tiedot, testin kesto, testikemikaalin ja kontrolliyksikön orgaanisen aineen poistumisaste sekä tilastotiedot ja lausumat biologisesta hajoavuudesta ja testin luotettavuudesta

— tulosten pohdinta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2. painos. Marcel Dekker Inc. New York, s. 1085.

2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No. 49: 698–706.

3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.

5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

6) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

7) Tämän liitteen luku C.12 Biologinen hajoaminen – modifioitu SCAS-testi.

8) Tämän liitteen luku C.19 Maa-aineksiin ja viemärilietteeseen sovellettavan adsorptiokertoimen (K_{OC}) määritys korkean suorituskyvyn nestekromatografialla.

9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.

10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.

11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s. 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

12) ISO 11733 (1995; tarkistettu 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium – activated sludge simulation test.

13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33–48.

14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.

15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.

16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. s. 91–98 ISBN 011 751661 9.

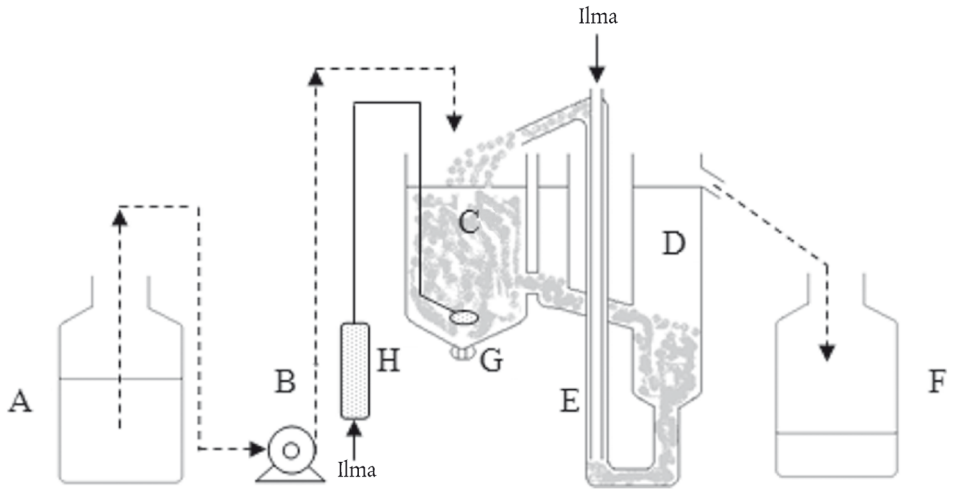
18) ISO 14593 (1998). Water Quality – Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

Lisäys 1

Kuva 1

Biologisen hajoamisen määrityslaitteisto

Husmannin yksikkö

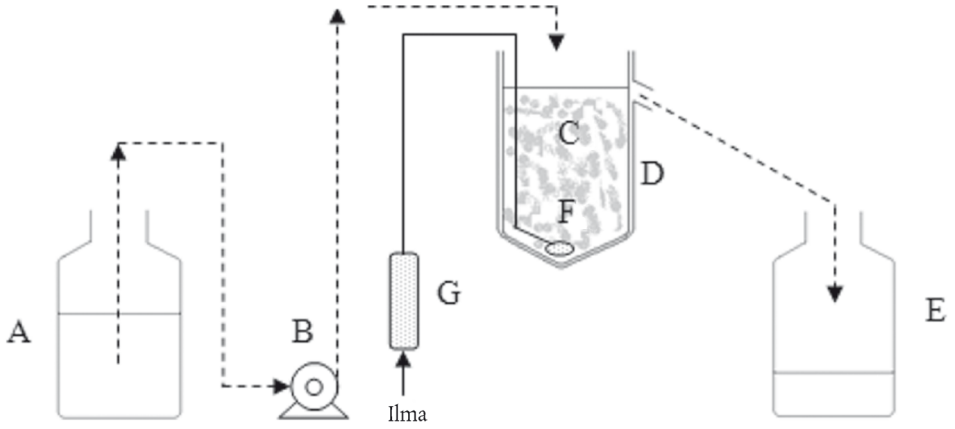


A. Säiliö
B. Annostelupumppu
C. Ilmastuskammio (3 l)
D. Selkeytysastia
E. Paineilmapumppu
F. Keräämisastia
G. Ilmastin
H. Ilmavirtausmittari

Kuva 2

Biologisen hajoamisen määrityslaitteisto

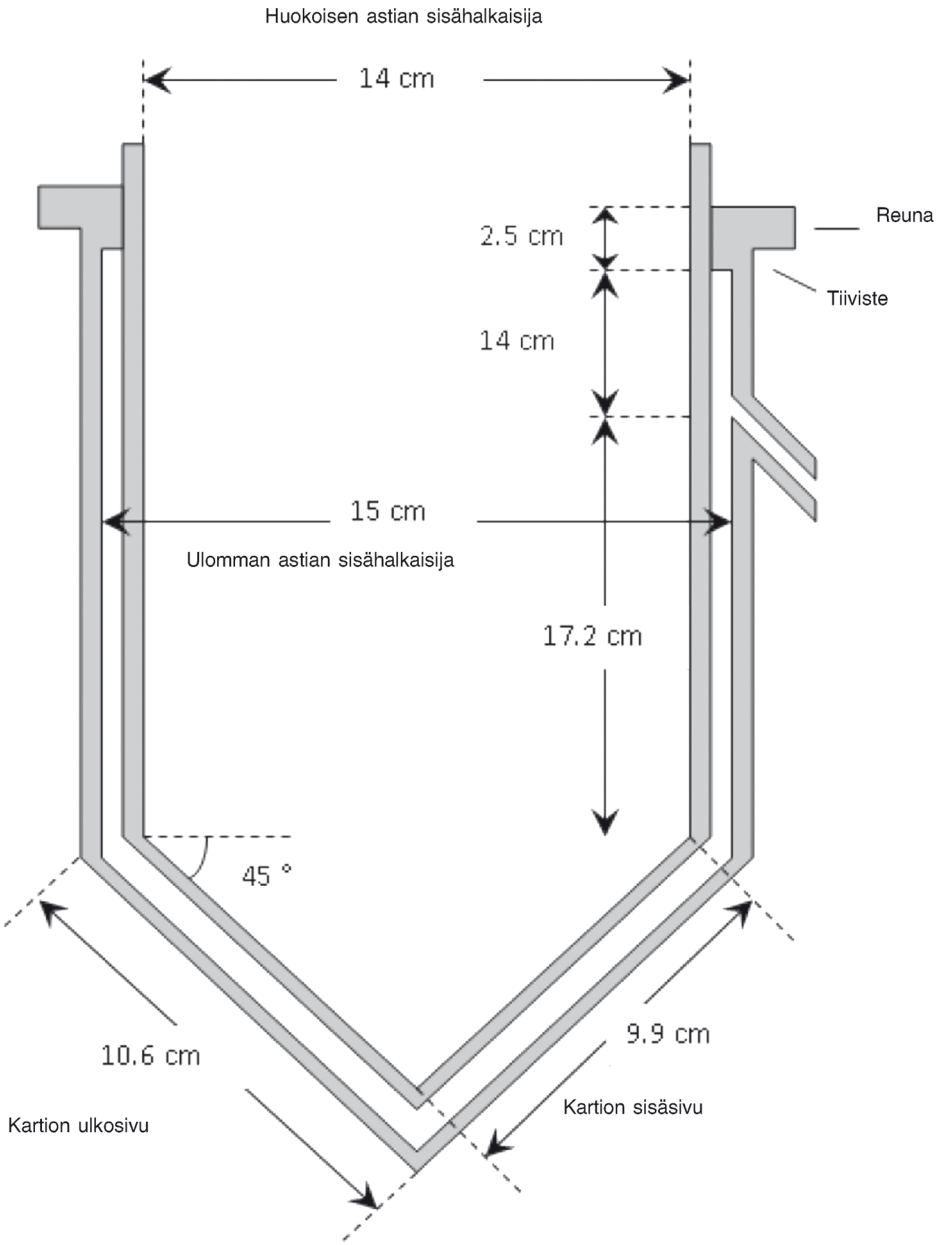
Huokoinen astia



A. Säiliö
B. Annostelupumppu
C. Huokoinen ilmastusastia
D. Ulompi läpäisemätön astia
E. Keräämisastia
F. Diffuusori
G. Ilmavirtausmittari

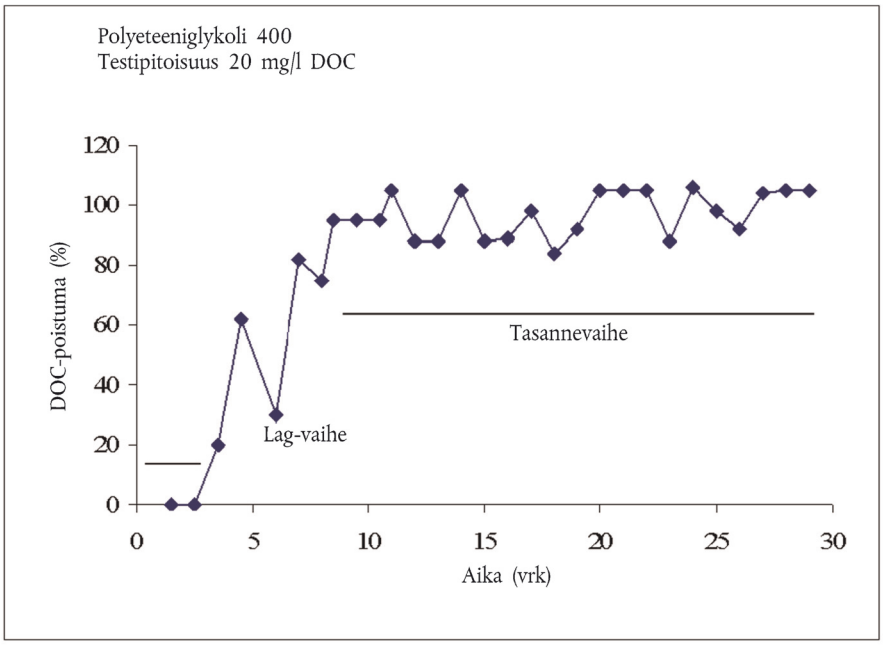
Kuva 3

Kolmen litran huokoisen ilmastusastian yksityiskohdat



Lisäys 2

Esimerkki poistumakäyrästä



Lisäys 3

[INFORMATIIVINEN]

TESTIYKSIKÖIDEN YHDISTÄMINEN

Koska pyrkimyksenä oli yhtäläistää lietteiden mikrobipopulaatiot testiyksikössä, johon tulee jätevettä ja testikemikaalia, sekä kontrolliyksikössä, johon tulee vain jätevettä, lietettä alettiin vaihtaa yksiköstä toiseen päivittäin (1). Tätä menetelmää kutsutaan yhdistämiseksi ja pareiksi yhdistetyiksi yksiköiksi. Yhdistämistä tehtiin alun perin Husmannin aktiivilieteyksiköissä, mutta sitä on tehty myös huokoisia astioita käytettäessä (2)(3). Yhdistämättömien ja yhdistettyjen yksiköiden tuloksissa ei havaittu suuria eroja niin Husmannin yksiköissä kuin huokoisissa astioissakaan, joten yksiköiden yhdistämiseen on turha käyttää aikaa ja nähdä vaivaa.

Kun lietettä vaihdetaan, poistuma voi vaikuttaa merkittävältä, sillä osa testikemikaalista siirretään ja testikemikaalin pitoisuudet testi- ja kontrollipoistovirrassa yhtäläistyvät. Siksi on käytettävä korjauskertoimia, jotka määräytyvät vaihdetun osuuden ja keskimääräisen hydraulisen retentioajan mukaan. Laskennasta on julkaistu lisätietoa (1).

Laske korjattu DOC- tai COD-poistumisaste seuraavalla kaavalla:

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

jossa

D_{tc} = korjattu DOC- tai COD-poistumaprosentti

D_t = määritetty DOC- tai COD-poistumaprosentti

a = vaihdettu osuus aktiivilieteyksiköiden tilavuudesta

r = hydraulisen retentioajan keskiarvo (h)

Jos esimerkiksi puolet ilmastussäiliön tilavuudesta vaihdetaan (a = 0,5) ja hydraulisen retentioajan keskiarvo on 6 h, korjauskaava on seuraava:

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

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.

2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. s. 113–138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

Lisäys 4

AKTIIVILIETTEEN INHIBITION ARVIOINTI

Käsittely testikemikaaleilla

1. On mahdollista, että kemikaali (tai jätevesi) ei hajoa tai poistu simulaatiotutkimuksessa, ja sillä saattaa jopa olla inhibitiovaikutus lietteen mikro-organismeihin. Toiset kemikaalit hajoavat biologisesti, kun pitoisuus on pieni, mutta ovat inhiboivia, kun pitoisuus on suuri (hormeesi). Inhibitiovaikutukset saattavat paljastua alkuvaiheessa tai ne voidaan määrittää toksisuustestillä, jossa käytetään samaa tai identtistä inokulaattia kuin simulaatiotutkimuksessa (1). Tällaisia menetelmiä ovat hapenkulutuksen estäminen (tämän liitteen luku C.11 (2) ja ISO 8192(3)) tai lietteen organismien kasvun estäminen (ISO 15522 (4)).

2. Simulaatiotutkimuksessa mahdolliset inhibitiovaikutukset ilmenevät siinä, että testiastian ja kontrolliastian poistoveden liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) tai kemiallisen hapenkulutuksen (COD) ero on suurempi kuin testikemikaalin mukana lisätty DOC. Toisin ilmaistuna käsiteltävän orgaanisen aineen DOC-poistumaprosentti (ja biokemiallinen hapentarve eli BOD, kemiallinen hapenkulutus eli COD ja/tai NH^+_4) laskee testikemikaalin vaikutuksesta. Jos näin käy, testi on toistettava siten, että testikemikaalin pitoisuutta lasketaan, kunnes saavutetaan taso, jossa inhibitiota ei tapahdu. Pitoisuutta voi olla hyvä laskea vielä lisää, kunnes testikemikaali hajoaa biologisesti. Jos testikemikaali (tai jätevesi) kuitenkin vaikuttaa prosessiin haitallisesti kaikilla testatuilla pitoisuuksilla, kemikaalia on luultavasti vaikeaa tai mahdotonta käsitellä biologisesti, mutta testi voi kuitenkin olla hyvä toistaa käyttämällä aktiivilietettä, joka on peräisin toisesta lähteestä, ja/tai totuttaa liete asteittaisesti.

3. Jos taas testikemikaali poistuu biologisesti simulaatiotutkimuksen ensimmäisessä yrityksessä, pitoisuutta on lisättävä, jos kemikaalin mahdollisen inhibitiovaikutuksen selvittäminen on tarpeen.

4. Kun inhibition astetta määritetään, on hyvä pitää mielessä, että aktiivilietteen populaatio voi muuttua, joten mikro-organismit saattavat kehittää ajan myötä toleranssin inhiboivalle kemikaalille.

5. Inhibitioasteen laskenta:

   Testi- ja kontrolliyksikön (BOD:n, DOC:n, COD:n jne.) kokonaispoistumaprosentti R_o, lasketaan seuraavasti:

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

   jossa:
   I = testi- tai kontrolliastian tuloveden BOD-, DOC-, COD-pitoisuus jne. (mg/l)
   E = vastaava pitoisuus poistovedessä (mg/l).

   I- ja E-arvot on korjattava siten, että testikemikaalista johtuva DOC testiyksikössä huomioidaan, sillä muuten saadaan väärä inhibitioprosentti.

   Testikemikaalin aiheuttaman inhibition aste lasketaan seuraavasti:

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

   jossa:
   R_c = poistumaprosentti kontrolliastioissa
   R_t = poistumaprosentti testiastioissa

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Reynolds L et al. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.
2) Tämän liitteen luku C.11 Biologinen hajoaminen – aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

3) ISO 8192 (2007) Water quality – Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

4) ISO 15522 (1999) Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

Lisäys 5

Heikosti veteen liukenevat testikemikaalit – haihtuvat kemikaalit

Heikosti veteen liukenevat kemikaalit

Heikosti veteen liukenevien ja liukenemattomien kemikaalien käytöstä jätevedenpuhdistusta simuloivissa testeissä on julkaistu vähän raportteja (1)(2)(3).

Ei ole yhtä testikemikaalin dispergointitapaa, joka soveltuisi kaikille liukenemattomille kemikaaleille. ISO 10634 -standardissa (4) kuvataan neljä tapaa, joista kaksi vaikuttaa soveltuvan testikemikaalien dispergointiin simulaatiotutkimusta varten: emulgointiaineiden käyttö ja/tai ultraäänienergia. Syntyvän dispersion stabiliteetti on määritettävä vähintään 24 tunnin ajalta. Sen jälkeen riittävän stabiloituneet dispersiot, joita sekoitetaan jatkuvasti säiliössä (kohta 38), annostellaan ilmastussäiliöön erillään kotitalousjätevedestä (tai synteettisestä jätevedestä).

Jos dispersiot ovat stabiileja, tutki, miten testikemikaali voidaan määrittää dispergoituneessa muodossa. DOC ei todennäköisesti sovellu tarkoitukseen, joten testikemikaalia varten on määritettävä spesifinen analyysimenetelmä, jota voidaan soveltaa poistoveteen, poistoveden kiintoainekseen ja aktiivilietteeseen. Sen jälkeen testikemikaalin kohtalo aktiivilieteprosessin simulaatiossa määritetään nestefaasissa ja kiinteässä faasissa. Näin saadaan massatase, jonka perusteella päätetään, onko testikemikaali hajonnut biologisesti. Tämä voi kuitenkin viitata vain primaariseen biohajoamiseen. Lopullinen biohajoaminen on pyrittävä osoittamaan soveltamalla nopean biologisen hajoavuuden respirometrista testiä (tämän liitteen luku C.4. C, F tai D (5)) ja käyttämällä inokulaattina lietettä, joka on altistunut testikemikaalille simulaatiotutkimuksessa.

Haihtuvat kemikaalit

Jätevedenpuhdistuksen simulaatioiden soveltaminen haihtuviin kemikaaleihin on kyseenalaista ja ongelmallista. Haihtuvien kemikaalien käytöstä simulaatiotutkimuksissa on julkaistu vain vähän raportteja, samoin kuin heikosti veteen liukenevista testikemikaaleistakin. Perinteinen täysin sekoittava laite mukautetaan tiivistämällä ilmastus- ja selkeytyssäiliöt, mittaamalla ja kontrolloimalla ilmavirtausta virtausmittareilla sekä keräämällä haihtuva orgaaninen aine kuljettamalla ulostuleva kaasu erottimien läpi. Joissakin tapauksissa käytetään tyhjiöpumppua, jolla ulostuleva kaasu ohjataan "kylmäerottimen" läpi tai erottimeen (purge trap), jossa on Tenaxia ja silikageeliä, kaasukromatografista analyysiä varten. Erottimessa oleva testikemikaali voidaan määrittää analyyttisesti.

Testi tehdään kahdessa osassa. Ensin yksiköitä käytetään ilman lietettä, mutta niissä on synteettistä jätevettä ja testikemikaalia, jota pumpataan ilmastussäiliöön. Kaasunäytteitä kerätään tulovedestä, poistovedestä ja ulostulevasta kaasusta, ja niitä analysoidaan parin päivän ajan. Kerättyjen tietojen perusteella voidaan laskea järjestelmästä haihtuneen testikemikaalin prosenttimäärä (R_{vs}).

Sen jälkeen tehdään normaali biologinen testi (lietteen kanssa) identtisissä olosuhteissa kuin haihtuvuustutkimus (stripping). DOC- tai COD-mittaukset tehdään myös, jotta nähdään, toimivatko yksiköt tehokkaasti. Ajoittaisilla analyyseillä määritetään testikemikaali tulovedessä, poistovedessä ja ulostulevassa kaasussa testin ensimmäisessä osiossa. Adaptoitumisen jälkeen analyysejä tehdään useammin. Tasapainotilassa saaduista tiedoista voidaan jälleen laskea testikemikaalin poistumaprosentti nestefaasista kaikilla prosesseilla (R_T) (fyysiset ja biologiset) sekä järjestelmästä haihtunut osuus (R_V).

Laskelma:

a) Ei-biologisessa testissä järjestelmästä haihtuneen testimateriaalin määrä prosentteina (R_{VP}) voidaan laskea seuraavasti:

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

jossa

R_{VP} = testikemikaalin poistuminen haihtumalla (%)

S_{VP} = erottimeen kerätty testikemikaali ilmaistuna vastaavana pitoisuutena nestefaasissa (mg/l)

S_{IP} = testikemikaalin pitoisuus tulovedessä (mg/l).

b) Biologisessa testissä järjestelmästä haihtuneen testimateriaalin määrä prosentteina (R_V) voidaan laskea seuraavasti:

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

jossa

R_V = testikemikaalin poistuminen haihtumalla biologisessa testissä (%)

S_V = erottimeen biologisessa testissä kerätty testikemikaali ilmaistuna vastaavana pitoisuutena nestemäisessä tulovirrassa (mg/l)

S_I = testikemikaalin pitoisuus tulovedessä (mg/l).

c) Biologisessa testissä kaikissa prosesseissa poistuneen testikemikaalin prosenttimäärä (R_T) saadaan seuraavasti:

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

jossa

S_E = testikemikaalin pitoisuus (nestemäisessä) poistovirrassa (mg/l).

d) Niinpä biohajoamisen ja adsorption poistama prosenttiosuus (R_{BA}) voidaan laskea seuraavasti.

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

Erillisillä testeillä on määritettävä, adsorboituuko testikemikaali. Jos adsorboituu, lisäkorjaus voi olla tarpeen.

e) Biologisesta (R_v) ja ei-biologisesta (R_{vp}) testijärjestelmästä haihtuneen testikemikaalin osuuden vertailu osoittaa, miten biologinen käsittely on vaikuttanut testikemikaalin päästöön ilmakehään.

Esimerkki: bentseeni

Lietteen retentioaika = 4 päivää

Synteettinen jätevesi, retentioaika = 8 h

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

Niinpä

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

R_T = 100 % ja R_{BA} = 85 %.

Bentseenin ei oletettu adsorboituneen lietteeseen.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.

2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4) ISO 10634 (1995) Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

5) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

Lisäys 6

Lietteen retentioajan (SRT) vaikutus kemikaalien käsiteltävyyteen

JOHDANTO

1. Päätekstissä kuvatun menetelmän tarkoitus on varmistaa, voivatko testatut kemikaalit (yleensä tunnetusti luontaisesti biohajoavia, mutta eivät helposti biohajoavia) hajota biologisesti jätevedenpuhdistamon asettamissa rajoissa. Tulokset ilmaistaan poistumaprosenttina ja biologisena hajoamisprosenttina. Aktiivilieteyksiköiden toimintaolosuhteet ja tuloveden valinta sallivat hyvin suuren vaihtelun testikemikaalin pitoisuudessa poistovedessä. Testit tehdään vain yhdellä lietteen kiintoaineksen nimellisellä pitoisuudella tai yhdellä nimellisellä lietteen retentioajalla (SRT), ja kuvatut lietteen poistumatavat voivat aiheuttaa SRT-arvon merkittävää vaihtelua testin kuluessa, sekä päivästä toiseen että päivän aikana.

2. Tässä muunnelmassa (1)(2) SRT:tä kontrolloidaan paljon tiukemmissa rajoissa jokaisen 24 tunnin jakson aikana (kuten suuressa mittakaavassakin tapahtuu), jolloin pitoisuus poistovesissä on paljon yhtenäisempi. Kotitalousjätevesi on suositeltavaa, koska sillä saadaan yhtenäisemmät ja korkeammat poistumaprosentit. Lisäksi tutkitaan useiden SRT-arvojen vaikutuksia, ja tarkemmassa tutkimuksessa voidaan määrittää eri lämpötilojen vaikutuksia pitoisuuteen poistovedessä.

3. Vielä ei ole yleistä yksimielisyyttä siitä, mitkä kineettiset mallit toimivat, kun kemikaalit hajoavat biologisesti jätevedenpuhdistuksessa vallitsevissa olosuhteissa. Kerättyihin tietoihin päätettiin soveltaa Monodin bakteerikasvun ja substraatin hyödyntämisen mallia (1)(2), sillä menetelmä oli tarkoitettu vain suurina tonnimäärinä tuotetuille kemikaaleille, jolloin pitoisuudet jätevedessä ovat yli 1 mg/l. Yksinkertaistetun mallin ja tehtyjen olettamusten luotettavuus määritettiin käyttämällä joukkoa alkoholietoksylaatteja, joiden primaarisen biohajoavuuden aste vaihteli (2)(3).

Huomautus: Tämä menetelmämuunnelma vasta suurta osaa kohdassa C.10-A kuvatun testimenetelmän tekstistä, ja tästä eteenpäin annetaan vain siitä poikkeavat tiedot.

TESTIN PERIAATE

4. Huokoisia aktiivilieteastioita, jotka on suunniteltu helpottamaan seoksen (melkein) jatkuvaa poistumaa ja jotka mahdollistavat lietteen retentioajan (SRT tai ϑ_s) hyvin tarkan seurannan, käytetään yhdistämättömässä tilassa useilla lietteen retentioajoilla ja valinnaisesti myös useissa lämpötiloissa. Retentioaika on yleensä 2–10 vuorokautta ja lämpötila 5–20 °C. Jätevesi, joka on mieluiten kotitalousjätevettä, ja testikemikaaliliuos annostellaan erikseen yksiköihin nopeudella, jolla saadaan tarvittava lietteen retentioaika (3–6 tuntia) ja testikemikaalin tarvittava pitoisuus tulovedessä. Kontrolliyksiköitä, joihin ei lisätä testikemikaalia, käytetään rinnakkain vertailua varten.

5. Muun tyyppisiä laitteita voidaan myös käyttää, mutta silloin on varmistettava huolellisesti, että SRT:n kontrollointi onnistuu hyvin. Jos käytetään esimerkiksi laitoksia, joissa on laskeutin, kiintoaineksen hävikki laitoksen poistoveden mukana voi olla tarpeen huomioida. Lisäksi on ryhdyttävä erityisiin varotoimiin, jotta laskeuttimessa olevan lietteen määrän vaihtelusta johtuvat virheet voidaan välttää.

6. Yksiköitä käytetään kaikissa valituissa olosuhteissa, ja kun tasapainotila on saavutettu, testikemikaalin keskimääräiset pitoisuudet poistovesissä tasapainotilassa ja valinnaisesti DOC määritetään noin 3 viikon pituisen jakson aikana. Testikemikaalin poistumaprosentin ja valinnaisesti DOC:n arvioinnin lisäksi ilmaistaan laitoksen toimintaolosuhteiden ja poistovirran pitoisuuden välinen suhde graafisessa muodossa. Tästä voidaan laskea alustavat kineettiset vakiot ja ennustaa olosuhteet, joissa testikemikaalia voidaan käsitellä.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

7. Luvun C.10 A kohdat 12 ja 13 pätevät.

KYNNYSARVOT

8. Luvun C.10 A kohdat 14 ja 15 pätevät.

VERTAILUTESTIKEMIKAALI

9. Luvun C.10 A kohta 16 pätee.

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

10. Luvun C.10 A kohdat 17 ja 18 pätevät.

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

11. Soveltuva laite on muunneltu huokoinen astia (lisäys 6.1). Siinä on huokoisesta polypropeenista valmistettu sisäastia (tai sisäkappale), jonka paksuus on 3,2 mm ja huokoskoko noin 90 µm ja jossa on puskuhitsausliitos. (Siksi se on tukevampi kuin tämän luvun C.10 A kohdassa 21 kuvattu yksikkö). Sisäastia asetetaan läpäisemättömään polyeteeniseen ulkoastiaan, jossa on kaksi osaa: pyöreä pohja, johon porataan reiät kahta ilmaletkua ja lietteenpoistoletkua varten, ja yläsylinteri, joka ruuvataan kiinni pohjaan ja jonka ulostulo on sijoitettu siten, että se antaa tunnetun tilavuuden (3 l) huokoiseen astiaan. Toisessa ilmaletkussa on diffuusorikivi. Toisen pää on avoin, ja se on sijoitettu kohtisuorassa astiassa olevaan kiveen. Tämä järjestelmä tuottaa tarvittavan turbulenssin, jotta astian sisältö sekoittuu täydellisesti, ja sillä saadaan liuenneen hapen pitoisuuksiksi yli 2 mg/l.

12. Soveltuva määrä yksiköitä pidetään kontrolloiduissa lämpötiloissa alueella 5–20 °C (± 1 °C) joko vesihauteessa tai huoneissa, joiden lämpötila on vakio. Tarvitaan pumput, joilla testikemikaali ja selkeytetty jätevesi voidaan annostella tarvittavalla nopeudella ilmastusastioihin (testikemikaali 0–1,0 ml/min ja jätevesi 0–25 ml/min), ja kolmas pumppu, jolla jäteliete poistetaan ilmastusastioista. Jotta jätelietteen virtausnopeus saadaan vaadittavalle hyvin alhaiselle tasolle, pumppuja käytetään suurella nopeudella ja jaksoittaisesti ajastimen avulla (esim. 10 sekuntia minuutissa ja pumpun tuotto 3 ml/min, jolloin poistumanopeudeksi saadaan 0,5 ml/min).

Suodatinlaite tai sentrifugi

13. Luvun C10 A kohta 23 pätee.

Analyysilaitteet

14. Luvun C.10 A kohta 24 pätee.

Vesi

15. Luvun C.10 A kohdat 25 ja 26 pätevät.

Orgaaninen aine

16. Luvun C.10 A kohta 27 pätee.

Synteettinen jätevesi

17. Luvun C.10 A kohta 28 pätee.

Kotitalousjätevesi

18. Luvun C.10 A kohta 29 pätee.

Aktiiviliete

19. Luvun C10 A kohta 30 pätee.

Testikemikaalin kantaliuokset

20. Luvun C.10 A kohdat 31 ja 32 pätevät.

MENETTELY

Inokulaatin valmistus

21. Vain luvun C.10 A kohta 34 pätee – käytä aktiivilietettä (noin 2,5 g/l).

Testiyksiköiden määrä

22. Yksinkertaisessa testissä, jolla mitataan esimerkiksi poistumaprosenttia, tarvitaan vain yksi SRT, mutta 4 tai 5 STR-arvoa on tarpeen, jotta saadaan alustavien kineettisten vakioiden laskemiseen tarvittavat tiedot. Valitut arvot ovat yleensä välillä 2–10 päivää. Käytännössä on kätevää tehdä testi samanaikaisesti neljällä tai viidellä SRT:llä yhdessä lämpötilassa. Laajoissa tutkimuksissa samoja SRT-arvoja tai ehkä eri arvoja käytetään muissa lämpötiloissa (5–20 °C).

Primaarisessa biohajoamisessa (pääkäyttö) tarvitaan yleensä vain yksi yksikkö yhtä olosuhdejoukkoa kohden. Lopullisessa biohajoamisessa tarvitaan kuitenkin kontrolliyksikkö jokaista olosuhdejoukkoa kohden. Kontrolliyksikköön lisätään jätevettä mutta ei testikemikaalia. Jos käytetyssä jätevedessä epäillään olevan testikemikaalia, kontrolliyksiköiden käyttö on tarpeen primaarisen biohajoamisen arvioinnissa ja laskelmiin on tehtävä tarvittavat korjaukset.

Orgaanisen aineen ja testikemikaalin annostelu

23. Luvun C.10 A kohdat 36 ja 39 pätevät, mutta huomioi, että testikemikaaliliuos annostellaan erikseen ja että käytössä on useita lietteen poistumanopeuksia. Seuraa tulo- ja poistoveden virtausnopeuksia sekä lietteen poistumaa säännöllisesti, esimerkiksi kahdesti päivässä, ja säädä ne tarvittaessa ± 10 prosentin sisään. Jos analyysimenetelmissä ilmenee ongelmia, kun käytetään kotitalousjätevettä, tee testi synteettisellä jätevedellä, mutta varmista, että eri aine antaa verrattavissa olevat kineettiset tiedot.

Aktiivilieteyksiköiden käsittely

24. Luvun C.10 A kohdat 40–43 pätevät, mutta kontrolloi SRT:tä vain lietteen ”jatkuvalla” poistumalla.

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

25. Luvun C.10 A kohdat 44–50 pätevät, paitsi että testikemikaalin pitoisuus on määritettävä ja valinnaisesti DOC. COD:ta ei käytetä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

26. Luvun C.10 A kohdat 52–54 pätevät.

Testitulosten ilmaiseminen

27. Luvun C.10 A kohdat 56–62 pätevät.

Kineettisten vakioiden laskenta

28. On realistisempaa antaa testikemikaalin keskimääräinen pitoisuus tasapainotilassa ja kuvata, miten se vaihtelee laitoksen toimintaolosuhteissa, kuin antaa primaarinen biohajoamisprosentti. Tämän voi tehdä tarkastelemalla lisäyksessä 6.2 annettua kaavaa (6), jolla saadaan K_S-, μ_m- ja ϑ_{SC}-arvot (kriittinen lietteen retentioaika).

(Vaihtoehtoisesti likimääräiset K_S- ja µm-arvot saadaan käyttämällä yksinkertaista tietokone-ohjelmaa, jolla kaavasta 2 (lisäys 6.2) laskettu teoreettinen kaava sovitetaan saatuihin kokeellisiin arvoihin. Vaikka mikään ratkaisu ei ole ainutlaatuinen, saadaan K_S- ja µm-arvot, jotka ovat kohtuullisen lähellä.)

Tulosten vaihtelevuus

29. On yleistä, että yksittäisille kemikaaleille saadaan erilaisia kineettisten parametrien arvoja. Arvellaan, että lietteen kasvuolosuhteilla sekä testissä vallitsevilla olosuhteilla (kuten kohdassa 5 ja muissa testeissä) on suuri vaikutus saatuihin arvoihin. Grady *et al* (4) ovat käsitelleet tätä vaihtelevuutta yhdestä näkökulmasta ja ehdottaneet, että termejä ”olemassa oleva” ja ”ominainen” pitäisi soveltaa kahteen ääriolosuhteeseen, jotka edustavat fysiologisen tilan ääripäitä, joita viljelmä voi saavuttaa kineettisen kokeen aikana. Jos tilan ei anneta muuttua testin aikana, kineettisten parametrien arvot heijastavat sen ympäristön olosuhteita, joista mikro-organismit on otettu. Näitä arvoja kutsutaan ”olemassa oleviksi”. Toisessa ääripäässä testin olosuhteet ovat sellaiset, että ne sallivat proteiinisynteesijärjestelmän täydellisen kehittymisen ja siten suurimman mahdollisen kasvunopeuden, saatuja kineettisiä parametreja kutsutaan ”ominaisiksi”, ja ne määräytyvät ainoastaan substraatin luonteen ja viljelmässä olevien bakteerien tyypin mukaan. Ohjenuorana on, että olemassa olevat arvot saadaan pitämällä substraatin pitoisuuden ja kompetenttien mikro-organismien välinen suhde (S_o/X_o) pienenä, esim. 0,025, ja ominaiset arvot saadaan, kun suhde on korkea eli vähintään 20. Kummassakin tapauksessa S_o-arvon pitää olla yhtä suuri tai suurempi kuin Ks-arvo (puolikyllästysvakio).

30. Vaihtelevuudesta ja muista biohajoavuuden kinetiikan näkökulmista keskusteltiin hiljattain pidetyssä SETAC-työpajassa (5). Raportoidut ja suunnitellut tutkimukset selventävät jätevedenpuhdistamojen kinetiikkaa, jotta olemassa olevat tiedot voidaan tulkita paremmin, ja niissä ehdotetaan paremmin soveltuvia suunnitelmia tulevia testimenetelmiä varten.

KIRJALLISUUSVIITTEET:

1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.

2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.

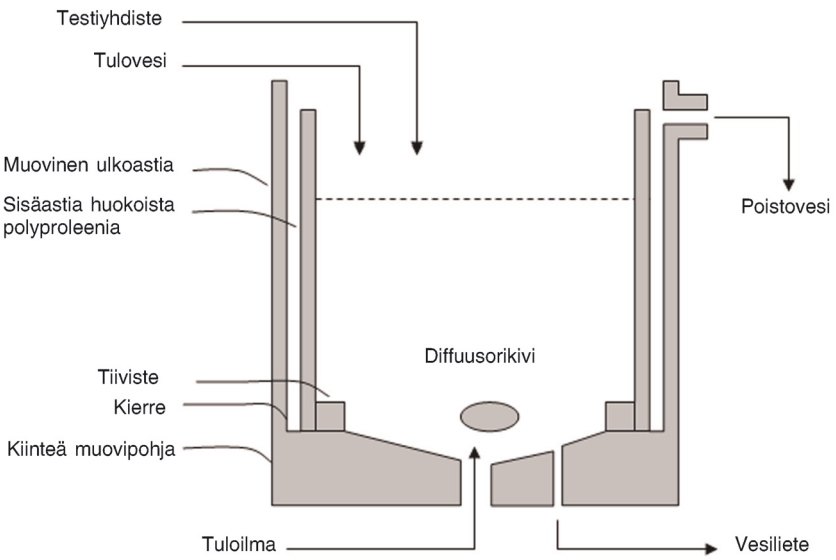
3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

Lisäys 6.1

Huokoinen astia, jossa SRT-kontrolli



Lisäys 6.2

Kineettisten vakioiden laskenta

1. Jos oletetaan, että Monodin kinetiikka pätee ja otetaan huomioon aktiivisen kiintoaineen ja substraatin massatase aktiivilietejärjestelmässä (1), saadaan seuraavat tasapainotilan lausekkeet:

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

tai

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

jossa

S_1 = substraatin pitoisuus poistovedessä (mg/l)

K_S = puolikyllästysvakio; pitoisuus, jossa $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = spesifinen kasvunopeus (d^{-1})

μ_m = μ_m:n enimmäisarvo (d^{-1})

K_d = aktiivisen kiintoaineen spesifinen hajoamisnopeus (d^{-1})

ϑ_S = lietteen retentioajan keskiarvo, SRT (d)

Tästä yhtälöstä voi tehdä seuraavat päätelmät:

i) Pitoisuus poistovedessä ei ole riippuvainen pitoisuudesta tulovedessä (S_0). Niinpä biohajoamisprosentti vaihtelee tuloveden pitoisuuden (S_0) mukaan.

ii) Ainoa laitoksen kontrolliparametri, joka vaikuttaa S_1-arvoon, on lietteen retentioaika (ϑ_S).

iii) Tietylle pitoisuudelle tulovedessä (S_0) on kriittinen lietteen retentioaika:

$$\frac{1}{\vartheta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

jossa

ϑ_{SC} = lietteen kriittinen retentioaika, jonka alla kompetentit mikro-organismit huuhtoutuvat laitoksesta.

iv) Koska yhtälön (2) muut parametrit liittyvät kasvukinetiikkaan, lämpötila vaikuttaa todennäköisesti poistoveden substraattitasoon ja lietteen kriittiseen ikään. Toisin sanoen tietynasteiseen käsittelyyn vaadittava lietteen retentioaika kasvaa, kun lämpötila laskee.

2. Kun otetaan huokoisten astioiden kiintoaineen massatase ja oletetaan, että kiintoaineen pitoisuus poistovedessä (X_2) on pienempi kuin ilmastusastiassa (X_1), lietteen retentioaika:

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

ja

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

jossa

V = ilmastusastian tilavuus (l)

X_1 = kiintoaineen pitoisuus ilmastusastiassa (mg/l)

X_2 = kiintoaineen pitoisuus poistovedessä (mg/l)

Q_0 = tuloveden virtausnopeus (l/d)

Q_1 = jätelietteen virtausnopeus (l/d)

Niinpä lietteen retentioaikaa voidaan kontrolloida missä tahansa ennalta valitussa arvossa kontrolloimalla jätelietteen virtausnopeutta Q_1.

Päätelmät

3. Tämän testin päätarkoitus on mahdollistaa pitoisuuden arviointi poistovedessä ja siten testikemikaalin määrä vesissä, joihin päästöt kohdistuvat.

4. Kun esitetään S_1, vs. ϑ_S, lietteen kriittisen retentioajan ϑ_{SC} arviointi voi olla helppoa (esim. käyrä 3 kuvassa 1). Jos tämä ei ole mahdollista, ϑ_{SC} sekä likimääräiset μ_m- ja K_S-arvot voidaa laskea esittämällä S_1, vs. $S_1 \bullet \vartheta_S$.

Järjestämällä yhtälö (1) uudelleen saadaan

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

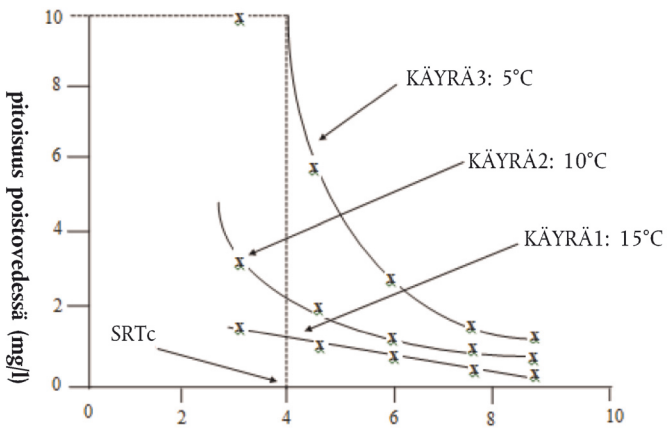
Jos K_d on pieni, $1 + \vartheta_s \bullet K_d \sim 1$ ja [5]:stä tulee:

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

Niinpä käyrän pitäisi olla suora viiva (katso kuva 2), jonka kaltevuus on $1/\mu_m$ ja joka leikkaa kuvaajan K_S/μ_m, myös $\vartheta_S \sim 1/\mu_m$.

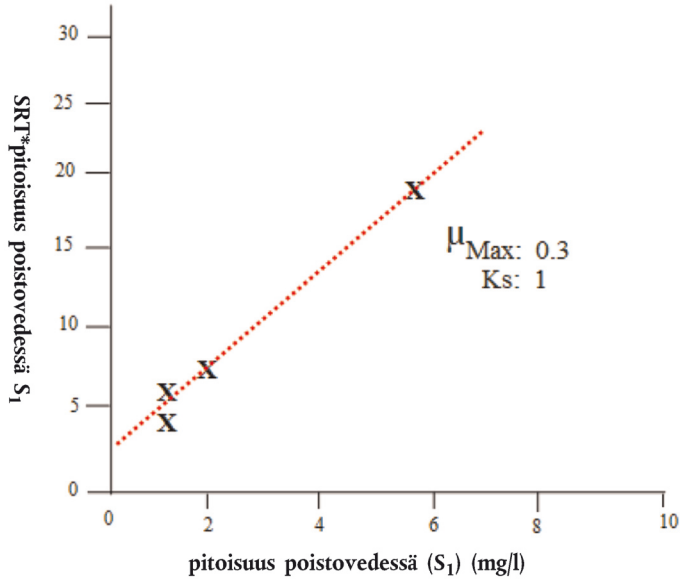
Kuva 1

Kolme lämpötilaa, viisi SRT-arvoa



Kuva 2

Regressiokuvaaja SRT S_1 vs. S_1, kun lämpötila on = 5 °C



Sanasto:
pitoisuus poistovedessä
käyrä

Lisäys 7

TESTAUS PIENELLÄ PITOISUUSALUEELLA (µg/l)

1. Monia kemikaaleja esiintyy vesiympäristössä ja jopa jätevedessä hyvin pieninä pitoisuuksina (µg/l). Näin pieninä pitoisuuksina ne eivät todennäköisesti toimi ensisijaisina substraatteina, jotka aiheuttavat kasvua, vaan hajoavat todennäköisemmin kasvua aiheuttamattomina toissijaisina substraatteina samaan aikaan kuin joukko luonnossa esiintyviä hiilikemikaaleja. Siksi tällaisten kemikaalien hajoaminen ei sovi lisäyksessä 6 kuvattuun malliin. On olemassa monia soveltuvia malleja, ja jätevedenpuhdistamoissa vallitsevissa olosuhteissa usea malli saattaa toimia samanaikaisesti. Tämän ongelman ratkaisemiseksi tarvitaan paljon lisää tutkimusta.

2. Sillä välin voidaan noudattaa päätekstissä kuvattua menetelmää (luku C.10 A), mutta ainoastaan primaarisen biohajoamisen osalta, kun käytetään soveltuvan pieniä pitoisuuksia (< 100 µg/l) ja validoitua analyyttistä menetelmää. Biohajoamisprosentti voidaan laskea (katso testimenetelmän kohta 54), kun abioottiset prosessit (adsorptio, haihtuvuus jne.) otetaan huomioon. Esimerkkinä tästä on Nyholmin ja kumppaneiden tutkimus (1)(2), jossa käytettiin 4 tunnin jaksoa täyttö- ja poistojärjestelmässä. He ilmoittivat pseudo-ensimmäisen kertaluvun vakiot viidelle kemikaalille, joita lisättiin synteettiseen jäteveteen pitoisuudella 5–100 µg/l. (Lopulliseen biohajoamiseen voidaan käyttää ^{14}C-leimattuja testikemikaaleja. Tämän kuvaus ei kuulu tämän testimenetelmän alaan, sillä menetelmistä ei ole vielä sovittu, joskin ISO 14592 -standardissa (3) ehdotetussa menetelmässä on ohjeita ^{14}C-leimattujen kemikaalien käytöstä.

SCAS-testi

3. Myöhemmin ehdotettiin yksinkertaisempaa kaksivaiheista testiä (4)(5)(6). Puolijatkuvan aktiivilietteen (SCAS) menetelmän jälkeen SCAS-yksiköistä otetuille näytteille tehdään lyhytaikaisia kineettisiä testejä. SCAS-järjestelmää käytetään tunnetuilla lietteen poistumanopeuksilla (toisin kuin alkuperäisessä C.12-testimenetelmässä), ja siihen syötetään OECD:n synteettistä jätevettä tai kotitalousjätevettä. Synteettistä jätevettä muutettiin (koska pH-arvo muuttui ja liete selkeytyi heikosti) lisäämällä siihen fosfaattia puskurina, hiivauutetta, rauta(III)kloridia ja hivenainesuoloja, ja COD nostettiin noin arvoon 750 mg/l lisäämällä peptonin ja lihauutteen pitoisuutta. Yksiköt toimivat 24 tunnin jaksoissa: ilmastus 23 h, lietteen poistuma, selkeyttäminen, kelluvan nesteen (poistoveden) poisto ja sen jälkeen synteettisen jäteveden ja testikemikaalin lisäys, enintään 100 µg/l, (eli suunnilleen sama pitoisuus kuin lyhytaikaisessa testissä). Kerran viikossa 10 prosenttia lietteen kokonaismäärästä korvattiin tuoreella lietteellä, jotta mikrobipopulaatio pysyy tasapainossa.

4. Testikemikaalin pitoisuudet mitataan testin alussa ja ilmastuksen lopussa, ja testiä jatketaan, kunnes saavutetaan testikemikaalin vakiopoistuma. Tässä kestää yhdestä viikosta useaan kuukauteen.

Lyhytaikainen testi

5. Lyhyellä testillä (esim. 8 tuntia) määritetään testikemikaalin hajoamisen (pseudo)-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan nopeusvakio aktiivilietteessä, jolla on tunnettu mutta eri alkuperä ja historia. Erityisesti lietenäytteitä otetaan SCAS-reaktoreista – ilmastusjakson lopussa, kun orgaanisen substraatin pitoisuus on pieni – adaptaatiokokeen (kohdat 3, 4) aikana. Lietettä voidaan ottaa vertailutarkoituksessa myös rinnakkaisesta SCAS-yksiköstä, jota ei altisteta testikemikaalille. Lietteen ja testikemikaalin seokset, joita lisätään vähintään kahdella pitoisuudella alueella 1–50 µg/l, ilmastetaan lisäämättä synteettistä jätevettä tai muuta orgaanista substraattia. Liuoksessa jäljellä oleva testikemikaali määritetään säännöllisin välein kemikaalin hajoavuuden mukaan, esimerkiksi kerran tunnissa, jaksona, jonka pituus ei saa olla yli 24 h. Näytteet sentrifugoidaan ennen asianmukaista analyysiä.

Laskelmat

6. SCAS-yksiköiden tietojen perusteella lasketaan testikemikaalin poistumaprosentti (kohta 54). Lisäksi voidaan laskea keskimääräinen nopeusvakio K_1 (kiintoaineiden pitoisuuden suhteen normalisoitu) seuraavasti:

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

jossa

t = ilmastusaika (23 h)

C_e = pitoisuus ilmastusjakson lopussa (µg/l)

C_i = pitoisuus ilmastusjakson alussa (µg/l)

SS = aktiivilietteen kiintoaineen pitoisuus (g/l)

7. Lyhytaikaisessa testissä jäljellä oleva log%-pitoisuus esitetään käyränä suhteessa aikaan, ja käyrän ensimmäisen osan (hajoaminen 10–50 prosenttia) kulmakerroin vastaa (pseudo)-ensimmäisen kertaluvun kinetiikan vakiota K_1. Vakio normalisoidaan suhteessa lietteen kiintoaineen pitoisuuteen jakamalla kulmakertoimet kiinteiden aineiden pitoisuudella. Raportoidun tuloksen täytyy sisältää myös tiedot testikemikaalin ja kiintoaineen alkuperäisistä pitoisuuksista, lietteen retentioajasta, lietteen lisäyksestä ja lähteestä sekä mahdollisesta aiemmasta altistuksesta testikemikaalille.

Tulosten vaihtelevuus

8. Vaihtelevuudesta ja muista biohajoavuuden kinetiikan näkökulmista keskusteltiin hiljattain pidetyssä SETAC-työpajassa (7). Raportoidut ja suunnitellut tutkimukset selventävät jätevedenpuhdistamojen kinetiikkaa, jotta olemassa olevat tiedot voidaan tulkita paremmin, ja niissä ehdotetaan paremmin soveltuvia suunnitelmia tulevia testimenetelmiä varten.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.

2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.

3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998). Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851–864.

5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711–735.

6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

C.10-B: Biokalvot

JOHDANTO

1. Simulaatiotutkimuksia tehdään tavallisesti kemikaaleille, jotka eivät ole läpäisseet biohajoavuuden seulontatestiä (tämän liitteen luvun C.4 kohta A–F (9)), mutta ovat läpäisseet luontaisen biohajoavuuden testin. Poikkeustilanteissa simulaatiotutkimuksia voidaan tehdä myös mille tahansa kemikaalille, josta tarvitaan lisää tietoa, ja etenkin suurina tonnimäärinä tuotetuille kemikaaleille. Tällöin sovelletaan tavallisesti aktiivilietetestiä (C.10 A). Joissakin tapauksissa tarvitaan kuitenkin spesifistä tietoa siitä, miten kemikaali käyttäytyy jätevedenpuhdistusmenetelmissä, joissa käytetään biokalvoja (biosuodatus eli tihkusuodatus, biorotaattorit ja leijukerros). Tätä tarkoitusta varten on kehitetty useita erilaisia laitteita.

2. Gerike *et al.* (1) käyttivät suuria, pilottimittakaavaisia biologisia suodattimia, jotka yhdistettiin toisiinsa. Nämä suodattimet veivät paljon tilaa ja vaativat suhteellisen suuria määriä jätevettä tai synteettistä jätevettä. Truesdale *et al.* (2) kuvasivat pienempiä suodattimia (halkaisija 1,8 m × 15,2 cm), joihin syötettiin luonnollista jätevettä, jossa ei ollut pinta-aktiivista ainetta, mutta tarvittavat tilavuudet olivat edelleen melko suuria. Biokalvon "kypsymiseen" kului jopa 14 viikkoa, ja testiaineena käytetyn pinta-aktiivisen aineen ensimmäisen lisäyksen jälkeen kesti vielä 4–8 viikkoa, ennen kuin mukautuminen tapahtui.

3. Baumann *et al.* (3) kehittivät huomattavasti pienemmän suodattimen, jossa biokalvoa tukevana inerttinä aineena käytettiin "polyesterifleeceä", jota oli liotettu aiemmin aktiivilietteessä. Testikemikaalia käytettiin ainoana hiilen lähteenä, ja biohajoavuutta arvioitiin mittaamalla liuennut orgaaninen hiili (DOC) tulo- ja poistovedessä sekä ulostulevan kaasun CO_2-määrän perusteella.

4. Gloyna *et al.* (4) käyttivät hyvin erilaista lähestymistapaa. He keksivät pyörivän putkireaktorin. Pyörivän putken sisäpintaan kasvatettiin biokalvo tunnetulle pinta-alalle syöttämällä tulovettä putken yläpäästä, kun putki oli kallistettu pieneen vaakasuuntaiseen kulmaan. Reaktoria on käytetty pinta-aktiivisten aineiden biohajoavuuden tutkimiseen (5) sekä biokalvon optimaalisen paksuuden ja kalvon läpi tapahtuvan diffuusion tutkimiseen (6). Jälkimmäisenä mainitut tekijät jatkokehittivät reaktoria muokkaamalla sitä mm. siten, että ulostulevasta kaasusta voidaan määrittää CO_2.

5. Yhdistyneen kuningaskunnan SCA (Standing Committee of Analysts) on hyväksynyt pyörivän putkireaktorin kemikaalien biohajoavuuden (7) sekä jätevesien käsiteltävyyden ja toksisuuden (8) määrittämisen vakiomenetelmäksi. Tässä kuvatun menetelmän etuja ovat yksinkertaisuus, pieni koko, toistettavuus ja orgaanisen aineen suhteellisen pienet tilavuudet.

TESTIN PERIAATE

6. Synteettistä jätevettä tai kotitalousjätevettä sekä testikemikaalia lisätään sekoitettuna tai erikseen hitaasti pyörivän, kallistetun putken sisäpinnalle. Sisäpintaan kasvaa biosuodatusaineessa esiintyviä mikro-organismeja vastaava mikro-organismikerros. Reaktorin toimintaolosuhteet valitaan siten, että orgaanisen aineen poistuminen ja tarvittaessa ammoniumin hapettuminen on riittävää.

7. Putken poistovesi kerätään ja laskeutetaan ja/tai suodatetaan, ennen kuin liuennut orgaaninen hiili (DOC) ja/tai testikemikaali analysoidaan spesifisellä menetelmällä. Kontrolliyksiköitä, joihin ei lisätä testikemikaalia, käytetään rinnakkain samoissa olosuhteissa vertailua varten. Poistoveden DOC-pitoisuuksien erot testi- ja kontrolliyksikössä johtuvat oletettavasti testikemikaalista ja sen orgaanisista metaboliiteista. Tätä eroa verrataan lisätyn kemikaalin pitoisuuteen (DOC:na), jotta voidaan laskea testikemikaalin poistuma.

8. Biohajoaminen voidaan tavallisesti erottaa biosorptiosta tarkastelemalla poistuma-aikakäyrää huolellisesti. Tulos voidaan yleensä vahvistaa biohajoavuuden testillä (hapenkulutus tai hiilidioksidin tuotanto), jossa käytetään sopeutunutta inokulaattia, joka on otettu testin loputtua reaktoreista, joihin testikemikaalia lisättiin.

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

9. Testikemikaalin puhtauden, vesiliukoisuuden sekä haihtuvuus- ja adsorptio-ominaisuuksien on oltava tiedossa, jotta tulokset voidaan tulkita oikein.

10. Haihtuvia ja heikosti liukenevia kemikaaleja ei tavallisesti voida testata ilman erityisiä varotoimia (katso luvun C.10 A lisäys 5). Kemiallisen rakenteen tai vähintään empiirisen kaavan on oltava tiedossa, jotta voidaan laskea teoreettiset arvot ja/tai tarkistaa mitatut parametriarvot, kuten teoreettinen hapenkulutus (ThOD) ja DOC.

11. Tieto testikemikaalin toksisuudesta mikro-organismeille (katso luvun C.10 A lisäys 4) voi olla hyödyllinen soveltuvia testipitoisuuksia valittaessa ja olennainen matalien biohajoavuusarvojen oikean tulkinnan kannalta.

KYNNYSARVOT

12. Alun perin pinta-aktiivisten aineiden primaarisen biohajoamisen täytyi olla vähintään 80 prosenttia, jotta kemikaalia voitiin markkinoida. Jos 80 prosentin arvoa ei saavuteta, tätä simulaatiotutkimusta (toteamiskoetta) voidaan soveltaa ja pinta-aktiivista ainetta voidaan markkinoida vain, jos yli 90 prosenttia spesifisestä kemikaalista poistuu. Yleensä ei ole epäselvää, läpäisevätkö kemikaalit testin, ja poistumaprosenttia voidaan käyttää laskettaessa todennäköistä pitoisuutta ympäristössä, jota käytetään kemikaalin vaarallisuuden arvioinnissa. Useissa puhtaiden kemikaalien tutkimuksissa DOC:n poistumaprosentti oli yli 90 prosenttia yli kolmessa neljäsosassa tapauksista ja yli 80 prosenttia yli 90 prosentissa kemikaaleista, joissa ilmeni merkittävää biohajoavuutta.

VERTAILUKEMIKAALIT

13. Jotta voidaan varmistaa, että kokeellinen menetelmä suoritetaan oikein, on hyvä testata välillä kemikaaleja, joiden käyttäytyminen on tiedossa. Tällaisia kemikaaleja ovat esimerkiksi adipiinihappo, 2-fenyylifenoli, 1-naftoli, difeenihappo ja 1-naftoehappo.

TESTITULOSTEN TOISTETTAVUUS

14. Yhdistyneen kuningaskunnan laboratorion mukaan suhteellinen keskihajonta oli testien sisällä 3,5 prosenttia ja testien välillä 5 prosenttia (7).

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

Pyörivät putkireaktorit

15. Laite (lisäyksen 8 kuvat 1 ja 2) koostuu akryyliputkikehikosta. Jokaisen putken pituus on 30,5 cm ja sisähalkaisija 5 cm, ja niitä kannattavat metallitukikehikossa olevat kumireunustetut pyörät. Jokaisessa putkessa on asennusreuna, jonka syvyys on noin 0,5 cm, jotta se pysyy pyörillä. Sisäpinta on karhennettu karkealla

teräsvillalla, ja yläpäässä (syöttöpäässä) on 0,5 senttiä syvä sisäreuna, joka pitää nesteen sisällä. Putket on kallistettu vaakasuuntaisesti noin yhden asteen kulmaan, jotta vaadittu kontaktiaika saavutetaan, kun testiainetta lisätään puhtaaseen putkeen. Kumipyöriä pyöritetään hitaalla, muuttuvanopeuksisella moottorilla. Putkien lämpötilaa kontrolloidaan asentamalla ne lämpötilasäädettyyn huoneeseen.

16. Kun jokainen putkireaktori suljetaan hieman suurempaan suljettuun putkeen ja varmistetaan, että liitokset ovat kaasutiiviitä, ulostuleva CO_2-kaasu voidaan kerätä emäksiseen liuokseen myöhempää mittausta varten (6).

17. Jokaisesta putkesta kerätään 24 tunnin tuotos orgaanista ainetta ja mahdollisesti lisättyä testikemikaalia 20 l:n säilytysastiaan (A) (katso kuva 2). Testikemikaaliliuos voidaan tarvittaessa annostella erikseen. Lähellä jokaisen säilytysastian pohjaa on ulostulo, joka on yhdistetty soveltuvalla letkulla (esim. silikonikumisella) peristalttisen pumpun (B) kautta lasiseen tai akryyliseen syöttöputkeen, joka tulee 2–4 cm kallistetun putken (C) ylemmän pään (syöttöpään) sisään. Poistoveden annetaan tippua kallistetun putken alapäästä, josta se kerätään toiseen säilytysastiaan (D). Poistovesi selkeytetään tai suodatetaan ennen analyysiä.

Suodatinlaite-sentrifugi

18. Näytteiden suodattamiseen käytettävä kalvosuodatin, jonka huokoskoko on sopiva (aukon nimellishalkaisija 0,45 µm) ja joka adsorboi orgaanisia kemikaaleja tai vapauttaa mahdollisimman vähän orgaanista hiiltä. Jos käytettävät suodattimet vapauttavat orgaanista hiiltä, poista orgaaninen hiili pesemällä suodattimet huolellisesti kuumalla vedellä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää sentrifugia, jolla voidaan saavuttaa 40 000 m/s^2:n kiihtyvyys.

19. Analyysilaitteet seuraavia määrityksiä varten:

— DOC / orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) tai kemiallinen hapenkulutus (COD)

— spesifinen kemikaali (HPLC, GC jne.) tarvittaessa

— pH, lämpötila, happamuus ja emäksisyys

— ammonium, nitriitti ja nitraatti, jos testit tehdään nitrifioivissa olosuhteissa.

Vesi

20. Vesijohtovesi, jossa DOC:tä on alle 3 mg/l.

21. Tislattu tai deionisoitu vesi, jossa DOC:tä on alle 2 mg/l.

Orgaaninen aine

22. Orgaanisena aineena voidaan käyttää synteettistä jätevettä, kotitalousjätevettä tai näiden yhdistelmää. On osoitettu, että pelkän kotitalousjäteveden käyttö nostaa usein DOC:n poistumaprosenttia (aktiivilieteyksiköissä) ja sallii jopa sellaisten kemikaalien biologisen hajoamisen, jotka eivät hajoa biologisesti käytettäessä OECD:n synteettistä jätevettä. Niinpä kotitalousjäteveden käyttö on suositeltavaa. Mittaa jokaisen uuden orgaanisen aine-erän DOC-pitoisuus (tai COD-pitoisuus). Orgaanisen aineen happamuuden tai emäksisyyden täytyy olla tiedossa. Orgaaniseen aineeseen voi olla tarpeen lisätä soveltuvaa puskuria (natriumvetykarbonaattia tai kaliumvetyfosfaattia), jos happamuus tai emäksisyys on matala, jotta pH on 7,5 ± 0,5 reaktorissa testin aikana. Lisättävän puskurin määrä ja lisäämisen ajankohta on päätettävä tapauskohtaisesti.

Synteettinen jätevesi

23. Liuota yhteen litraan vesijohtovettä: 160 mg peptonia, 110 mg lihauutetta, 30 mg ureaa, 28 mg vedetöntä dikaliumvetyfosfaattia (K_2HPO_4), 7 mg natriumkloridia (NaCl), 4 mg kalsiumkloridihydraattia ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg magnesiumsulfaattiheptahydraattia ($MgSO_4.7H_2O$). Tämä OECD:n synteettinen jätevesi on esimerkki, ja siinä tulovirtauksen DOC-pitoisuuden keskiarvo on noin 100 mg/l. Vaihtoehtoisesti voi käyttää muita koostumuksia, joiden DOC-pitoisuus on suunnilleen sama ja jotka ovat lähempänä oikeaa jätevettä. Tätä synteettistä jätevettä voidaan valmistaa tislattuun veteen väkevöidyssä muodossa. Se säilyy viikon noin 1 °C:n lämpötilassa. Laimenna tarvittaessa vesijohtovedellä. (Tämä aine ei ole tyydyttävä, sillä esimerkiksi typpipitoisuus on hyvin korkea ja hiilipitoisuus suhteellisen matala, mutta parempia ehdotuksia ei ole tehty, lukuun ottamatta fosfaatin lisäämistä puskurina ja peptonin lisäämistä).

Kotitalousjätevesi

24. Käytä tuoretta selkeytettyä jätevettä, jota kerätään päivittäin puhdistamosta, johon tulee pääasiassa kotitalousjätevettä. Jätevesi kerätään primaarisen sedimentaatioaltaan ylivuotokanavasta tai aktiivilietelaitoksen syötöstä, eikä siinä saa juurikaan olla karkeita hiukkasia. Jätevettä voidaan käyttää, kun sitä on säilytetty usea päivä noin 4 °C:n lämpötilassa, jos voidaan todistaa, että DOC (tai COD) ei ole laskenut merkittävästi (alle 20 %) säilytyksen aikana. Jotta järjestelmän häiriöt voidaan välttää, jokaisen uuden erän DOC (tai COD) on säädettävä soveltuvaan vakioarvoon esimerkiksi vesijohtovedellä laimentamalla.

Voiteluaine

25. Peristalttisen pumpun rullat voidaan voidella glyserolilla tai oliiviöljyllä. Kumpikin aine sopii silikonikumisiin letkuihin.

Testikemikaalin kantaliuokset

26. Jos kemikaalin liukoisuus on riittävä, valmista kantaliuokset, joiden pitoisuus on soveltuva (esim. 1–5 g/l), deionisoituun veteen tai synteettisen jäteveden mineraaleihin. Tietoa liukenemattomista kemikaaleista on luvun C.10-A lisäyksessä 5. Tämä menetelmä soveltuu haihtuville kemikaaleille ilman, että putkireaktoreihin tarvitsee tehdä muutoksia (kohta 16). Määritä kantaliuoksen DOC ja TOC ja toista mittaukset jokaiselle uudelle erälle. Jos DOC- ja TOC-arvon välinen ero on yli 20 prosenttia, tarkista testikemikaalin vesiliukoisuus. Varmista, että saanto on riittävän hyvä (tavallisesti > 90 prosenttia on odotettavissa), vertaamalla nimellisarvoon DOC-arvoa tai testikemikaalin pitoisuutta, joka on mitattu kantaliuoksen ominaisanalyysilla. Varmista etenkin dispersioiden osalta, voidaanko DOC-arvoa käyttää analyyttisenä parametrina vai voidaanko käyttää ainoastaan testikemikaalikohtaista analyysimenetelmää. Näytteet on sentrifugoitava, jos kyseessä on dispersio. Mittaa jokaisen uuden erän DOC, COD tai testikemikaali ominaisanalyysilla.

27. Määritä kantaliuoksen pH. Äärimmäiset arvot viittaavat siihen, että kemikaalin lisääminen saattaa vaikuttaa testijärjestelmän aktiivilietteen pH-arvoon. Jos näin käy, neutraloi kantaliuos pienillä määrillä epäorgaanista happoa tai emästä, kunnes pH on 7 ± 0,5, mutta vältä testikemikaalin saostumista.

MENETTELY

Orgaanisen aineen valmistelu annostusta varten

28. Varmista, ettei tulo- ja poistoveden säiliössä tai tuloveden säiliöistä tulevissa ja poistoveden säiliöön johtavissa putkissa ole mikrobikasvustoja puhdistamalla ne huolellisesti ennen testiä ja testin aikana.

29. Valmista tuoretta synteettistä jätevettä (kohta 23) päivittäin joko kiintoaineesta tai väkevöidystä kantaliuoksesta laimentamalla sitä sopivassa suhteessa vesijohtovedellä. Mittaa tarvittava määrä sylinteriin ja lisää se puhtaaseen tuloveden säiliöön. Jos tarpeen, lisää synteettiseen jäteveteen tarvittava määrä testikemikaalin tai vertailukemikaalin kantaliuosta ennen laimentamista. Jos testikemikaalin häviötä on käytännöllistä tai tarpeellista välttää, valmista erillinen laimennettu testikemikaaliliuos erillisessä säiliössä ja syötä se kallistettuihin putkiin erillisellä annostelupumpulla.

30. Vaihtoehtoisesti (ja mieluiten) voidaan käyttää selkeytettyä kotitalousjätevettä (kohta 24), joka kerätään päivittäin tuoreena, jos mahdollista.

Pyörivien putkireaktoreiden toiminta

31. Yhden testikemikaalin arviointiin tarvitaan kaksi identtistä putkireaktoria, ja ne kootaan huoneessa, jonka lämpötilaa säädellään (tavallisesti 22 ± 2 °C).

32. Säädä peristalttinen pumppu pumppaamaan orgaanista ainetta (ilman testikemikaalia) nopeudella 250 ± 25 ml/h kallistettuihin putkiin, joita pyöritetään nopeudella 18 ± 2 rpm. Voitele pumpun putket aluksi voiteluaineella (kohta 25) ja toista voitelu säännöllisesti, jotta putket toimivat asianmukaisesti ja kestävät pitkään.

33. Säädä putkien kallistuskulma vaakasuuntaisesti siten, että puhtaaseen putkeen syötetyn liuoksen viipymäaika on 125 ± 12,5 sekuntia. Arvioi retentioaika lisäämällä syötettävään liuokseen ei-biologista merkkiainetta (esim. NaCl, inertti väriaine): huippupitoisuuden saavuttamiseen poistovedessä kuluvaa aikaa pidetään keskimääräisenä retentioaikana (kun kalvo on suurimmillaan, retentioaika voi nousta noin 30 minuuttiin).

34. Näiden nopeuksien ja aikojen on todettu tuottavan riittävät (> 80 %) DOC- (tai COD-) poistumat ja tuottavan nitrifioitua poistovettä. Virtausnopeutta on muutettava, jos poistuma ei ole riittävää tai jos on tarkoitus simuloida tietyn puhdistuslaitoksen toimintaa. Säädä jälkimmäisessä tapauksessa orgaanisen aineen annostelunopeutta, kunnes reaktorin toiminta vastaa puhdistuslaitoksen toimintaa.

Ymppäys

35. Ilmalevinteinen ymppäys voi riittää käynnistämään mikro-organismien kasvun, kun käytetään synteettistä jätevettä. Muussa tapauksessa lisää 1 ml/l selkeytettyä jätevettä syötteeseen 3 päivän ajan.

Mittaukset

36. Tarkista säännöllisesti, että annosnopeudet ja pyörimisnopeudet ovat vaadituissa rajoissa. Mittaa myös poistoveden pH varsinkin, jos nitrifikaatio on odotettavissa.

Näytteenotto ja näytteiden analyysi

37. Näytteenoton menetelmä, malli ja tiheys valitaan testin tarkoituksen mukaisesti. Tulo- ja poistovedestä voi ottaa hetkellisiä näytteitä tai kerätä näytteitä pitemmällä aikavälillä (esim. 3–6 h). Ota ensimmäisellä jaksolla (ilman testikemikaalia) näytteitä kahdesti viikossa. Suodata näytteet kalvojen läpi tai sentrifugoi kiihtyvyydellä 40 000 m/s^2 noin 15 minuutin ajan (kohta 18). Näytteet voi olla tarpeen selkeyttää ja/tai karkeasuodattaa ennen kalvosuodatusta. Määritä DOC (tai COD) ainakin kahdesti ja tarvittaessa BOD, ammonium ja nitriitti/nitraatti.

38. Kaikki analyysit on tehtävä mahdollisimman pian näytteiden keräämisen ja valmistelun jälkeen. Jos analysointia on lykättävä, säilytä näytteitä täysissä ja tiiviisti suljetuissa pulloissa pimeässä tilassa, jonka lämpötila on noin 4 °C. Jos näytteitä on säilytettävä yli 48 tuntia, säilö ne pakastamalla, hapottamalla tai lisäämällä soveltuvaa myrkyllistä kemikaalia (esim. 20 ml/l elohopea(II)kloridiliuosta, jonka pitoisuus on 10 g/l). Varmista, ettei säilömistapa vaikuta analyysin tuloksiin.

Esivaihe

39. Tässä vaiheessa pintabiokalvo kasvaa optimaaliseen paksuuteen. Siinä kestää yleensä noin 2 viikkoa, mutta ei kuitenkaan yli 6 viikkoa. DOC-poistuma (tai COD-poistuma) (kohta 44) kasvaa ja saavuttaa tasannearvon. Kun kummassakin putkessa saavutetaan vastaavat tasannearvot, toinen putki valitaan kontrolliputkeksi testin loppuvaiheen ajaksi. Putkien toiminnan on pysyttävä yhdenmukaisena tämän ajan.

Testikemikaalin lisääminen

40. Lisää tässä vaiheessa testikemikaali toiseen reaktoriin vaaditussa pitoisuudessa, yleensä 10–20 mg C/l. Kontrolliin tulee edelleenkin pelkkää orgaanista ainetta.

Akklimatisaatiojakso

41. Jatka DOC:n (tai COD:n) analysointia kahdesti viikossa, ja jos halutaan arvioida primaarista biohajoamista, mittaa myös testikemikaalin pitoisuus ominaisanalyysillä. Odota testikemikaalin ensimmäisen lisäyksen jälkeen 1–6 viikkoa (tai kauemmin erityisolosuhteissa), jotta akklimatisaatio tapahtuu. Kun poistumaprosentti (kohdat 43–45) saavuttaa enimmäisarvon, määritä 12–15 luotettavaa arvoa tasannevaiheessa noin 3 viikon aikana keskimääräisen poistumaprosentin arviointia varten. Testi on valmis, jos saavutetaan riittävän korkea poistumisaste. Yleensä testin ei ole tarkoitus kestää yli 12 viikkoa testikemikaalin ensimmäisen lisäämisen jälkeen.

Kalvon irtoaminen liuskoina

42. Ylimääräistä kalvoa irtoaa säännöllisin väliajoin liuskoina putkista. Varmista tulosten vertailukelpoisuuden säilyminen antamalla testin kattaa vähintään kaksi täyttä kasvu- ja irtoamisjaksoa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

43. Laske testikemikaalin DOC-poistumaprosentti (tai COD-poistumaprosentti) jokaisen ajoitetun arvioinnin osalta käyttämällä kaavaa:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

jossa

D_t = DOC-poistumaprosentti (tai COD-poistumaprosentti) aikana t

Cs = testikemikaalin aiheuttama tuloveden DOC-pitoisuus (tai COD-pitoisuus), mieluiten arvioituna kantaliuoksen pitoisuuden ja lisätyn tilavuuden perusteella (mg/l)

E = testipoistovirrasta mitattu DOC-arvo (tai COD-arvo) aikana t (mg/l)

Eo = kontrollipoistovirrasta mitattu DOC-arvo (tai COD-arvo) aikana t (mg/l)

Tee samat laskelmat vertailukemikaalille, jos sellaista testataan.

Kontrollireaktorin toiminta

44. Orgaanisen aineen DOC-poistumisaste (tai COD-poistumisaste) (D_B) kontrollireaktoreissa antaa hyödyllistä tietoa, kun biokalvon biohajoamistoimintaa arvioidaan testin aikana. Laske poistumaprosentti seuraavan kaavan avulla:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

jossa

Cm = DOC (tai COD) kontrollitulovirran orgaanisessa aineessa (mg/l).

45. Laske testikemikaalin poistuma (D_{ST}), jos se on mitattu, ominaisanalyysillä jokaisella arviointikerralla seuraavalla kaavalla:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

jossa

Si = testikemikaalin mitattu tai mieluiten arvioitu pitoisuus testitulovirrassa (mg/l)

Se = testikemikaalin mitattu pitoisuus testipoistovirrassa aikana t (mg/l)

Jos analyysimenetelmällä saadaan jätevedessä positiivinen arvo, joka vastaa arvoa S_c mg/l laske poistumaprosentti (D_{SC}) seuraavalla kaavalla:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\ \%$$

Testitulosten ilmaiseminen

46. Esitä poistumaprosentti D_t ja D_{ST} (tai D_{SC}), jos käytettävissä, graafisesti ajan funktiona (katso lisäys 2, luku C.10-A). Tasannevaiheessa otettujen 12–15 D_T-arvon (ja D_{ST}-arvon, jos käytettävissä) kokonaisluvuksi pyöristetty keskiarvo ja keskihajonta ovat testikemikaalin poistumaprosentti. Poistumakäyrän muodosta voidaan tehdä joitakin päätelmiä poistumisprosessista.

Adsorptio

47. Jos testikemikaalin DOC-poistuma on korkea testin alussa, testikemikaali poistuu todennäköisesti adsorboitumalla biokalvoon. Tämän todistaminen voi olla mahdollista määrittämällä kalvosta liuskoina irronneeseen kiintoaineeseen adsorboitunut testikemikaali. Adsorboituvien kemikaalien DOC-poistuma ei tavallisesti pysy korkeana koko testin ajan. Tavallisesti poistumisaste on korkea aluksi ja laskee sitten hiljalleen tasapainoarvoon. Jos adsorboitunut testikemikaali aiheutti kuitenkin mikrobipopulaation adaptoitumista, testikemikaalin DOC-poistuma nousee myöhemmin ja saavuttaa korkean tasannearvon.

Lag-vaihe

48. Samoin kuin staattisissa seulontatesteissä, monet testikemikaalit vaativat lag-vaiheet, ennen kuin biologinen hajoaminen on täydellistä. Lag-vaiheen aikana kompetentit bakteerit adaptoituvat eikä testikemikaalia poistu juuri lainkaan. Sen jälkeen alkaa näiden bakteerien alkukasvu. Tämä vaihe loppuu ja hajoamisvaiheen katsotaan alkavan suunnilleen silloin, kun noin 10 prosenttia testikemikaalin alkuperäisestä määrästä on poistunut (adsorptio huomioiden, jos sitä tapahtuu). Lag-vaihe on usein erittäin vaihteleva, ja sen toistettavuus on huono.

Tasannevaihe

49. Jatkuvassa testissä poistumakäyrän tasannevaihe on vaihe, jossa hajoaminen on maksimaalista. Tasannevaiheen on kestettävä vähintään 3 viikkoa, ja sen aikana on mitattava noin 12–15 kelvollista arvoa.

Testikemikaalin keskimääräinen poistumisaste

50. Laske testikemikaalin tasannevaiheen poistumisarvojen D_t (ja D_{st}, jos käytettävissä) keskiarvo. Kun se pyöristetään lähimpään kokonaislukuun (1 %), saadaan testikemikaalin poistumisaste. On myös suositeltavaa laskea keskiarvon 95 prosentin luottamusväli. Laske samoin kontrolliastiassa olevan orgaanisen aineen keskimääräinen poistumisaste (D_B).

Viite biologisesta hajoamisesta

51. Jos testikemikaali ei adsorboidu merkittävästi biokalvoon ja poistumakäyrän muoto vastaa tyypillistä biologisen hajoamisen käyrää, jossa näkyvät lag-, hajoamis- ja tasannevaihe (kohdat 48 ja 49), mitattua poistumaa voidaan pitää biologisesta hajoamisesta johtuvana. Jos poistuminen on aluksi runsasta, simulaatiotutkimuksella ei voida erottaa biologisia ja abiooottisia eliminaatioprosesseja. Jos näin käy tai jos biologisesta hajoamisesta on muuten epävarmuutta (esim. haihtumista tapahtuu), analysoi adsorboituneet testikemikaalit kalvonäytteissä tai testaa biologista hajoavuutta tekemällä lisää tilastollisia (seulonta)testejä niiden parametrien perusteella, jotka viittaavat selvästi biologisiin prosesseihin. Tällaisia testejä ovat hapenkulutuksen menetelmät (tämän liitteen luku C.4, D, E ja F) (9) tai testi, joka mittaa CO_2-tuotantoa (tämän liitteen luku C.4-C tai kohta Headspace-menetelmä) (10). Käytä inokulaattina ennalta altistettua biokalvoa asianmukaisesta reaktorista.

52. Jos sekä DOC-poistuma että spesifisen kemikaalin poistuma on mitattu, poistumaprosenttien merkittävät erot (ensimmäinen on matalampi kuin jälkimmäinen) viittaavat siihen, että poistovesissä on orgaanisia välituotteita, jotka saattavat hajota heikosti. Niitä on tutkittava.

Testitulosten luotettavuus

53. Testi on luotettava, jos DOC-poistumisaste (tai COD-poistumisaste) (D_B) kontrolliyksiköissä on > 80 prosenttia kahden viikon kuluttua eikä epätavallisia havaintoja ole tehty.

54. Jos helposti biohajoavaa (vertailu)kemikaalia on testattu, biohajoamisen asteen pitäisi olla > 90 prosenttia, eikä kahden rinnakkaistuloksen ero saa olla yli 5 prosenttia. Jos nämä kaksi ehtoa eivät täyty, tarkista kokeelliset menetelmät ja/tai hanki kotitalousjätevettä toisesta lähteestä.

55. Samoin kahden testikemikaalia käsittelevän rinnakkaisyksikön (jos käytössä) biohajoamisarvojen ero ei saa olla yli 5 prosenttia. Jos tämä kriteeri ei täyty, mutta poistumisasteet ovat korkeita, jatka analyysiä vielä kolme viikkoa. Jos poistumisaste on matala, tutki testikemikaalin inhibitiovaikutuksia, jos ne eivät ole tiedossa, ja toista testi käyttämällä testikemikaalin alempaa pitoisuutta, jos se on mahdollista.

Testiraportti

56. Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot

— fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä.

Testiolosuhteet:

— mahdolliset testijärjestelmän muutokset varsinkin, jos testataan liukenemattomia tai haihtuvia aineita

— orgaanisen aineen tyyppi

— teollisuusjäteveden osuus jätevedestä ja sen ominaisuudet, jos käytössä ja tiedossa

— inokulaatiomenetelmä

— testikemikaalin kantaliuos – DOC (liuennut orgaaninen hiili) ja TOC (orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus), valmistustapa, onko suspensio, käytetty testipitoisuus tai -pitoisuudet, syyt jos DOC ei ole alueella 10–20 mg/l, lisäystapa, ensimmäisen lisäyksen päivämäärä, mahdolliset pitoisuuden muutokset

— hydraulisen retentioajan keskiarvo (ilman kasvua), putken pyörimisnopeus, keskimääräinen kallistuskulma, jos mahdollista

— tiedot liuskoina irtoamisesta, aika ja voimakkuus

— testilämpötila ja -alue

— käytetyt analyyttiset tekniikat.

Testitulokset:

— kaikki mitatut tiedot, DOC, COD, ominaisanalyysit, pH, lämpötila, N-kemikaalit, mikäli aiheellista

— kaikki lasketut D_t- (tai D_{tc}-), D_B- ja D_S-arvot taulukoituina sekä poistumakäyrät

— lag- ja tasannevaiheiden tiedot, testin kesto, testikemikaalin tai vertailukemikaalin (jos testattu) ja kontrolliyksikön orgaanisen aineen poistumisaste sekä tilastotiedot ja lausumat biologisesta hajoavuudesta ja testin luotettavuudesta

— tulosten pohdinta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753–758.

2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441–444.

3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.

4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355–1357.

5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92–94.

6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865–881.

7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

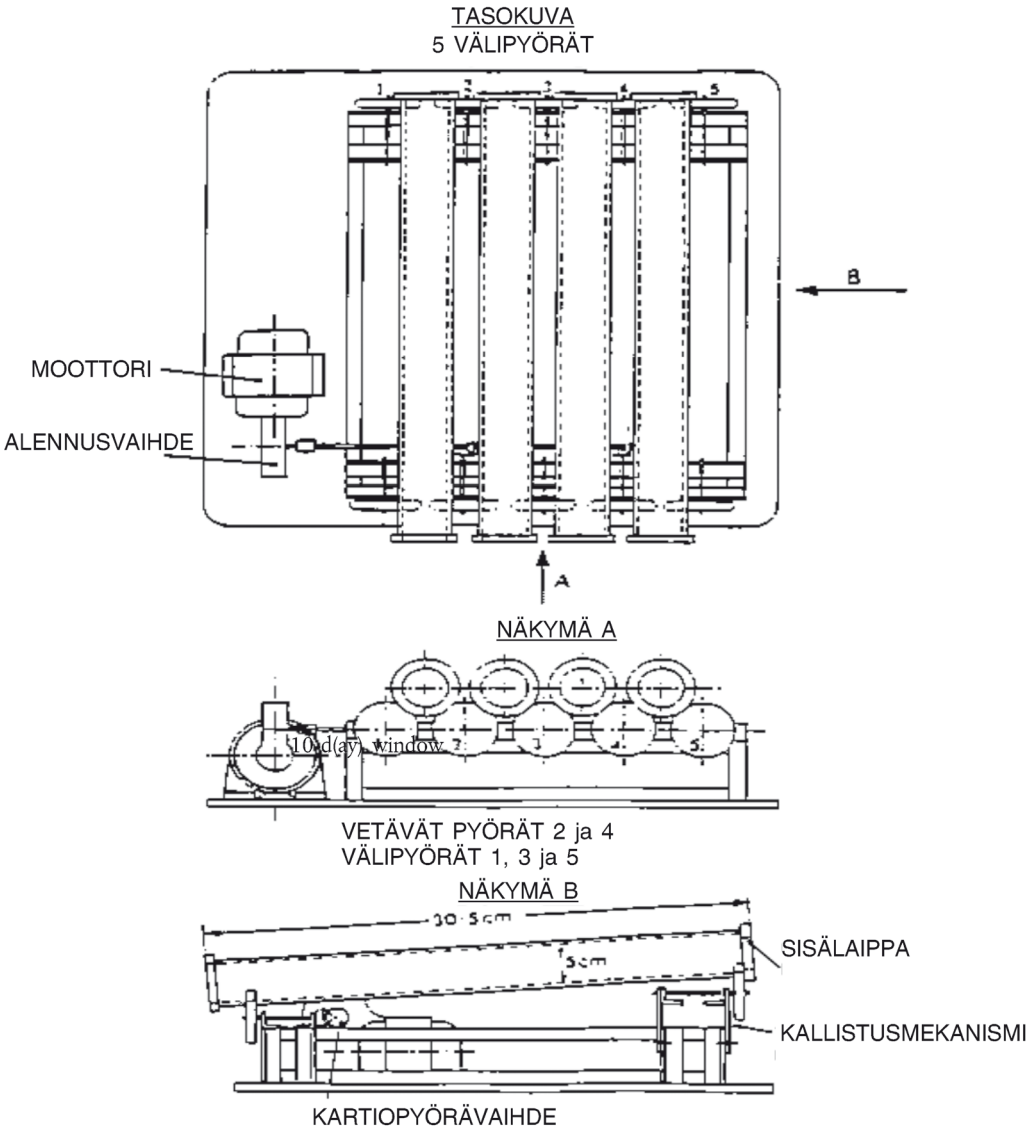
9) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys, A–F.

10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

Lisäys 8

Kuva 1

Pyörivät putket



Sanasto:

tasokuva

näkymä A/B

vetävät pyörät

välipyörät

moottori

alennusvaihde

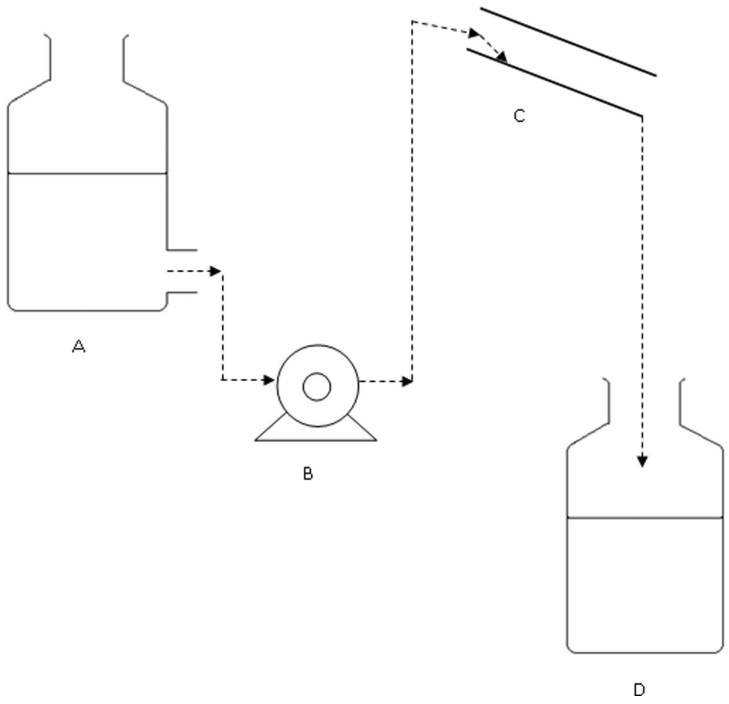
sisälaippa

kallistusmekanismi

kartiopyörävaihde

Kuva 2

Virtauskaavio



A: syöttöallas

B: peristalttinen pumppu

C: pyörivä putki

D: poistoveden keräysastia

MÄÄRITELMÄT:

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Kemikaalit: UNCED-sopimuksissa ja niihin liittyvissä asiakirjoissa termiä ”kemikaali” käytetään laajassa merkityksessä, joka kattaa kaikki aineet, tuotteet, seokset, valmisteet yms., joita olemassa olevissa järjestelmissä voidaan käyttää.”

10) Lisätään luvut C.27, C.28, C.29 ja C.30:

”C.27 MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN SEDIMENTTIÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 218 (2004). Tällä testimenetelmällä on tarkoitus arvioida pitkäaikaisen kemikaalialtistuksen vaikutuksia makean veden kaksisiipisen *Chironomus*-lajin (surviaissääsken) toukkiin, jotka elävät sedimentissä. Menetelmä perustuu *Chironomus riparius*- ja *Chironomus tentans* -toksisuustestimenettelyihin, jotka on kehitetty Euroopassa (1)(2)(3) ja Pohjois-Amerikassa (4)(5)(6)(7)(8) ja vahvistettu yhteistutkimuksissa (ring-test) (1)(6)(9). Myös muita hyvin dokumentoituja chironomid-lajeja, kuten *Chironomus yoshimatsui* (10)(11), voidaan käyttää.

2. Tässä testimenetelmässä altistus tapahtuu lisäämällä sedimenttiin testiainetta. Soveltuvan altistuksen valinta määräytyy testin sovellustarkoituksen mukaan. Testiaineen lisäämisellä sedimenttiin on tarkoitus simuloida kemikaalin pysyvää kertymää sedimenttiin. Tässä altistusjärjestelmässä tutkittavaa ainetta lisätään vesi-sedimenttisysteemin sedimenttiin.

3. Aineet, joita sedimentissä elävillä eliöillä testataan, säilyvät yleensä sedimentissä pitkään. Sedimentissä elävien eliöiden altistamiseen voidaan käyttää useita reittejä. Jokaisen altistusreitin suhteellinen tärkeys sekä toksiseen kokonaisvaikutukseen vaadittava aika määräytyvät käytettävän kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, kontaminoituneen

ravinnon nauttiminen voi olla tärkeä altistusreitti. Jotta hyvin rasvahakuisten aineiden myrkyllisyyttä ei aliarvioida, voidaan harkita ravinnon lisäämistä sedimenttiin ennen testiaineen lisäämistä. Jotta kaikki mahdolliset altistusreitit voidaan huomioida, tämä testimenetelmä keskittyy pitkäaikaiseen altistukseen. Testin kesto on 20–28 päivää *C. riparius*- ja *C. yoshimatsui* -lajeille ja 28–65 päivää *C. tentans* -lajille. Jos lyhytaikaisia tietoja tarvitaan tiettyyn tarkoitukseen, kuten epävakaan kemikaalin vaikutusten tutkimiseen, ylimääräiset rinnakkaisnäytteet voidaan poistaa 10 päivän jälkeen.

4. Mitatut tutkittavat ominaisuudet ovat kuoriutuneiden täysikasvuisten kokonaismäärä ja kuoriutumiseen kulunut aika. Jos lyhytaikaiset lisätiedot ovat tarpeen, toukkien eloonjäämistä ja kasvua on suositeltavaa mitata vasta kymmenen päivän kuluttua käyttämällä ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä.

5. Synteettisen sedimentin käyttö on suositeltavaa. Synteettisellä sedimentillä on useita etuja luonnolliseen sedimenttiin verrattuna:

— kokeellinen vaihtelu vähenee, koska sedimentti on toistettava ”vakiomatriisi”, eikä kontaminoitumattomia ja puhtaita sedimenttilähteitä tarvitse etsiä

— testit voidaan aloittaa milloin tahansa ilman, että testisedimentin kausivaihtelua esiintyy, sedimentistä ei tarvitse poistaa alkuperäiselimistöä esikäsittelyllä ja lisäksi synteettisen sedimentin käyttö pienentää kuluja, joita rutiinitestaukseen tarvittavan sedimenttimäärän keräämisestä kentältä syntyy

— synteettisen sedimentin käyttö sallii toksisuuden vertailun ja aineiden lajittelemisen myrkyllisyyden mukaan.

6. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

7. Surviaissääsken munatoukat altistetaan testikemikaalin pitoisuusalueelle vesi-sedimenttisysteemeissä. Testiainetta lisätään sedimenttiin, ja munatoukat siirretään dekantterilaseihin, joissa sedimentin ja veden pitoisuudet on stabiloitu. Surviaissääskien kuoriutumisaste ja kehittymisnopeus mitataan testin lopussa. Toukkien eloonjäänti ja paino voidaan myös tarvittaessa mitata 10 päivän kuluttua (käytättämällä soveltuvia ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä). Nämä tiedot analysoidaan regressiomallilla, jolla arvioidaan pitoisuus, joka aiheuttaa X prosentin laskun kuoriutumisessa tai toukkien eloonjäännissä tai painossa (esim. EC_{15}, EC_{50}), tai tilastollisen hypoteesin testillä, jolla määritetään NOEC/LOEC. Jälkimmäinen vaihtoehto edellyttää vaikutusarvojen vertaamista vertailuarvoihin tilastotutkimuksilla.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

8. Testiaineen vesiliukoisuuden, höyrynpaineen, mitatun tai lasketun erottumisen erottuminen sedimenttiin sekä stabiiliuden vedessä ja sedimentissä on oltava tiedossa. Käytössä on oltava luotettava analyysimenetelmä, jolla testiaine voidaan kvantifioida sedimentin päällä olevassa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä, ja menetelmän tarkkuus ja havaitsemisraja tunnetaan ja ne on raportoitu. Hyödyllisiä tietoja ovat esimerkiksi rakennekaava ja testiaineen puhtaus. Myös testiaineen kemiallinen kohtalo (esim. häviäminen, abioottinen ja bioottinen hajoaminen) on hyödyllistä tietää. Kirjallisuusviitteessä (12) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

VERTAILUKEMIKAALIT

9. Testimenettelyn ja testiolosuhteiden luotettavuus voidaan tarkistaa testaamalla ajoittain vertailukemikaaleja. Esimerkkejä vertailumyrkyistä, joita on käytetty onnistuneesti yhteistutkimuksissa ja validointitutkimuksissa: lindaani, trifluraliini, pentakloorifenoli, kadmiumkloridi ja kaliumkloridi (1)(2)(5)(6)(13).

TESTIN LUOTETTAVUUS

10. Testi on luotettava, jos

— kuoriutuvuus kontrolleissa on vähintään 70 prosenttia testin lopussa (1)(6)

— *C. riparius* ja *C. yoshimatsui* aikuistuvat kontrolliastioissa 12–23 päivän kuluessa astiaan laittamisesta. *C. tentans* vaatii 20–65 päivää

— testin lopussa mitataan jokaisen astian pH ja liuenneen hapen pitoisuus. Happipitoisuuden täytyy olla vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta (ASV) käytetyssä lämpötilassa, ja sedimentin päällä olevan veden pH-arvon pitää olla 6–9 kaikissa testiastioissa

— veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,0 °C. Veden lämpötilaa voidaan kontrolloida tasalämpöisessä huoneessa, jolloin huoneen lämpötila on tarkistettava soveliain väliajoin.

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

11. Tutkimus tehdään 600 ml:n dekantterilaseissa, joiden halkaisija on 8 cm. Muitakin astioita voidaan käyttää, kunhan sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys on sopiva. Sedimentin pinta-alan on oltava riittävä, jotta tilaa on 2–3 cm^2 toukkaa kohden. Sedimenttikerroksen ja sen päällä olevan veden syvyyden suhteen on oltava 1:4. Testiastioiden ja muiden testijärjestelmän kanssa kosketuksissa olevien välineiden on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia (esim. teflonia).

Lajin valinta

12. Paras laji tähän testiin on *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* soveltuu myös, mutta sen käsittely on hankalampaa ja se edellyttää pidempää testijaksoa. Myös *Chironomus yohimatsui* -lajia voidaan käyttää. Tietoa *Chironomus riparius* -lajin kasvatusmenetelmistä on lisäyksessä 2. Myös muiden lajien kasvatusolosuhteista on saatavissa tietoa: *Chironomus tentans* (4) and *Chironomus yoshimatsui* (11). Lajin tunnistus on varmistettava ennen testiä, mutta sitä ei ole tarpeen tehdä ennen joka testiä, jos eliöt ovat peräisin omasta kasvattamosta.

Sedimentti

13. Synteettisen sedimentin (keinosedimentin) käyttö on suositeltavaa. Jos kuitenkin käytetään luonnollista sedimenttiä, se on kuvailtava (vähintään pH, orgaaninen kokonaishiilipitoisuus, mutta myös muut parametrit, kuten C/N-suhde ja rakeisuus ovat suositeltavia), eikä siinä saa olla kontaminaatiota tai muita organismeja, jotka saattavat kilpailla chironomid-eliöiden kanssa tai syödä ne. Lisäksi on suositeltavaa, että luonnollista sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat. Tätä testiä varten suositellaan seuraavaa synteettistä sedimenttiä, joka perustuu testimenetelmässä C.8 (14) käytettyyn keinomaahan (1)(15)(16):

a) 4–5 % (kuivapaino) turvetta: pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0; on tärkeää käyttää ainoastaan ilmakuivattua jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm)

b) 20 % (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 %)

c) 75–76 % (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, yli 50 prosenttia 50–200 µm:n hiukkasia)

d) deionisoitua vettä lisätään, kunnes lopullisen seoksen kosteus on 30-50 %

e) kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5 orgaanisen hiilen pitoisuuden on oltava lopullisessa seoksessa 2 % (± 0,5 %). Sitä voidaan säätää lisäämällä sopiva määrä turvetta ja hiekkaa kohtien a) ja c) mukaisesti.

14. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperän on oltava tiedossa. Tarkista, ettei sedimentin ainesosissa ole kemikaalista kontaminaatiota (esim. raskasmetalleja, orgaanisia klooriyhdisteitä ja orgaanisia fosforiyhdisteitä). Esimerkki synteettisen sedimentin valmistuksesta on lisäyksessä 3. Myös kuivien ainesosien sekoittaminen on hyväksyttävää, jos voidaan osoittaa, että sedimentin ainesosat eivät erotu (esim. kelluvia turvehiukkasia) veden lisäämisen jälkeen ja että turve tai sedimentti on sopeutunut tarpeeksi.

Vesi

15. Testivedeksi soveltuu vesi, joka täyttää lisäyksissä 2 ja 4 luetellut laimennusveden kemialliset ominaisuudet. Kasvatus- ja testivedeksi soveltuu mikä tahansa vesi, luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi (katso lisäys 2) tai talousvesi, josta on poistettu kloori, jos surviaissääsket voivat elää siinä viljelyn ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Testiveden pH-arvon on oltava testin alussa 6–9, eikä kokonaiskovuus $CaCO_3$:na saa olla yli 400 mg/l. Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin

käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä). Samantyyppistä vettä on käytettävä koko tutkimuksen ajan. Lisäyksessä 4 luetellut vedenlaadun ominaisuudet on mitattava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi.

Kantaliuokset – sedimentit, joihin on lisätty testiainetta

16. Sedimentit, joiden pitoisuus on haluttu, valmistetaan yleensä lisäämällä testiaineliuosta suoraan sedimenttiin. Testiaineen kantaliuos, joka on liuotettu deionisoituun veteen, sekoitetaan synteettiseen sedimenttiin valssauskoneella, sekoittimella tai käsin. Jos testiaine liukenee huonosti veteen, se voidaan liuottaa käyttämällä pienintä mahdollista määrää soveltuvaa orgaanista liuotinta (esim. heksaania, asetonia tai kloroformia). Seuraavaksi liuokseen sekoitetaan 10 g hienoa kvartsihiekkaa yhtä testiastiaa kohden. Sen jälkeen liuottimen annetaan haihtua. Sitä ei saa jäädä hiekkaan yhtään. Seuraavaksi hiekkaan sekoitetaan sopiva määrä sedimenttiä jokaista dekantterilasia varten. Testiaineen liuottamiseen, dispergoimiseen tai emulgointiin saa käyttää vain helposti haihtuvia aineita. On pidettävä mielessä, että testiaineen ja hiekkaseoksen mukana tuleva hiekka on otettava huomioon sedimentin valmistuksessa (eli sedimentin valmistukseen on käytettävä pienempi määrä hiekkaa). Varmista huolellisesti, että sedimenttiin lisättävä testiaine sekoittuu sedimenttiin hyvin ja tasaisesti. Homogeenisuusasteen voi määrittää tarvittaessa analysoimalla osanäytteitä.

TESTISUUNNITELMA

17. ”Testisuunnitelma” tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, astioiden lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja toukkien lukumäärää astiaa kohti. Suunnitelmat EC-pisteen arviointia, NOEC:n määritystä ja rajatestin tekemistä varten on kuvattu.

Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma

18. Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. EC_{15}, EC_{50}) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta.Tarkkuus ja etenkin luotettavuus, jolla vaikutuspitoisuuksien (EC_x) estimaatit voidaan tehdä, paranee yleensä, kun vaikutuspitoisuus sijoittuu testattujen pitoisuuksien alueelle. Ekstrapolointia paljon matalimman positiivisen pitoisuuden alle tai korkeimman pitoisuuden ylle on vältettävä. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa (katso kohta 27).

19. Jos halutaan arvioida EC_x, jokaisesta pitoisuudesta tarvitaan vähintään viisi testipitoisuutta ja kolme rinnakkaisnäytettä. On joka tapauksessa suositeltavaa käyttää riittäviä testipitoisuuksia, jotta mallin estimointi onnistuu hyvin. Pitoisuuksien välinen kerroin ei saa olla yli kaksi (poikkeus voidaan tehdä, jos annosvastekäyrä on loiva). Käsittelyssä käytettävien toistojen määrää voidaan laskea, jos eri vasteita aiheuttavien testipitoisuuksien määrää nostetaan. Jos toistojen määrää lisätään tai testipitoisuuden välejä pienennetään, testin luottamusväli yleensä kapenee. Toistoja tarvitaan lisää, jos halutaan arvioida toukkien eloonjäänti ja kasvu 10 päivän aikana.

NOEC:n/LOEC:n estimointiin suositeltava testisuunnitelma

20. Jos halutaan arvioida LOEC tai NOEC, on käytettävä vähintään viittä testipitoisuutta ja vähintään neljää rinnakkaisnäytettä, eikä pitoisuuksien välinen kerroin saa olla yli kaksi. Rinnakkaisnäytteiden määrän on oltava riittävän suuri, jotta tilastollinen voima on riittävä ja kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Kehittymisnopeuteen soveltuu yleensä varianssianalyysi (ANOVA), kuten Dunnett-testi ja Williams-testi (17)(18)(19)(20). Kuoriutumisasteeseen voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferronin korjauksella) tai Mantel-Haenszelin testiä.

Rajatesti

21. Rajatesti (yksi testipitoisuus ja kontrolli) voidaan tehdä, jos alustavassa pitoisuusalueen määrityksessä ei havaittu vaikutuksia. Rajatestin tarkoituksena on tehdä testi riittävän suurella pitoisuudella, jotta päättäjät voivat sulkea pois testiaineen mahdolliset toksiset vaikutukset, ja raja asetetaan pitoisuuteen, jota ei odoteta esiintyvän missään tilanteessa. Suositeltava arvo on 1 000 mg/kg (kuivapaino). Yleensä vähintään kuusi rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä on tarpeen. On osoitettava, että tilastollinen voima on riittävä, jotta kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla ($p = 0,05$). Jos vaste on metrinen (kehittymisnopeus ja paino), t-testi on soveltuva tilastollinen menetelmä, jos tiedot täyttävät tämän testin vaatimukset (normaalisuus, homogeeniset vaihtelut). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa variansit ovat heterogeenisia, tai parametritonta testiä, kuten Wilcoxon-Mann-Whitheyn testiä. Fisherin tarkka testi soveltuu kuoriutumisasteeseen.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Vesi-sedimenttisysteemin valmistelu käyttäen sedimenttiä, johon tutkittavaa ainetta on lisätty

22. Testimenetelmässä C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla kuvattu lisäysmenetelmä on suositeltava tapa lisätä testiainetta (14). Sedimentit, joihin testiaine on lisätty, asetetaan astioihin ja niiden päälle lisätään vettä, kunnes sedimentin ja veden tilavuussuhde on 1:4 (katso kohdat 11 ja 15). Sedimenttikerroksen syvyyden on oltava 1,5–3 cm. Sedimentin voi peittää muovikiekolla, kun testivettä lisätään vesipatsaaseen, jotta sedimentin ainesosien erottuminen ja hienon materiaalin resuspensio voidaan välttää, mutta kiekko on poistettava heti tämän jälkeen. Myös muut välineet voivat olla sopivia.

23. Testiastiat on peitettävä (esim. lasilevyillä). Jos vettä haihtuu tutkimuksen aikana, lisää vettä, kunnes veden tilavuus on alkuperäisellä tasolla. Käytä tähän tarkoitukseen tislattua tai deionisoitua vettä, jotta suoloja ei keräydy.

Stabilointi

24. Kun sedimenttiin on lisätty testiaine ja sedimentin yläpuolelle on lisätty vesi, testiaineen on hyvä antaa erottua vesifaasista sedimenttiin (3)(4)(6)(13). Tämä on suositeltavaa tehdä samassa lämpötilassa ja ilmastuksessa, joita testissä käytetään. Sopiva tasapainottumisaika määräytyy sedimentin ja kemikaalin mukaan, ja se voi vaihdella tunneista päiviin tai harvinaisissa tapauksissa jopa viikkoihin (4–5 viikkoa). Koska monet kemikaalit voisivat hajota tässä ajassa, tasapainotilaa ei jäädä odottamaan, vaan tasapainottumisajaksi suositellaan 48 tuntia. Tämän tasapainottumisajan jälkeen testiaineen pitoisuus on mitattava sedimentin yläpuolisessa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä vähintään suurimmassa pitoisuudessa ja alemmassa pitoisuudessa (katso kohta 38). Näiden testiaineen analyyttisten määritysten perusteella voidaan laskea massatase, ja tulokset voidaan ilmoittaa mitattujen pitoisuuksien pohjalta.

Testiorganismien lisääminen

25. Neljä tai viisi päivää ennen testiorganismien lisäämistä munamassat otetaan viljelmistä ja pannaan pieniin astioihin kasvatusalustassa. Alustana voidaan käyttää kantaliuoksesta saatua kypsynyttä alustaa tai vasta valmistettua alustaa. Jälkimmäisessä tapauksessa kasvatusalustaan lisätään pieni määrä ravintoa, kuten viherlevää ja/tai muutama pisara hienoksi jauhetuista kalanruokahiutaleista saatua suodosta (katso lisäys 2). Käytä ainoastaan vastamunittuja munamassoja. Tavallisesti toukat alkavat kuoriutua muutama päivä munimisen jälkeen (*Chironomus riparius* 2–3 vrk lämpötilassa 20 °C, *Chironomus tentans* 1–4 vrk lämpötilassa 23 °C ja *Chironomus yoshimatui* 1–4 vrk lämpötilassa 25 °C), ja toukkien kasvu tapahtuu neljässä vaiheessa, joista jokainen kestää 4–8 päivää. Testissä käytetään ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkia (2–3 tai 1–4 vrk kuoriutumisen jälkeen). Sääskien kehitysvaiheen voi tarkistaa pääkapselin leveydestä (6).

26. Kaksikymmentä munatoukkaa sijoitetaan satunnaisesti tylpällä pipetillä jokaiseen testiastiaan, jossa on testiainetta sisältävää sedimenttiä ja vettä. Veden ilmastus on lopetettava, kun toukkia lisätään testiastioihin eikä sitä saa aloittaa 24 tuntiin toukkien lisäämisen jälkeen (katso kohdat 25 ja 32). Käytetyn testisuunnitelman (katso kohdat 19 ja 20) mukaisesti toukkien määrä pitoisuutta kohti on vähintään 60 EC-pisteen arviointia varten ja 80 NOEC-määritystä varten.

Testipitoisuudet

27. Raja-annostesti voi auttaa määrittämään pitoisuusaluetta varsinaista testiä varten. Tähän tarkoitukseen käytetään testiaineen pitoisuuksia laajoin pitoisuusvälein. Jotta surviaissääskien pintatiheys on sama, jota käytetään varsinaisessa testissä, surviaissääsket altistetaan jokaiselle testiaineen pitoisuudelle siksi aikaa, että sopivat testipitoisuudet voidaan arvioida. Rinnakkaisnäytteitä ei tarvita.

28. Varsinaisessa testissä käytettävät testipitoisuudet päätetään raja-annostestin perusteella. Käytössä on oltava vähintään viisi pitoisuutta, jotka valitaan kohdissa 18 ja 20 kuvatulla tavalla.

Kontrollit

29. Testissä on käytettävä kontrolliastioita, joissa on sedimenttiä mutta ei testiainetta, ja soveltuvaa määrää rinnakkaisnäytteitä (katso kohdat 19–20). Jos testiaineen lisäyksessä on käytetty liuotinta (katso kohta 16), sedimentin liuotinkontrolli on lisättävä.

Testijärjestelmä

30. Käytettävät järjestelmät ovat staattisia. Puolistaattisia tai läpivirtausjärjestelmiä, joissa sedimentin yläpuolinen vesi uusiutuu ajoittain tai jatkuvasti, voidaan käyttää poikkeustapauksissa, kuten jos vedenlaatu ei sovellu testiorganismille tai vaikuttaa kemialliseen tasapainoon (esim. liuenneen hapen pitoisuus laskee liian matalaksi, eritystuotteiden pitoisuus nousee liian korkeaksi tai sedimentistä uuttuu mineraaleja, jotka vaikuttavat pH-arvoon ja/tai veden kovuuteen). Yleensä muut sedimentin päällä olevan veden laatua kohentavat toimet, kuten ilmastus, ovat kuitenkin riittäviä ja suositeltavia.

Ravinto

31. Toukkia on ruokittava mieluiten päivittäin tai vähintään kolmesti viikossa. Riittävä määrä kalanruokaa (suspensiona vedessä tai hienoksi jauhettuna, esim. TetraMin tai TetraPhyll, lisätietoja lisäyksessä 2) on 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui* -lajille) päivässä toukkaa kohden ensimmäisten 10 päivän aikana. Tätä vanhemmat toukat voivat tarvita vähän enemmän ruokaa: 0,5–1 mg päivässä toukkaa kohden pitäisi riittää testin loppuun saakka. Ravinnon määrää täytyy pienentää kaikissa käsittelyissä ja kontrolleissa, jos sienikasvua ilmenee tai kontrolleissa esiintyy kuolleisuutta. Jos sienikasvua ei saada loppumaan, testi on toistettava. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, organismien eloonjääntiin ja luontaiseen kasvuun tarvittava ravinnon määrä voidaan lisätä synteettiseen sedimenttiin ennen stabiloitumisvaihetta. Tässä tapauksessa on käytettävä kalanruoan sijaan kasviainesta, kuten 0,5 prosenttia (kuivapaino) nokkosen (*Urtica dioica*), valkomulperin (*Morus alba*), valkoapilan (*Trifolium repens*), pinaatin (*Spinacia oleracea*) tai muun kasviaineksen (*Cerophyl* tai alfaselluloosa) hienoksi jauhettuja lehtiä.

Inkubaatio-olosuhteet

32. Sedimentin päällä olevaa vettä aletaan ilmastaa varovasti mieluiten 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen, ja ilmastusta jatketaan testin loppuun saakka (on pidettävä huoli, ettei liuenneen hapen pitoisuus laske alle 60 prosenttiin ilman kyllästysarvosta). Ilmastus tapahtuu lasisella Pasteur-pipetillä, joka on kiinnitetty 2–3 senttiä sedimenttikerroksen yläpuolelle (yksi tai muutama kupla sekunnissa). Haihtuvia kemikaaleja testattaessa voidaan harkita, jätetäänkö vesi-sedimenttisysteemi ilmastamatta.

33. Testi tehdään vakiolämpötilassa 20 °C (± 2 °C). Suositeltu lämpötila *C. tentans* -lajille on 23 °C (± 2 °C) ja *C. yoshimatui* -lajille 25 °C (± 2 °C). Valoisa aika on 16 tuntia, ja valon voimakkuuden pitää olla 500–1 000 luksia.

Altistuksen kesto

34. Altistus alkaa, kun toukat lisätään astioihin, joissa on testiainetta, ja kontrolliastioihin. Altistuksen enimmäiskesto on 28 vuorokautta lajeille *C. riparius* ja *C. yoshimatsui*, ja 65 vuorokautta lajille *C. tentans*. Jos sääsket kuoriutuvat aikaisemmin, testi voidaan lopettaa vähintään viisi päivää sen jälkeen, kun viimeinen surviaissääski on kasvanut täysikasvuiseksi kontrollissa.

Havainnot

Kuoriutuminen

35. Kehitysaika ja täysin kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien yhteismäärä määritetään. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

36. Testiastioita on tarkkailtava vähintään kolmesti viikossa ja epänormaalia käyttäytymistä on arvioitava silmämääräisesti (esim. sedimentistä poistuminen, epätavallinen uinti) kontrolliin verrattuna. Sääsket on laskettava päivittäin, kun kuoriutuminen on odotettavissa. Täysikasvuisten sääskien sukupuoli ja lukumäärä kirjataan päivittäin. Tunnistuksen jälkeen sääsket poistetaan astioista. Ennen testin loppua mahdollisesti munitut munamassat on kirjattava ylös ja poistettava, jottei sedimenttiin tule lisää toukkia. Myös niiden näkyvissä olevien koteloiden määrä, jotka eivät ole kuoriutuneet, on merkittävä ylös. Kuoriutumisen mittausohjeet ovat lisäyksessä 5.

Kasvu ja eloonjäänti

37. Jos tiedot 10 vuorokauden toukkien eloonjäännistä ja kasvusta tarvitaan, testin alussa on otettava käyttöön ylimääräisiä testiastioita myöhempää käyttöä varten. Toukat seulotaan ylimääräisten astioiden sedimentistä 250 µm:n seulalla. Kuolleiksi lasketaan toukat, jotka eivät liiku tai reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin. Myös ne toukat, joita ei otettu talteen, lasketaan kuolleiksi (mikrobit ovat saattaneet hajottaa testin alussa kuolleet toukat). Eloonjääneiden toukkien (tuhkaton) kuivapaino testiastiaa kohden määritetään ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiassa lasketaan. On hyödyllistä määrittää, missä kehitysvaiheessa eloonjääneet toukat ovat. Tähän tarkoitukseen voidaan mitata kunkin toukan pääkapselin leveys.

Mittaukset

Testiaineen pitoisuus

38. Ennen testin aloittamista (eli toukkien lisäämistä) otetaan sedimenttinäytteet (bulk) vähintään yhdestä astiasta käsittelyä kohden, jotta testiaineen pitoisuus sedimentissä voidaan määrittää. On suositeltavaa, että vähintään yläpuolisen veden, huokosveden ja sedimentin näytteet analysoidaan testin alussa (katso kohta 24) ja lopussa suurimmassa pitoisuudessa ja matalammassa pitoisuudessa. Testiaineen pitoisuudesta saadaan tietoa testiaineen käyttäytymisestä ja jakautumisesta vesi-sedimenttisysteemissä.

39. Jos välimittauksia tehdään (esim. päivänä 7) ja analyysiin tarvitaan suuria näytteitä, joiden ottaminen testiastioista vaikuttaisi testijärjestelmään, analyyttisiin määrityksiin käytetään ylimääräisistä testiastioista otettuja näytteitä. Näitä astioita käsitellään samalla tavoin kuin testiastioita (mukaan lukien testiorganismien lisääminen), mutta niitä ei käytetä biologiseen havainnointiin.

40. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esim. 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää. Joskus pitoisuuksien analysointi huokosvedestä ei ole mahdollista, koska näyte on liian pieni.

Fysikaalis-kemialliset parametrit

41. Testiastioiden pH ja lämpötila on mitattava asiaankuuluvasti (katso kohta 10). Kovuus ja ammoniakki on mitattava kontrolliastioissa ja yhdessä testiastiassa suurimmalla pitoisuudella testin alussa ja lopussa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

42. Tämän testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutus uros- ja naarassääskien kehittymisnopeuteen ja täysin kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärään. 10 päivän testissä määritetään vaikutukset toukkien eloonjäämiin ja painoon. Jos eri sukupuolten herkkyydessä ei ilmene tilastollisesti merkitsevää eroa, urosten ja naaraiden tulokset voidaan yhdistää tilastollisia analyysejä varten. Sukupuolten väliset herkkyyserot voidaan määrittää tilastotieteellisesti esimerkiksi χ^2-r × 2 -taulukkotestillä. Toukkien eloonjäänti ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden määritetään 10 päivän kuluttua, jos tarpeen.

43. Kuivapainoon perustuvat vaikutuspitoisuudet lasketaan mieluiten testin alussa mitattujen sedimenttipitoisuuksien perusteella (katso kohta 38).

44. EC_{50}:n tai minkä tahansa muun EC_x:n piste-estimaattia laskettaessa astiakohtaisia tilastotietoja voidaan käyttää aitoina toistoina. Laskettaessa minkä tahansa EC_x-arvon luottamusväliä astioiden välinen vaihtelu on otettava huomioon tai vaihtoehtoisesti osoitettava vaihtelu niin pieneksi, että se voidaan jättää huomiotta. Jos malliin sovelletaan pienimmän neliösumman menetelmää, astiakohtaisiin tilastotietoihin on sovellettava muunnosta, jotta varianssin homogeenisuus paranee. EC_x-arvot on kuitenkin laskettava sen jälkeen, kun vaste on muunnettu takaisin alkuperäisarvoon.

45. Kun NOEC/LOEC on tarkoitus määrittää tilastollisen hypoteesin testillä, astioiden välinen vaihtelu on huomioitava esimerkiksi hierarkkisella ANOVAlla. Robustimpia testejä (21) voidaan käyttää soveltuvissa tilanteissa, kun tavalliset ANOVAn oletukset eivät täyty.

Kuoriutumisaste

46. Kuoriutumisasteet ovat dikotomisia tietoja, ja ne voidaan analysoida Cochran-Armitagen testillä, jota sovelletaan alaspäin askeltavasti, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa, ja näitä tietoja pidetään tämän odotuksen mukaisina. Jos näin ei ole, voidaan käyttää Fisherin tarkkaa testiä tai Mantel-Haenszelin testiä, jossa p-arvot on korjattu Bonferroni-Holmin menetelmällä. Jos on näyttöä siitä, että saman pitoisuuden toistojen välinen varianssi on suurempi kuin binomijakauma antaa edellyttää (ylihajonta), voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä tai Fisherin tarkkaa testiä (21).

Kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa (ne) määritetään, ja summa jaetaan lisättyjen sääskien määrällä (na):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

jossa:

ER = kuoriutumisaste

n_e = kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa

n_a = astiaan lisättyjen toukkien määrä

47. Kun näytekoko on suuri ja ylihajontaa esiintyy, paras vaihtoehto on pitää kuoriutumisastetta jatkuvana vasteena ja käyttää esimerkiksi Williamsin testiä, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa ja yhdenmukainen kuoriutumisastetietojen kanssa. Dunnettin testi soveltuu, kun monotonisuutta ei esiinny. Näytekoko määritetään tässä suureksi, jos sekä kuoriutuneiden että kuoriutumattomien toukkien määrä on toistossa (astiassa) yli viisi.

48. Jos halutaan soveltaa ANOVA-menetelmiä, ER-arvot on ensin muunnettava arcsin-neliöjuuri-muunnoksella tai Tukey-Freemanin muunnoksella, jotta saadaan likimääräinen normaalijakauma ja varianssi tasoittuu. Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferroni) tai Mantel-Haenszelin testiä voidaan soveltaa, kun käytetään absoluuttisia frekvenssejä. Arcsin-neliöjuuri-muunnosta sovelletaan ottamalla kuoriutumisasteen neliöjuuren käänteinen sini ($\sin^{-1}$).

49. Kuoriutumisasteissa EC_x-arvot lasketaan käyttämällä regressioanalyysiä (tai esim. probit- (22), logit- tai Weibull-mallia tai soveltuvaa kaupallista ohjelmistoa). Jos regressioanalyysi epäonnistuu (esim. osittaisia vasteita on alle kaksi), käytetään muita parametrittomia menetelmiä, kuten liukuvaa keskiarvoa tai yksinkertaista interpolaatiota.

Kehittymisnopeus

50. Keskimääräinen kehittymisaika edustaa keskimääräistä ajanjaksoa toukkien lisäämisestä (testipäivä 0) kokeellisen sääskikohortin kuoriutumiseen. (Aidon kehittymisajan laskennassa on huomioitava toukkien ikä lisäyshetkellä.) Kehittymisnopeus on kehittymisajan käänteisluku (yksikkö: 1/vrk) ja edustaa päivässä tapahtuvaa toukkien kehittymistä. Kehittymisnopeuden käyttö on suositeltavaa näiden sedimentin toksisuuskokeiden arvioinnissa, sillä sen varianssi on pienempi ja se on homogeenisempi ja lähempänä normaalijakaumaa kuin kehittymisaika. Siksi tehokkaita parametritestimenetelmiä käytetään mieluummin kehittymisnopeuden kuin kehittymisajan kanssa. Kun kehittymisnopeus on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida regressioanalyysillä (esim. (23), (24)).

51. Seuraavissa tilastollisissa testeissä oletetaan, että tarkastuspäivänä × havaittu sääskimäärä kuoriutuu päivän x ja päivän x-l välissä (l = tarkastusvälin pituus, yleensä 1 päivä). Keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa (x) lasketaan seuraavasti:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

jossa:

$\bar{x}$: keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa

i: tarkastusvälin indeksi

m: tarkastusvälien enimmäismäärä

f_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien määrä

n_e: testin lopussa kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärä ($=\sum f_i$)

x_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien kehittymisnopeus

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

jossa:

day_i: tarkastuspäivä (päivää lisäyksen jälkeen)

l_i: tarkastusvälin i pituus (päivissä, yleensä 1 päivä)

Testiraportti

52. Testiraportin on sisällettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (vesiliukoisuus, höyrynpaine, jakaantumiskerroin maa-aineksessa (tai sedimentissä, jos saatavissa), stabiilisuus vedessä jne.)

— kemialliset tunnistetiedot (yleisnimi, kemiallinen nimi, rakennekaava, CAS-numero jne.) sekä puhtaus ja testiaineen kvantifioinnissa käytetty analyysimenetelmä.

Testilajit:

— käytetyt koe-eläimet: lajit, tieteellinen nimi, eliöiden lähde ja kasvatusolosuhteet

— tiedot munamassojen ja toukkien käsittelystä

— koe-eläinten ikä testiastioihin lisättäessä.

Testiolosuhteet:

— käytetty sedimentti, eli luonnollinen vai synteettinen sedimentti

— luonnollisen sedimentin osalta sedimentin näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan lukien, jos mahdollista, kontaminaatiohistoria, ominaisuudet: pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, C/N-suhde ja rakeisuus (tarvittaessa)

— synteettisen sedimentin valmistus: ainesosat ja niiden ominaisuudet (orgaanisen hiilen pitoisuus, pH, kosteus jne. testin alussa)

— testiveden valmistus (jos käytetään synteettistä vettä) ja ominaisuudet (happipitoisuus, pH, johtavuus, kovuus jne. testin alussa)

— sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys

— sedimentin päällä olevan veden ja huokosveden tilavuus, märän sedimentin paino huokosveden kanssa ja ilman huokosvettä

— testiastiat (materiaali ja koko)

— tapa, jolla testiaine lisättiin sedimenttiin: käytetyt pitoisuudet, toistojen määrä ja mahdollisen liuottimen käyttö

— vesi-sedimenttisysteemin stabilointivaihe: kesto ja olosuhteet

— inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valojakso ja valon voimakkuus, ilmastus (taajuus ja voimakkuus)

— yksityiskohtaiset tiedot syöttämisestä, kuten ravinnon tyyppi, valmistus, määrä ja syöttöaikataulu.

Tulokset:

— kaikki nimelliset testipitoisuudet, mitatut testipitoisuudet ja tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritettiin testiaineen pitoisuus testiastiassa

— testiastioissa olevan veden laatu, eli pH, lämpötila, liuennut happi, kovuus ja ammoniakki

— mahdollinen haihtuneen testiveden korvaus

— kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien määrä astiassa päivää kohden

— kuoriutumattomien toukkien määrä astiassa

— toukkien keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden, kehitysasteittain jos tarpeen

— kuoriutumisprosentti rinnakkaisnäytteessä ja testipitoisuudessa (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— täysin kuoriutuneiden sääskien keskimääräinen kehittymisnopeus rinnakkaisnäytteessä ja testissä (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— toksisten tutkittavien ominaisuuksien estimaatit, kuten EC_x (ja siihen liittyvät luottamusvälit), NOEC ja/tai LOEC, ja niiden määrittämiseen käytetyt tilastolliset menetelmät

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850,1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Tämän liitteen testimenetelmä C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Synteettinen sedimentti on luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

Yläpuolinen vesi on testiastiassa sedimentin päällä oleva vesi.

Huokosvesi on sedimenttirakeiden välissä olevaa vettä.

Sedimentti, johon on lisätty testiaine.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Lisäys 2

***Chironomus riparius* -lajin kasvatussuosituksia**

1. *Chironomus*-toukkia voi kasvattaa kiteytysmaljoissa tai suurissa astioissa. Astian pohjalle levitetään noin 5–10 mm:n paksuinen kerros hienoa kvartsihiekkaa. Myös piimaa (esim. Merck, tuotenro 8117) on osoitettu soveltuvaksi substraatiksi (ohuempi, enintään muutaman millimetrin paksuinen kerros riittää). Sen jälkeen lisätään monta senttiä soveltuvaa vettä. Jos haihtumista tapahtuu, kuivuminen on estettävä lisäämällä vettä tarvittaessa. Vesi voidaan vaihtaa tarvittaessa. Varovainen ilmastus on tarpeen. Toukkien kasvatusastioita on säilytettävä soveltuvassa häkissä, jotta kuoriutuvat aikuiset eivät pääse pakenemaan. Häkin on oltava tarpeeksi tilava, jotta kuoriutuneet aikuiset mahtuvat parveilemaan. Muutoin parittelua ei välttämättä tapahdu (vähimmäiskoko on n. 30 × 30 × 30 cm).

2. Häkkejä säilytetään huoneenlämmössä tai huoneessa, jonka lämpötila on vakioitu (20 ± 2 °C). Valoisa jakso on 16 tuntia (voimakkuus n. 1 000 luksia), pimeys 8 tuntia. On ilmoitettu, että lisääntyminen voi estyä, jos ilman suhteellinen kosteus on alle 60 prosenttia.

Laimennusvesi

3. Mitä tahansa soveltuvaa luonnollista tai synteettistä vettä voidaan käyttää. Kaivovesi, talousvesi, josta on poistettu kloori, ja keinotekoinen neste (esim. Elendtin "M4"- tai "M7"-liuos, ks. jäljempänä) ovat yleisesti käytettyjä. Vesi on ilmastettava ennen käyttöä. Kasvatusvesi voidaan tarvittaessa uusia kaatamalla tai lappamalla käytetty vesi kasvatusastioista varoen tuhoamasta toukkaputkia.

Toukkien ruokinta

4. *Chironomus*-toukat ruokitaan kalojen hiutaleruoalla (TetraMin®, TetraPhyll® tai muu vastaava kaupallinen kalanruoka), jota annetaan noin 250 mg astiaa kohden päivässä. Ruoka voidaan antaa kuivana jauheena tai suspensiona vedessä: 1,0 g hiutaleruokaa lisätään 20 ml:aan laimennusvettä ja seos sekoitetaan homogeeniseksi. Tätä valmistetta voi antaa noin 5 ml astiaa kohden päivässä (ravista ennen käyttöä). Vanhoille toukille voi antaa enemmän ruokaa.

5. Ruokkimista säädellään vedenlaadun mukaan. Jos kasvatusalusta muuttuu sameaksi, ravinnon määrää on vähennettävä. Ravinnon määrän lisäämistä on seurattava tarkasti. Jos ravintoa on liian vähän, toukat siirtyvät kohti vesipatsasta, ja jos ravintoa on liian paljon, mikrobien toiminta voi lisääntyä ja happipitoisuudet laskea. Kumpikin vaihtoehto voi laskea kasvunopeutta.

6. Vähän viherlevän (esim. *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) soluja voidaan lisätä, kun uusia kasvatusastioita perustetaan.

Kuoriutuneiden aikuisten ruokinta

7. Eräät kokeen suorittajat ovat ehdottaneet, että kylläisessä sakkaroosiliuoksessa liotettu vanutuppo saattaa riittää kuoriutuneiden aikuisten ravinnoksi.

Kuoriutuminen

8. Kun lämpötila on 20 ± 2 °C, toukkien kasvatusastioista alkaa kuoriutua aikuisia noin 13–15 päivän kuluttua. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

Munamassat

9. Kun kasvatushäkissä on aikuisia, kaikista toukkien kasvatusastioista on tarkistettava kolme kertaa viikossa, onko niissä hyytelömäisiä munamassoja. Jos munamassoja on, ne on poistettava varovasti. Ne siirretään pieneen astiaan, jossa on pieni määrä kasvatusvettä. Munamassoja voi käyttää uuden viljelyastian perustamiseen (esim. 2–4 munamassaa astiaa kohden) tai toksisuustesteihin.

10. Munatoukkien pitäisi kuoriutua 2–3 päivän kuluttua.

Uusien viljelyastioiden perustaminen

11. Kun viljelmät on perustettu, uuden toukkaviljelyastian voi aloittaa testivaatimusten mukaan kerran viikossa tai harvemmin. Vanhat astiat poistetaan, kun aikuiset sääsket ovat kuoriutuneet. Näin saadaan säännöllisesti aikuisia mahdollisimman vähäisellä vaivalla.

Testiliuosten ”M4” ja ”M7” valmistus

12. Elendt (1990) kuvasi ”M4”-liuoksen. ”M7”-liuos valmistetaan samoin kuin ”M4” lukuun ottamatta taulukossa 1 merkittyjä aineita, joiden pitoisuus on neljä kertaa pienempi ”M7”-liuoksessa kuin ”M4”-liuoksessa. ”M7”-liuosta koskeva julkaisu on valmisteilla (Elendt, henkilökohtainen viesti). Testiliuosta ei valmisteta Elendtin ja Biasin mukaan (1990), sillä kantaliuosten valmistusta varten annetut $NaSiO_3$-, 5 H_2O-, $NaNO_3$-, KH_2PO_4- ja K_2HPO_4-pitoisuudet eivät ole riittäviä.

”M7”-liuoksen valmistus

13. Jokainen kantaliuos (I) valmistetaan erikseen, ja näistä kantaliuoksista (I) valmistetaan yhdistetty kantaliuos (II) (katso taulukko 1). ”M7”-liuos valmistetaan täyttämällä 50 millilitraa yhdistettyä kantaliuosta (II) ja taulukossa 2 annetut määrät jokaista makroravinteiden kantaliuosta 1 litraksi deionisoitua vettä. Vitamiinien kantaliuos valmistetaan lisäämällä deionisoituun veteen kolmea vitamiinia taulukon 3 mukaisesti, ja 0,1 millilitraa yhdistettyä vitamiinien kantaliuosta lisätään lopulliseen ”M7”-liuokseen vähän ennen käyttöä. (Vitamiinien kantaliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä.) Liuos ilmastetaan ja stabiloidaan.

KIRJALLISUUSVIITTEET

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Taulukko 1

Hivenaineiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

Kantaliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn kantaliuoksen (II) valmistus: Sekoita seuraavat määrät (ml) kantaliuoksia (I) ja täytä 1 litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Nämä aineet ovat erilaiset M4- ja M7-liuoksissa, kuten edellä kerrottiin.
(2) Nämä liuokset valmistetaan erikseen. Sitten ne kaadetaan yhteen ja käsitellään välittömästi autoklaavissa.

Taulukko 2

Makroravinteiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn makroravinteiden kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

Taulukko 3

Vitamiinien kantaliuos M4- ja M7-liuosta varten. Kaikki kolme vitamiiniliuosta yhdistetään yhdeksi vitamiinien kantaliuokseksi.

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn vitamiinien kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinihydrokloridi	750	0,1	0,075
Syaanikobalamiini (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiini	7,5	0,1	0,00075

KIRJALLISUUSVIITTEET

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

Lisäys 3

SYNTEETTISEN SEDIMENTIN VALMISTUS

Sedimentin koostumus

Synteettisen sedimentin koostumuksen on oltava seuraavanlainen:

Ainesosa	Ominaisuudet	Prosenttiosuus sedimentin kuivapainosta
Turve	Rahkasuoturvetta, pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä, hienoksi jauhettuna (hiukkaskoko ≤ 1 mm) ja ilmakuivattuna	4–5
Kvartsihiekka	Raekoko: > 50 prosenttia hiukkasista on oltava kokoa 50–200 µm	75–76
Kaoliniittisavi	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %	20
Orgaaninen hiili	Säädetään lisäämällä turvetta ja hiekkaa	2 (± 0,5)
Kalsiumkarbonaatti	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas	0,05–0,1
Vesi	Johtavuus ≤ 10 µS/cm	30–50

Valmistelut

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi. Tarvittava määrä turvejauhetta suspendoidaan deionisoituun veteen käyttämällä tehokasta homogenisointilaitetta. Suspension pH-arvoksi säädetään 5,5 ± 0,5 $CaCO_3$:lla. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen. Arvon pitäisi olla 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen turvesuspensioon sekoitetaan muut ainesosat (hiekka ja kaoliniittisavi) ja deionisoitu vesi, jotta saadaan homogeenistä sedimenttiä, jonka vesipitoisuus on 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta. Lopullisen seoksen pH mitataan vielä kerran, ja se säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla alueelle 6,5–7,5. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. On suositeltavaa, että synteettistä sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat.

Säilytys

Synteettisen sedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa huoneenlämmössä. Valmistettua (märkää) sedimenttiä ei saa säilyttää ennen käyttöä tässä testissä. Se on käytettävä heti valmistuksen lopussa olevan 7 päivän sopeutusajan jälkeen.

KIRJALLISUUSVIITTEET

Tämän liitteen luku C.8. Myrkyllisyystutkimus madoilla.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

Lisäys 4

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

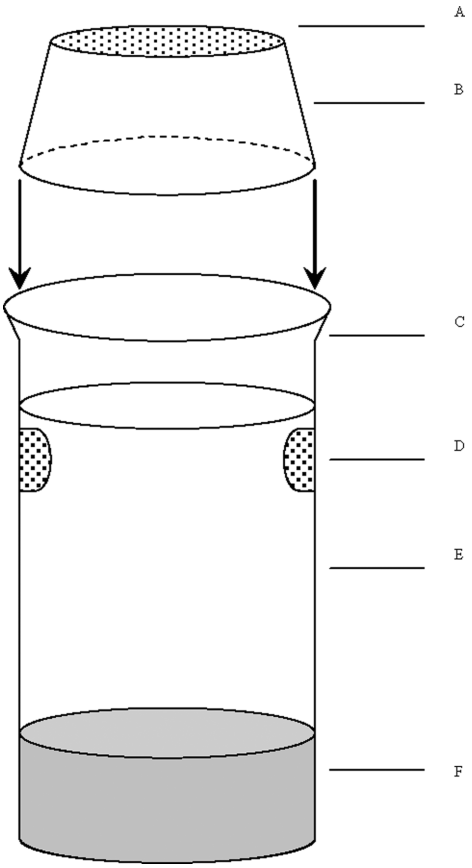
Aine	Pitoisuudet
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Kovuus $CaCO_3$:na	< 400 mg/l (*)
Jäännöskloori	< 10 mg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

(*) Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä).

Lisäys 5

Chironomid-toukkien kuoriutumisen tarkkailuohjeet

Dekantterilaseihin asetetaan pyydykset kuoriutuneita toukkia varten. Näitä pyydyksiä tarvitaan päivästä 20 lähtien testin loppuun saakka. Alla on esimerkki käytetystä pyydyksestä:



A: polyamidiverkko

B: ylösalaisin käännetyt muovikupit

C: reunukseton altistusdekantterilasi

D: verkkoaukot vedenvaihtoa varten

E: vettä

F: sedimentti

C.28 MYRKYLLISYYSTESTI CHIRONOMID-ELIÖLLÄ VESI-SEDIMENTTISYSTEEMISSÄ KÄYTTÄEN VETTÄ, JOHON TUTKITTAVAA AINETTA ON LISÄTTY

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 219 (2004). Tällä testimenetelmällä on tarkoitus arvioida pitkäaikaisen kemikaalialtistuksen vaikutuksia makean veden kaksisiipisen *Chironomus*-lajin (surviaissääsken) toukkiin, jotka elävät sedimentissä. Menetelmä perustuu pääosion BBA:n ohjeistukseen, jossa käytetään vesi-sedimenttisysteemiä, keinomaata ja vesipatsaan altistusmenetelmää (1). Siinä huomioidaan myös *Chironomus riparius*- ja *Chironomus tentans* -lajien toksisuustestimenettelyt, jotka on kehitetty Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) ja vahvistettu yhteistutkimuksissa (ring-test) (1)(6)(9). Myös muita hyvin dokumentoituja chironomid-lajeja, kuten *Chironomus yoshimatsui* (10)(11), voidaan käyttää.

2. Tässä testimenetelmässä altistaminen tapahtuu lisäämällä testiainetta veteen. Soveltuvan altistuksen valinta määräytyy testin sovellustarkoituksen mukaan. Vesialtistuksessa, jossa testiainetta lisätään vesipatsaaseen, tarkoituksena on simuloida torjunta-aineiden lentosumutusta. Se kattaa alkuhuippupitoisuudet huokosvedessä. Menetelmä on hyödyllinen myös muuntyyppisissä altistuksissa (mukaan lukien kemikaalivuoto) lukuun ottamatta kertymisprosesseja, jotka kestävät kauemmin kuin testijakso.

3. Aineet, joita sedimentissä elävillä eliöillä testataan, säilyvät yleensä sedimentissä pitkään. Sedimentissä elävien eliöiden altistamiseen voidaan käyttää useita reittejä. Jokaisen altistusreitin suhteellinen tärkeys sekä toksiseen kokonaisvaikutukseen vaadittava aika määräytyvät käytettävän kemikaalin fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien mukaan. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow} > 5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, kontaminoituneen ravinnon nauttiminen voi olla tärkeä altistusreitti. Jotta hyvin rasvahakuisten aineiden myrkyllisyyttä ei aliarvioida, voidaan harkita ravinnon lisäämistä sedimenttiin ennen testiaineen lisäämistä. Jotta kaikki mahdolliset altistusreitit voidaan huomioida, tämä testimenetelmä keskittyy pitkäaikaiseen altistukseen. Testin kesto on 20–28 päivää *C. riparius*- ja *C. yoshimatsui* -lajeille ja 28–65 päivää *C. tentans* -lajille. Jos lyhytaikaisia tietoja tarvitaan tiettyyn tarkoitukseen, kuten epävakaiden kemikaalien vaikutusten tutkimiseen, ylimääräiset rinnakkaisnäytteet voidaan poistaa 10 päivän jälkeen.

4. Mitatut tutkittavat ominaisuudet ovat kuoriutuneiden täysikasvuisten kokonaismäärä ja kuoriutumiseen kulunut aika. Jos lyhytaikaiset lisätiedot ovat tarpeen, toukkien eloonjäämistä ja kasvua on suositeltavaa mitata vasta kymmenen päivän kuluttua käyttämällä ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä.

5. Synteettisen sedimentin käyttö on suositeltavaa. Synteettisellä sedimentillä on useita etuja luonnolliseen sedimenttiin verrattuna:

— kokeellinen vaihtelu vähenee, koska sedimentti on toistettava ”vakiomatriisi”, eikä kontaminoitumattomia ja puhtaita sedimenttilähteitä tarvitse etsiä

— testit voidaan aloittaa milloin tahansa ilman, että testisedimentin kausivaihtelua esiintyy, sedimentistä ei tarvitse poistaa alkuperäiselimistöä esikäsittelyllä ja lisäksi synteettisen sedimentin käyttö pienentää kuluja, joita rutiinitestaukseen tarvittavan sedimenttimäärän keräämisestä kentältä syntyy

— synteettisen sedimentin käyttö sallii toksisuuden vertailun ja aineiden lajittelemisen myrkyllisyyden mukaan: testien, joissa käytettiin luonnollista sedimenttiä ja synteettistä sedimenttiä, toksisuustiedot olivat verrattavissa useiden kemikaalien osalta (2).

6. Käytetyt määritelmät on esitetty lisäyksessä 1.

TESTIN PERIAATE

7. Surviaissääsken munatoukat altistetaan testiaineen pitoisuusalueelle vesi-sedimenttisysteemeissä. Testi aloitetaan lisäämällä munatoukkia dekantterilaseihin, joissa on vesi-sedimenttisysteemiä, ja lisäämällä sen jälkeen testiainetta veteen. Surviaissääskien kuoriutumisaste ja kehittymisnopeus mitataan testin lopussa. Toukkien eloonjäänti ja paino voidaan myös tarvittaessa mitata 10 päivän kuluttua (käytättämällä soveltuvia ylimääräisiä rinnakkaisnäytteitä). Nämä tiedot analysoidaan regressiomallilla, jolla arvioidaan pitoisuus, joka aiheuttaa X prosentin laskun kuoriutumisessa, toukkien eloonjäännissä tai painossa (esim. EC_{15}, EC_{50}), tai tilastollisen hypoteesin testillä, jolla määritetään NOEC/LOEC. Jälkimmäinen vaihtoehto edellyttää vaikutusarvojen vertaamista vertailuarvoihin tilastotutkimuksilla.

TESTIAINETTA KOSKEVIA TIETOJA

8. Testiaineen vesiliukoisuuden, höyrynpaineen, mitatun tai lasketun erottumisen erottuminen sedimenttiin sekä stabiiliuden vedessä ja sedimentissä on oltava tiedossa. Käytössä on oltava luotettava analyysimenetelmä, jolla testiaine voidaan kvantifioida sedimentin päällä olevassa vedessä, huokosvedessä ja sedimentissä, ja menetelmän tarkkuus ja havaitsemisraja tunnetaan ja ne on raportoitu. Hyödyllisiä tietoja ovat esimerkiksi rakennekaava ja testiaineen puhtaus. Myös testiaineen kemiallinen kohtalo (esim. häviäminen, abioottinen ja bioottinen hajoaminen) on hyödyllistä tietää. Kirjallisuusviitteessä (12) annetaan lisäohjeita sellaisten aineiden testauksesta, joiden fysikaalis-kemialliset ominaisuudet vaikeuttavat niiden testaamista.

VERTAILUKEMIKAALIT

9. Testimenettelyn ja testiolosuhteiden luotettavuus voidaan tarkistaa testaamalla ajoittain vertailukemikaaleja. Esimerkkejä vertailumyrkyistä, joita on käytetty onnistuneesti yhteistutkimuksissa ja validointitutkimuksissa: lindaani, trifluraliini, pentakloorifenoli, kadmiumkloridi ja kaliumkloridi. (1)(2)(5)(6)(13).

TESTIN LUOTETTAVUUS

10. Testi on luotettava, jos

— kuoriutuvuus kontrolleissa on vähintään 70 prosenttia testin lopussa (1)(6)

— *C. riparius* ja *C. yoshimatsui* aikuistuvat kontrolliastioissa 12–23 päivän kuluessa astiaan laittamisesta. *C. tentans* vaatii 20–65 päivää

— testin lopussa mitataan jokaisen astian pH ja liuenneen hapen pitoisuus. Happipitoisuuden täytyy olla vähintään 60 prosenttia ilman kyllästysarvosta (ASV) käytetyssä lämpötilassa, ja sedimentin päällä olevan veden pH-arvon pitää olla 6–9 kaikissa testiastioissa

— veden lämpötila vaihtelee enintään ± 1,0 °C. Veden lämpötilaa voidaan kontrolloida tasalämpöisessä huoneessa, jolloin huoneen lämpötila on tarkistettava soveliain väliajoin.

MENETELMÄN KUVAUS

Testiastiat

11. Tutkimus tehdään 600 ml:n dekantterilaseissa, joiden halkaisija on 8 cm. Muitakin astioita voidaan käyttää, kunhan sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys on sopiva. Sedimentin pinta-alan on oltava riittävä, jotta tilaa on 2–3 cm^2 toukkaa kohden. Sedimenttikerroksen ja sen päällä olevan veden syvyyden suhteen on oltava 1:4. Testiastioiden ja muiden testijärjestelmän kanssa kosketuksissa olevien välineiden on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia (esim. teflonia).

Lajin valinta

12. Paras laji tähän testiin on *Chironomus riparius. Chironomus tentans* soveltuu myös, mutta sen käsittely on hankalampaa ja se edellyttää pidempää testijaksoa. Myös *Chironomus yohimatsui* -lajia voidaan käyttää. Tietoa *Chironomus riparius* -lajin kasvatusmenetelmistä on lisäyksessä 2. Myös muiden lajien kasvatusolosuhteista on saatavissa tietoa: *Chironomus tentans* (4) and *Chironomus yoshimatsui* (11). Lajin tunnistus on varmistettava ennen testiä, mutta sitä ei ole tarpeen tehdä ennen joka testiä, jos eliöt ovat peräisin omasta kasvattamosta.

Sedimentti

13. Synteettisen sedimentin (keinosedimentin) käyttö on suositeltavaa. Jos kuitenkin käytetään luonnollista sedimenttiä, se on kuvailtava (vähintään pH, orgaaninen kokonaishiilipitoisuus, mutta myös muut parametrit, kuten C/N-suhde ja rakeisuus ovat suositeltavia), eikä siinä saa olla kontaminaatiota tai muita organismeja, jotka saattavat kilpailla chironomid-eliöiden kanssa tai syödä ne. Lisäksi on suositeltavaa, että luonnollista sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat. Tätä testiä varten suositellaan seuraavaa synteettistä sedimenttiä, joka perustuu testimenetelmässä C.8 (14) käytettyyn keinomaahan (1)(15)(16):

a) 4–5 % (kuivapaino) turvetta: pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0; on tärkeää käyttää ainoastaan ilmakuivattua jauhemaista turvetta, joka on jauhettu hienoksi (hiukkaskoko ≤ 1 mm)

b) 20 % (kuivapaino) kaoliniittisavea (kaoliniitin osuus mieluiten yli 30 %)

c) 75–76 % (kuivapaino) kvartsihiekkaa (pääosin hienoa hiekkaa, yli 50 prosenttia 50–200 µm:n hiukkasia)

d) deionisoitua vettä lisätään, kunnes lopullisen seoksen kosteus on 30–50 %

e) kemiallisesti puhdasta kalsiumkarbonaattia ($CaCO_3$) lisätään, jotta lopullisen sedimenttiseoksen pH-arvoksi tulee 7,0 ± 0,5

f) orgaanisen hiilen pitoisuuden on oltava lopullisessa seoksessa 2 % (± 0,5 %). Sitä voidaan säätää lisäämällä sopiva määrä turvetta ja hiekkaa kohtien a ja c mukaisesti.

14. Turpeen, kaoliniittisaven ja hiekan alkuperän on oltava tiedossa. Tarkista, ettei sedimentin ainesosissa ole kemikaalista kontaminaatiota (esim. raskasmetalleja, orgaanisia klooriyhdisteitä ja orgaanisia fosforiyhdisteitä). Esimerkki synteettisen sedimentin valmistuksesta on lisäyksessä 3. Myös kuivien ainesosien sekoittaminen on hyväksyttävää, jos voidaan osoittaa, että sedimentin ainesosat eivät erotu (esim. kelluvia turvehiukkasia) veden lisäämisen jälkeen ja että turve tai sedimentti on sopeutunut tarpeeksi.

Vesi

15. Testivedeksi soveltuu vesi, joka täyttää lisäyksissä 2 ja 4 luetellut laimennusveden kemialliset ominaisuudet. Kasvatus- ja testivedeksi soveltuu mikä tahansa vesi, luonnonvesi (pinta- tai pohjavesi), synteettinen vesi (katso lisäys 2) tai talousvesi, josta on poistettu kloori, jos surviaissääsket voivat elää siinä viljelyn ja testauksen ajan osoittamatta stressaantumisen merkkejä. Testiveden pH-arvon on oltava testin alussa 6–9, eikä kokonaiskovuus $CaCO_3$:na saa olla yli 400 mg/l. Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä). Samantyyppistä vettä on käytettävä koko tutkimuksen ajan. Lisäyksessä 4 luetellut vedenlaadun ominaisuudet on mitattava vähintään kahdesti vuodessa tai aina kun on epäilystä siitä, että nämä ominaisuudet ovat voineet muuttua merkittävästi.

Kantaliuokset – vesi, johon on lisätty testiainetta

16. Testipitoisuudet lasketaan vesipatsaan eli sedimentin päällä olevan veden pitoisuuksien perusteella. Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan tavallisesti kantaliuoksista laimentamalla. Kantaliuokset valmistetaan mieluiten liuottamalla testiainetta testiviljelyaineeseen. Liuottimien tai dispergointiaineiden käyttö voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän kantaliuoksen valmistamiseksi. Esimerkkejä sallituista liuottimista ovat asetoni, etanoli, metanoli, etyleeniglykolimonoetyylieetteri, etyleeniglykolidimetyylieetteri, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sallittuja dispergointiaineita ovat Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metyyliselluloosa ja HCO-40. Liuotusapuaineen pitoisuuden on oltava mahdollisimman pieni lopullisessa testiviljelyaineessa (≤ 0,1 ml/l), ja sen on oltava sama kaikissa käsittelyissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta eloonjäämiseen eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia varhaisiin kehitysvaiheisiin. Se on osoitettava ainoastaan liuotinta sisältävän kontrollin avulla. Näiden aineiden käyttöä on kuitenkin vältettävä mahdollisimman pitkälle.

TESTISUUNNITELMA

17. ”Testisuunnitelma” tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, astioiden lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja toukkien lukumäärää astiaa kohti. Suunnitelmat EC-pisteen arviointia, NOEC:n määritystä ja rajatestin tekemistä varten on kuvattu. Regressioanalyysi on parempi vaihtoehto kuin hypoteesin testaus.

Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma

18. Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. EC_{15}, EC_{50}) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta. Tarkkuus ja etenkin luotettavuus, jolla vaikutuspitoisuuksien (EC_x) estimaatit voidaan tehdä, paranee yleensä, kun vaikutuspitoisuus sijoittuu testattujen pitoisuuksien alueelle. Ekstrapolointia paljon matalimman positiivisen pitoisuuden alle tai korkeimman pitoisuuden ylle on vältettävä. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa (katso kohta 27).

19. Jos halutaan arvioida EC_x, jokaisesta pitoisuudesta tarvitaan vähintään viisi testipitoisuutta ja kolme rinnakkaisnäytettä. On joka tapauksessa suositeltavaa käyttää riittäviä testipitoisuuksia, jotta mallin estimointi onnistuu hyvin. Pitoisuuksien välinen kerroin ei saa olla yli kaksi (poikkeus voidaan tehdä, jos annosvastekäyrä on loiva). Käsittelyssä käytettävien toistojen määrää voidaan laskea, jos eri vasteita aiheuttavien testipitoisuuksien määrää nostetaan. Jos toistojen määrää lisätään tai testipitoisuuden välejä pienennetään, testin luottamusväli yleensä kapenee. Toistoja tarvitaan lisää, jos halutaan arvioida toukkien eloonjäänti ja kasvu 10 päivän aikana.

NOEC:n/LOEC:n estimointiin suositeltava testisuunnitelma

20. Jos halutaan arvioida LOEC tai NOEC, on käytettävä vähintään viittä testipitoisuutta ja vähintään neljää toistoa, eikä pitoisuuksien välinen kerroin saa olla yli kaksi. Toistojen määrän on oltava riittävän suuri, jotta tilastollinen voima on riittävä ja kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla (p = 0,05). Kehittymisnopeuteen soveltuu yleensä varianssianalyysi (ANOVA), kuten Dunnett-testi ja Williams-testi (17)(18)(19)(20). Kuoriutumisasteeseen voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferronin korjauksella) tai Mantel-Haenszelin testiä.

Rajatesti

21. Rajatesti (yksi testipitoisuus ja kontrolli) voidaan tehdä, jos alustavassa pitoisuusalueen määrityksessä ei havaittu vaikutuksia. Rajatestin tarkoituksena on osoittaa, että testiaineen toksisuusarvo on suurempi kuin testattu rajapitoisuus. Tässä testimenetelmässä ei voida suositella pitoisuutta, joten asia jätetään sääntelyviranomaisten harkittavaksi. Yleensä vähintään kuusi rinnakkaisnäytettä sekä testi- että kontrollinäytteestä on tarpeen. On osoitettava, että tilastollinen voima on riittävä, jotta kontrollista havaitaan 20 prosentin ero viiden prosentin merkitsevyystasolla (p = 0,05). Jos vaste on metrinen (kehittymisnopeus ja paino), t-testi on soveltuva tilastollinen menetelmä, jos tiedot täyttävät tämän testin vaatimukset (normaalisuus, homogeeniset vaihtelut). Jos vaatimukset eivät täyty, voidaan käyttää t-testiä, jossa varianssit ovat heterogeenisia, tai parametritonta testiä, kuten Wilcoxon-Mann-Whitheyn testiä. Fisherin tarkka testi soveltuu kuoriutumisasteeseen.

MENETTELY

Altistumisolosuhteet

Vesi-sedimenttisysteemin valmistelu käyttäen vettä, johon tutkittavaa ainetta on lisätty

22. Testiastioihin lisätään sopiva määrä synteettistä sedimenttiä (katso kohdat 13–14 ja lisäys 3), jotta kerroksen paksuus on vähintään 1,5 cm. Vettä lisätään, kunnes sen syvyys on 6 cm (katso kohta 15). Sedimenttikerroksen ja veden syvyyden suhde ei saa olla yli 1:4, eikä sedimenttikerroksen paksuus saa olla yli 3 cm. Vesi-sedimenttisysteemiä on ilmastettava varovasti seitsemän päivää ennen testiorganismien lisäämistä (katso kohta 14 ja lisäys 3). Sedimentin voi peittää muovikiekolla, kun vettä kaadetaan päälle, jotta sedimentin ainesosien erottuminen ja hienon materiaalin resuspensio voidaan välttää, mutta kiekko on poistettava heti tämän jälkeen. Myös muut välineet voivat olla sopivia.

23. Testiastiat on peitettävä (esim. lasilevyillä). Jos vettä haihtuu tutkimuksen aikana, lisää vettä, kunnes veden tilavuus on alkuperäisellä tasolla. Käytä tähän tarkoitukseen tislattua tai deionisoitua vettä, jotta suoloja ei keräydy.

Testiorganismien lisääminen

24. Neljä tai viisi päivää ennen testiorganismien lisäämistä munamassat otetaan viljelmistä ja pannaan pieniin astioihin kasvatusalustassa. Alustana voidaan käyttää kantaliuoksesta saatua kypsynyttä alustaa tai vasta valmistettua alustaa. Jälkimmäisessä tapauksessa kasvatusalustaan lisätään pieni määrä ravintoa, kuten viherlevää ja/tai muutama pisara hienoksi jauhetuista kalanruokahiutaleista saatua suodosta (katso lisäys 2). Käytä ainoastaan vastamunittuja munamassoja. Tavallisesti toukat alkavat kuoriutua muutama päivä munimisen jälkeen (*Chironomus riparius* 2–3 vrk lämpötilassa 20 °C, *Chironomus tentans* 1–4 vrk lämpötilassa 23 °C ja *Chironomus yoshimatui* 1–4 vrk lämpötilassa 25 °C), ja toukkien kasvu tapahtuu neljässä vaiheessa, joista jokainen kestää 4–8 päivää. Testissä käytetään ensimmäisen kehitysvaiheen munatoukkia (2–3 tai 1–4 vrk kuoriutumisen jälkeen). Sääskien kehitysvaiheen voi tarkistaa pääkapselin leveydestä (6).

25. Kaksikymmentä munatoukkaa sijoitetaan satunnaisesti tylpällä pipetillä jokaiseen testiastiaan, jossa on testiainetta sisältävää sedimenttiä ja vettä. Veden ilmastus on lopetettava, kun toukkia lisätään testiastioihin eikä sitä saa aloittaa 24 tuntiin toukkien lisäämisen jälkeen (katso kohdat 24 ja 32). Käytetyn testisuunnitelman (katso kohdat 19 ja 20) mukaisesti toukkien määrä pitoisuutta kohti on vähintään 60 EC-pisteen arviointia varten ja 80 NOEC-määritystä varten.

26. 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen sedimentin päällä olevaan veteen lisätään testiainetta, ja aloitetaan kevyt ilmastus. Pieni määrä testiaineliuosta lisätään pipetillä vedenpinnan alle. Sen jälkeen sedimentin päällä oleva vesi sekoitetaan varoen häiritsemästä sedimenttiä.

Testipitoisuudet

27. Raja-annostesti voi auttaa määrittämään pitoisuusaluetta varsinaista testiä varten. Tähän tarkoitukseen käytetään testiaineen pitoisuuksia laajoin pitoisuusvälein. Jotta surviaissääskien pintatiheys on sama, jota käytetään varsinaisessa testissä, surviaissääsket altistetaan jokaiselle testiaineen pitoisuudelle siksi aikaa, että sopivat testipitoisuudet voidaan arvioida. Rinnakkaisnäytteitä ei tarvita.

28. Varsinaisessa testissä käytettävät testipitoisuudet päätetään raja-annostestin perusteella. Käytössä on oltava vähintään viisi pitoisuutta, jotka valitaan kohdissa 18 ja 20 kuvatulla tavalla.

Kontrollit

29. Testissä on käytettävä kontrolliastioita, joissa on sedimenttiä mutta ei testiainetta, ja soveltuvaa määrää rinnakkaisnäytteitä (katso kohdat 19–20). Jos testiaineen lisäyksessä on käytetty liuotinta (katso kohta 16), sedimentin liuotinkontrolli on lisättävä.

Testijärjestelmä

30. Käytettävät järjestelmät ovat staattisia. Puolistaattisia tai läpivirtausjärjestelmiä, joissa sedimentin yläpuolinen vesi uusiutuu ajoittain tai jatkuvasti, voidaan käyttää poikkeustapauksissa, kuten jos vedenlaatu ei sovellu testiorganismille tai vaikuttaa kemialliseen tasapainoon (esim. liuenneen hapen pitoisuus laskee liian matalaksi, erityistuotteiden pitoisuus nousee liian korkeaksi tai sedimentistä uuttuu kivennäisaineita, jotka vaikuttavat pH-arvoon ja/tai veden kovuuteen). Yleensä muut sedimentin päällä olevan veden laatua kohentavat toimet, kuten ilmastus, ovat kuitenkin riittäviä ja suositeltavia.

Ravinto

31. Toukkia on ruokittava mieluiten päivittäin tai vähintään kolmesti viikossa. Riittävä määrä kalanruokaa (suspensiona vedessä tai hienoksi jauhettuna, esim. TetraMin tai TetraPhyll, lisätietoja lisäyksessä 2) on 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatui* -lajille) päivässä toukkaa kohden ensimmäisten 10 päivän aikana. Tätä vanhemmat toukat voivat tarvita vähän enemmän ruokaa: 0,5–1 mg päivässä toukkaa kohden pitäisi riittää testin loppuun saakka. Ruoan määrää pitää pienentää kaikissa käsittelyissä ja säädellä, jos sienikasvua ilmenee tai kontrolleissa esiintyy kuolleisuutta. Jos sienikasvua ei saada loppumaan, testi on toistettava. Jos kyseessä on voimakkaasti adsorboiva aine (esim. log K_{ow}>5) tai aine, joka sitoutuu kovalenttisesti sedimenttiin, organismien eloonjääntiin ja luontaiseen kasvuun tarvittava ravinnon määrä voidaan lisätä synteettiseen sedimenttiin ennen stabiloitumisvaihetta. Tässä tapauksessa on käytettävä kalanruoan sijaan kasviainesta, kuten 0,5 prosenttia (kuivapaino) nokkosen (*Urtica dioica*), valkomulperin (*Morus alba*), valkoapilan (*Trifolium repens*), pinaatin (*Spinacia oleracea*) tai muun kasviaineksen (*Cerophyl* tai alfaselluloosan) hienoksi jauhettuja lehtiä.

Inkubaatio-olosuhteet

32. Sedimentin päällä olevaa vettä aletaan ilmastaa varovasti mieluiten 24 tuntia toukkien lisäämisen jälkeen, ja ilmastusta jatketaan testin loppuun saakka (on pidettävä huoli, ettei liuenneen hapen pitoisuus laske alle 60 prosenttiin ilman kyllästysarvosta). Ilmastus tapahtuu lasisella Pasteur-pipetillä, joka on kiinnitetty 2–3 senttiä sedimenttikerroksen yläpuolelle (yksi tai muutama kupla sekunnissa). Haihtuvia kemikaaleja testattaessa voidaan harkita, jätetäänkö vesi-sedimenttisysteemi ilmastamatta.

33. Testi tehdään vakiolämpötilassa 20 °C (± 2 °C). Suositeltu lämpötila *C. tentans* -lajille on 23 °C (± 2 °C) ja *C. yoshimatui* -lajille 25 °C (± 2 °C). Valoisa aika on 16 tuntia, ja valon voimakkuuden pitää olla 500–1 000 luksia.

Altistuksen kesto

34. Altistus alkaa, kun toukat lisätään astioihin, joissa on testiainetta, ja kontrolliastioihin. Altistuksen enimmäiskesto on 28 vuorokautta lajeille *C. riparius* ja *C. yoshimatsui*, ja 65 vuorokautta lajille *C. tentans*. Jos sääsket kuoriutuvat aikaisemmin, testi voidaan lopettaa vähintään viisi päivää sen jälkeen, kun viimeinen surviaissääski on kasvanut täysikasvuiseksi kontrollissa.

HAVAINNOT

Kuoriutuminen

35. Kehitysaika ja täysin kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien yhteismäärä määritetään. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

36. Testiastioita on tarkkailtava vähintään kolmesti viikossa ja epänormaalia käyttäytymistä on arvioitava silmämääräisesti (esim. sedimentistä poistuminen, epätavallinen uinti) kontrolliin verrattuna. Sääsket on laskettava päivittäin, kun kuoriutuminen on odotettavissa. Täysikasvuisten sääskien sukupuoli ja lukumäärä kirjataan päivittäin. Tunnistuksen jälkeen sääsket poistetaan astioista. Ennen testin loppua mahdollisesti munitut munamassat on kirjattava ylös ja poistettava, jottei sedimenttiin tule lisää toukkia. Myös niiden näkyvissä olevien koteloiden määrä, jotka eivät ole kuoriutuneet, on merkittävä ylös. Kuoriutumisen mittausohjeet ovat lisäyksessä 5.

Kasvu ja eloonjäänti

37. Jos tiedot 10 vuorokauden toukkien eloonjäännistä ja kasvusta tarvitaan, testin alussa on otettava käyttöön ylimääräisiä testiastioita myöhempää käyttöä varten. Toukat seulotaan ylimääräisten astioiden sedimentistä 250 µm:n seulalla. Kuolleiksi lasketaan toukat, jotka eivät liiku tai reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin. Myös ne toukat, joita ei otettu talteen, lasketaan kuolleiksi (mikrobit ovat saattaneet hajottaa testin alussa kuolleet toukat). Eloonjääneiden toukkien (tuhkaton) kuivapaino testiastiaa kohden määritetään ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiassa lasketaan. On hyödyllistä määrittää, missä kehitysvaiheessa eloonjääneet toukat ovat. Tähän tarkoitukseen voidaan mitata kunkin toukan pääkapselin leveys.

Mittaukset

Testiaineen pitoisuus

38. Vähintään sedimentin päällä olevan veden, huokosveden ja sedimentin näytteet analysoidaan testin alussa (mieluiten yksi tunti testiaineen lisäämisen jälkeen) ja lopussa suurimmassa pitoisuudessa ja matalammassa pitoisuudessa. Testiaineen pitoisuudesta saadaan tietoa testiaineen käyttäytymisestä ja jakautumisesta vesi-sedimenttisysteemissä. Sedimenttinäytteen ottaminen testin alussa voi vaikuttaa testijärjestelmään (esim. testitoukkia poistuu), joten testin alussa ja testin aikana tehtäviä analyyttisiä määrityksiä varten on tarvittaessa käytettävä ylimääräisiä

testiastioita (katso kohta 39). Sedimentin mittaukset eivät välttämättä ole tarpeen, jos testiaineen jakautuminen veden ja sedimentin välille on määritetty selkeästi vesi/sedimentti-tutkimuksessa vastaavissa olosuhteissa (esim. sedimentin ja veden suhde, sovelluksen tyyppi, orgaanisen hiilen pitoisuus sedimentissä).

39. Jos välimittauksia tehdään (esim päivänä 7) ja analyysiin tarvitaan suuria näytteitä, joiden ottaminen testiastioista vaikuttaisi testijärjestelmään, analyyttisiin määrityksiin käytetään ylimääräisistä testiastioista otettuja näytteitä. Näitä astioita käsitellään samalla tavoin kuin testiastioita (mukaan lukien testiorganismien lisääminen), mutta niitä ei käytetä biologiseen havainnointiin.

40. Huokosveden suositeltava eristystapa on sentrifugointi (esim. 10 000 g ja 4 °C 30 minuutin ajan). Jos on kuitenkin osoitettu, että testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää. Joskus pitoisuuksien analysointi huokosvedestä ei ole mahdollista, koska näyte on liian pieni.

Fysikaalis-kemialliset parametrit

41. Testiastioiden pH ja lämpötila sekä testiveteen liuennut happi on mitattava asiaankuuluvasti (katso kohta 10). Kovuus ja ammoniakki on mitattava kontrolliastioissa ja yhdessä testiastiassa suurimmalla pitoisuudella testin alussa ja lopussa.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

42. Tämän testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutus uros- ja naarassääskien kehittymisnopeuteen ja täysin kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärään. 10 päivän testissä määritetään vaikutukset toukkien eloonjäämiin ja painoon. Jos eri sukupuolten herkkyydessä ei ilmene tilastollisesti merkitsevää eroa, urosten ja naaraiden tulokset voidaan yhdistää tilastollisia analyysejä varten. Sukupuolten väliset herkkyyserot voidaan määrittää tilastotieteellisesti esimerkiksi χ^2-r × 2 -taulukkotestillä. Toukkien eloonjäänti ja yksilön keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden määritetään 10 päivän kuluttua, jos tarpeen.

43. Vaikutuspitoisuudet ilmaistaan pitoisuuksina sedimentin päällä olevassa vedessä, ja vaikutuspitoisuudet lasketaan mieluiten testin alussa mitattujen sedimenttipitoisuuksien perusteella (katso kohta 38).

44. EC_{50}:n tai minkä tahansa muun EC_x:n piste-estimaattia laskettaessa astiakohtaisia tilastotietoja voidaan käyttää aitoina toistoina. Laskettaessa minkä tahansa EC_x-arvon luottamusväliä astioiden välinen vaihtelu on otettava huomioon tai vaihtoehtoisesti osoitettava vaihtelu niin pieneksi, että se voidaan jättää huomiotta. Jos malliin sovelletaan pienimmän neliösumman menetelmää, astiakohtaisiin tilastotietoihin on sovellettava muunnosta, jotta varianssin homogeenisuus paranee. EC_x-arvot on kuitenkin laskettava sen jälkeen, kun vaste on muunnettu takaisin alkuperäisarvoon.

45. Kun NOEC/LOEC on tarkoitus määrittää tilastollisen hypoteesin testillä, astioiden välinen vaihtelu on huomioitava esimerkiksi hierarkkisella ANOVAlla. Robustimpia testejä (21) voidaan käyttää soveltuvissa tilanteissa, kun tavalliset ANOVAn oletukset eivät täyty.

Kuoriutumisaste

46. Kuoriutumisasteet ovat dikotomisia tietoja, ja ne voidaan analysoida Cochran-Armitagen testillä, jota sovelletaan alaspäin askeltavasti, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa, ja näitä tietoja pidetään tämän odotuksen mukaisina. Jos näin ei ole, voidaan käyttää Fisherin tarkkaa testiä tai Mantel-Haenszelin testiä, jossa p-arvot on korjattu Bonferroni-Holmin menetelmällä. Jos on näyttöä siitä, että saman pitoisuuden toistojen välinen varianssi on suurempi kuin binomijakauma antaa edellyttää (ylihajonta), voidaan käyttää Cochran-Armitagen testiä tai Fisherin tarkkaa testiä (21).

47. Kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa (n_e) määritetään, ja summa jaetaan lisättyjen sääskien määrällä (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

jossa:

ER = kuoriutumisaste

n_e = kuoriutuneiden sääskien määrä astiassa

n_a = astiaan lisättyjen toukkien määrä

48. Kun näytekoko on suuri ja ylihajontaa esiintyy, paras vaihtoehto on pitää kuoriutumisastetta jatkuvana vasteena ja käyttää esimerkiksi Williamsin testiä, kun monotoninen annosvaste on odotettavissa ja yhdenmukainen kuoriutumisastetietojen kanssa. Dunnettin testi soveltuu, kun monotonisuutta ei esiinny. Näytekoko määritetään tässä suureksi, jos sekä kuoriutuneiden että kuoriutumattomien toukkien määrä on toistossa (astiassa) yli viisi.

49. Jos halutaan soveltaa ANOVA-menetelmiä, ER-arvot on ensin muunnettava arcsin-neliöjuuri-muunnoksella tai Freeman-Tukeyn muunnoksella, jotta saadaan likimääräinen normaalijakauma ja varianssi tasoittuu. Cochran-Armitagen testiä, Fisherin tarkkaa testiä (Bonferroni) tai Mantel-Haenszelin testiä voidaan soveltaa, kun käytetään absoluuttisia frekvenssejä. Arcsin-neliöjuuri-muunnosta sovelletaan ottamalla kuoriutumisasteen neliöjuuren käänteinen sini ($\sin^{-1}$).

50. Kuoriutumisasteissa EC_x-arvot lasketaan käyttämällä regressioanalyysiä (tai esim. probit- (22), logit- tai Weibull-mallia tai soveltuvaa kaupallista ohjelmistoa). Jos regressioanalyysi epäonnistuu (esim. osittaisia vasteita on alle kaksi), käytetään muita parametrittomia menetelmiä, kuten liukuvaa keskiarvoa tai yksinkertaista interpolaatiota.

Kehittymisnopeus

51. Keskimääräinen kehittymisaika edustaa keskimääräistä ajanjaksoa toukkien lisäämisestä (testipäivä 0) kokeellisen sääskikohortin kuoriutumiseen. (Aidon kehittymisajan laskennassa on huomioitava toukkien ikä lisäyshetkellä.) Kehittymisnopeus on kehittymisajan käänteisluku (yksikkö: 1/vrk) ja edustaa päivässä tapahtuvaa toukkien kehittymistä. Kehittymisnopeuden käyttö on suositeltavaa näiden sedimentin toksisuuskokeiden arvioinnissa, sillä sen varianssi on pienempi ja se on homogeenisempi ja lähempänä normaalijakaumaa kuin kehittymisaika. Siksi tehokkaita parametritestimenetelmiä käytetään mieluummin kehittymisnopeuden kuin kehittymisajan kanssa. Kun kehittymisnopeus on jatkuva vaste, EC_x-arvot voidaan estimoida regressioanalyysillä (esim. (23) ja (24)).

52. Seuraavissa tilastollisissa testeissä oletetaan, että tarkastuspäivänä x havaittu sääskimäärä kuoriutuu päivän x ja päivän x-l välissä (l = tarkastusvälin pituus, yleensä 1 päivä). Keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa (x) lasketaan seuraavasti:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

jossa:

$\bar{x}$: keskimääräinen kehittymisnopeus astiassa

i: tarkastusvälin indeksi

m: tarkastusvälien enimmäismäärä

f_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien määrä

n_e: testin lopussa kuoriutuneiden sääskien kokonaismäärä ($=\sum f_i$)

x_i: tarkastusvälissä i kuoriutuneiden sääskien kehittymisnopeus

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

jossa:

day_i: tarkastuspäivä (päivää lisäyksen jälkeen)

l_i: tarkastusvälin i pituus (päivissä, yleensä 1 päivä)

Testiraportti

53. Testiraportin on sisällettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikaalis-kemialliset ominaisuudet (vesiliukoisuus, höyrynpaine, jakaantumiskerroin maa-aineksessa (tai sedimentissä, jos saatavissa), stabiilisuus vedessä jne.)

— kemialliset tunnistetiedot (yleisnimi, kemiallinen nimi, rakennekaava, CAS-numero jne.) sekä puhtaus ja testiaineen kvantifioinnissa käytetty analyysimenetelmä.

Testilajit:

— käytetyt koe-eläimet: lajit, tieteellinen nimi, eliöiden lähde ja kasvatusolosuhteet

— tiedot munamassojen ja toukkien käsittelystä

— koe-eläinten ikä testiastioihin lisättäessä.

Testiolosuhteet:

— käytetty sedimentti, eli luonnollinen vai synteettinen sedimentti

— luonnollisen sedimentin osalta sedimentin näytteenottopaikan sijainti ja kuvaus, mukaan lukien, jos mahdollista, kontaminaatiohistoria, ominaisuudet: pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, C/N-suhde ja rakeisuus (tarvittaessa)

— synteettisen sedimentin valmistus: ainesosat ja niiden ominaisuudet (orgaanisen hiilen pitoisuus, pH, kosteus jne. testin alussa)

— testiveden valmistus (jos käytetään synteettistä vettä) ja ominaisuudet (happipitoisuus, pH, johtavuus, kovuus jne. testin alussa)

— sedimentin ja sen päällä olevan veden syvyys

— sedimentin päällä olevan veden ja huokosveden tilavuus, märän sedimentin paino huokosveden kanssa ja ilman huokosvettä

— testiastiat (materiaali ja koko)

— kantaliuosten valmistusmenetelmät ja testipitoisuudet

— testiaineen lisääminen: käytetyt testipitoisuudet, toistojen määrä ja mahdollisen liuottimen käyttö

— inkubaatio-olosuhteet: lämpötila, valojakso ja valon voimakkuus, ilmastus (taajuus ja voimakkuus)

— yksityiskohtaiset tiedot syöttämisestä, kuten ravinnon tyyppi, valmistus, määrä ja syöttöaikataulu.

Tulokset:

— kaikki nimelliset testipitoisuudet, mitatut testipitoisuudet ja tulokset kaikista analyyseistä, joilla määritettiin testiaineen pitoisuus testiastiassa

— testiastioissa olevan veden laatu, eli pH, lämpötila, liuennut happi, kovuus ja ammoniakki

— mahdollinen haihtuneen testiveden korvaus

— kuoriutuneiden uros- ja naarassääskien määrä astiassa päivää kohden

— kuoriutumattomien toukkien määrä astiassa

— toukkien keskimääräinen kuivapaino astiaa kohden, kehitysasteittain jos tarpeen

— kuoriutumisprosentti rinnakkaisnäytteessä ja testipitoisuudessa (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— täysin kuoriutuneiden sääskien keskimääräinen kehittymisnopeus rinnakkaisnäytteessä ja testissä (uros- ja naarassääsket yhteensä)

— toksisten tutkittavien ominaisuuksien estimaatit, kuten EC_x (ja siihen liittyvät luottamusvälit), NOEC ja/tai LOEC, ja niiden määrittämiseen käytetyt tilastolliset menetelmät

— tulosten pohdinta, mukaan luettuna mahdolliset vaikutukset, joita tästä testimenetelmästä poikkeamisella on ollut testin tuloksiin.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8) US-EPA/OPPTS 850,1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.

11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47–57.

12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14) Tämän liitteen luku C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.

18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.

20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.

21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.

22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.

23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.

24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Tässä testimenetelmässä käytetään seuraavia määritelmiä:

Synteettinen sedimentti on luonnollisen sedimentin fyysisiä ainesosia jäljittelevistä materiaaleista valmistettu seos.

Yläpuolinen vesi on testiastiassa sedimentin päällä oleva vesi.

Huokosvesi on sedimenttirakeiden välissä olevaa vettä.

Vesi, johon on lisätty testiaine.

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Lisäys 2

***Chironomus riparius* -lajin kasvatussuosituksia**

1. *Chironomus*-toukkia voi kasvattaa kiteytysmaljoissa tai suurissa astioissa. Astian pohjalle levitetään noin 5–10 mm:n paksuinen kerros hienoa kvartsihiekkaa. Myös piimaa (esim. Merck, tuotenro 8117) on osoitettu soveltuvaksi substraatiksi (ohuempi, enintään muutaman millimetrin paksuinen kerros riittää). Sen jälkeen lisätään monta senttiä soveltuvaa vettä. Jos haihtumista tapahtuu, kuivuminen on estettävä lisäämällä vettä tarvittaessa. Vesi voidaan vaihtaa tarvittaessa. Varovainen ilmastus on tarpeen. Toukkien kasvatusastioita on säilytettävä soveltuvassa häkissä, jotta kuoriutuvat aikuiset eivät pääse pakenemaan. Häkin on oltava tarpeeksi tilava, jotta kuoriutuneet aikuiset mahtuvat parveilemaan. Muutoin parittelua ei välttämättä tapahdu (vähimmäiskoko on n. 30 × 30 × 30 cm).

2. Häkkejä säilytetään huoneenlämmössä tai huoneessa, jonka lämpötila on vakioitu (20 ± 2 °C). Valoisa jakso on 16 tuntia (voimakkuus n. 1 000 luksia), pimeys 8 tuntia. On ilmoitettu, että lisääntyminen voi estyä, jos ilman suhteellinen kosteus on alle 60 prosenttia.

Laimennusvesi

3. Mitä tahansa soveltuvaa luonnollista tai synteettistä vettä voidaan käyttää. Kaivovesi, talousvesi, josta on poistettu kloori, ja keinotekoinen neste (esim. Elendtin "M4"- tai "M7"-liuos, ks. jäljempänä) ovat yleisesti käytettyjä. Vesi on ilmastettava ennen käyttöä. Kasvatusvesi voidaan tarvittaessa uusia kaatamalla tai lappamalla käytetty vesi kasvatusastioista varoen tuhoamasta toukkaputkia.

Toukkien ruokinta

4. *Chironomus*-toukat ruokitaan kalojen hiutaleruoalla (TetraMin®, TetraPhyll® tai muu vastaava kaupallinen kalanruoka), jota annetaan noin 250 mg astiaa kohden päivässä. Ruoka voidaan antaa kuivana jauheena tai suspensiona vedessä: 1,0 g hiutaleruokaa lisätään 20 ml:aan laimennusvettä ja seos sekoitetaan homogeeniseksi. Tätä valmistetta voi antaa noin 5 ml astiaa kohden päivässä (ravista ennen käyttöä). Vanhoille toukille voi antaa enemmän ruokaa.

5. Ruokkimista säädellään vedenlaadun mukaan. Jos kasvatusalusta muuttuu sameaksi, ravinnon määrää on vähennettävä. Ravinnon määrän lisäämistä on seurattava tarkasti. Jos ravintoa on liian vähän, toukat siirtyvät kohti vesipatsasta, ja jos ravintoa on liian paljon, mikrobien toiminta voi lisääntyä ja happipitoisuudet laskea. Kumpikin vaihtoehto voi laskea kasvunopeutta.

6. Vähän viherlevän (esim. *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) soluja voidaan lisätä, kun uusia kasvatusastioita perustetaan.

Kuoriutuneiden aikuisten ruokinta

7. Eräät kokeen suorittajat ovat ehdottaneet, että kylläisessä sakkaroosiliuoksessa liotettu vanutuppo saattaa riittää kuoriutuneiden aikuisten ravinnoksi.

Kuoriutuminen

8. Kun lämpötila on 20 ± 2 °C, toukkien kasvatusastioista alkaa kuoriutua aikuisia noin 13–15 päivän kuluttua. Urokset tunnistaa helposti sulkamaisista tuntosarvista.

Munamassat

9. Kun kasvatushäkissä on aikuisia, kaikista toukkien kasvatusastioista on tarkistettava kolme kertaa viikossa, onko niissä hyytelömäisiä munamassoja. Jos munamassoja on, ne on poistettava varovasti. Ne siirretään pieneen astiaan, jossa on pieni määrä kasvatusvettä. Munamassoja voi käyttää uuden viljelyastian perustamiseen (esim. 2–4 munamassaa astiaa kohden) tai toksisuustesteihin.

10. Munatoukkien pitäisi kuoriutua 2–3 päivän kuluttua.

Uusien viljelyastioiden perustaminen

11. Kun viljelmät on perustettu, uuden toukkaviljelyastian voi aloittaa testivaatimusten mukaan kerran viikossa tai harvemmin. Vanhat astiat poistetaan, kun aikuiset sääsket ovat kuoriutuneet. Näin saadaan säännöllisesti aikuisia mahdollisimman vähäisellä vaivalla.

Testiliuosten ”M4” ja ”M7” valmistus

12. Elendt (1990) kuvasi ”M4”-liuoksen. ”M7”-liuos valmistetaan samoin kuin ”M4” lukuun ottamatta taulukossa 1 merkittyjä aineita, joiden pitoisuus on neljä kertaa pienempi ”M7”-liuoksessa kuin ”M4”-liuoksessa. ”M7”-liuosta koskeva julkaisu on valmisteilla (Elendt, henkilökohtainen viesti). Testiliuosta ei valmisteta Elendtin ja Biasin mukaan (1990), sillä kantaliuosten valmistusta varten annetut $NaSiO_3$-, 5 H_2O-, $NaNO_3$-, KH_2PO_4- ja K_2HPO_4-pitoisuudet eivät ole riittäviä.

”M7”-liuoksen valmistus

13. Jokainen kantaliuos (I) valmistetaan erikseen, ja näistä kantaliuoksista (I) valmistetaan yhdistetty kantaliuos (II) (katso taulukko 1). ”M7”-liuos valmistetaan täyttämällä 50 millilitraa yhdistettyä kantaliuosta (II) ja taulukossa 2 annetut määrät jokaista makroravinteiden kantaliuosta 1 litraksi deionisoitua vettä. Vitamiinien kantaliuos valmistetaan lisäämällä deionisoituun veteen kolmea vitamiinia taulukon 3 mukaisesti, ja 0,1 millilitraa yhdistettyä vitamiinien kantaliuosta lisätään lopulliseen ”M7”-liuokseen vähän ennen käyttöä. (Vitamiinien kantaliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä.) Liuos ilmastetaan ja stabiloidaan.

Taulukko 1

Hivenaineiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

Kantaliuokset (I)	Määrä (mg), joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä	Yhdistetyn kantaliuoksen (II) valmistus: Sekoita seuraavat määrät (ml) kantaliuoksia (I) ja täytä 1 litraksi deionisoitua vettä		Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Nämä aineet ovat erilaiset M4- ja M7-liuoksissa, kuten edellä kerrottiin.
(2) Nämä liuokset valmistetaan erikseen. Sitten ne kaadetaan yhteen ja käsitellään välittömästi autoklaavissa.

Taulukko 2

Makroravinteiden kantaliuokset M4- ja M7-liuosta varten

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn makroravinteiden kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn makroravinteiden kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

Taulukko 3

Vitamiinien kantaliuos M4- ja M7-liuosta varten

Kaikki kolme vitamiiniliuosta yhdistetään yhdeksi vitamiinien kantaliuokseksi.

	Määrä, joka täytetään 1 litraksi deionisoitua vettä (mg)	Lisätyn vitamiinien kantaliuoksen määrä M4- ja M7-liuosten valmistuksessa (ml/l)	Lopulliset pitoisuudet testiliuoksissa M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinihydrokloridi	750	0,1	0,075
Syaanikobalamiini (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiini	7,5	0,1	0,00075

KIRJALLISUUSVIITTEET

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

Lisäys 3

SYNTEETTISEN SEDIMENTIN VALMISTUS

Sedimentin koostumus

Synteettisen sedimentin koostumuksen on oltava seuraavanlainen:

Ainesosa	Ominaisuudet	Prosenttiosuus sedimentin kuivapainosta
Turve	Rahkasuoturvetta, pH mahdollisimman tarkoin 5,5–6,0, ei näkyviä kasvijäänteitä, hienoksi jauhettuna (hiukkaskoko ≤ 1 mm) ja ilmakuivattuna	4–5
Kvartsihiekka	Raekoko: > 50 prosenttia hiukkasista on oltava kokoa 50–200 µm	75–76
Kaoliniittisavi	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %	20
Orgaaninen hiili	Säädetään lisäämällä turvetta ja hiekkaa	2 (± 0,5)
Kalsiumkarbonaatti	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas	0,05–0,1
Vesi	Johtavuus ≤ 10 µS/cm	30–50

Valmistelut

Turve ilmakuivataan ja jauhetaan hienoksi. Tarvittava määrä turvejauhetta suspendoidaan deionisoituun veteen käyttämällä tehokasta homogenisointilaitetta. Suspension pH-arvoksi säädetään 5,5 ± 0,5 $CaCO_3$:lla. Suspension annetaan vakioitua vähintään kahden päivän ajan sekoittamalla sitä varovasti lämpötilassa 20 ± 2 °C, jotta pH stabiloituu ja saadaan stabiili mikrobikomponentti. Sen jälkeen pH mitataan uudelleen. Arvon pitäisi olla 6,0 ± 0,5. Sen jälkeen turvesuspensioon sekoitetaan muut ainesosat (hiekka ja kaoliniittisavi) ja deionisoitu vesi, jotta saadaan homogeenistä sedimenttiä, jonka vesipitoisuus on 30–50 prosenttia sedimentin kuivapainosta. Lopullisen seoksen pH mitataan vielä kerran, ja se säädetään tarvittaessa $CaCO_3$:lla alueelle 6,5–7,5. Sedimentistä otetaan näytteitä, joista määritetään kuivapaino ja orgaanisen hiilen pitoisuus. On suositeltavaa, että synteettistä sedimenttiä sopeutetaan ennen chironomid-eliöillä tehtävää myrkyllisyystestiä seitsemän päivää samoille olosuhteille, jotka testissä vallitsevat.

Säilytys

Synteettisen sedimentin kuivia ainesosia voi säilyttää kuivassa ja viileässä paikassa huoneenlämmössä. Valmistettua (märkää) sedimenttiä ei saa säilyttää ennen käyttöä tässä testissä. Se on käytettävä heti valmistuksen lopussa olevan 7 päivän sopeutusajan jälkeen.

KIRJALLISUUSVIITTEET:

Tämän liitteen luku C.8. Myrkyllisyystutkimus madoilla.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10–20.

Lisäys 4

Hyväksyttävän laimennusveden kemialliset ominaisuudet

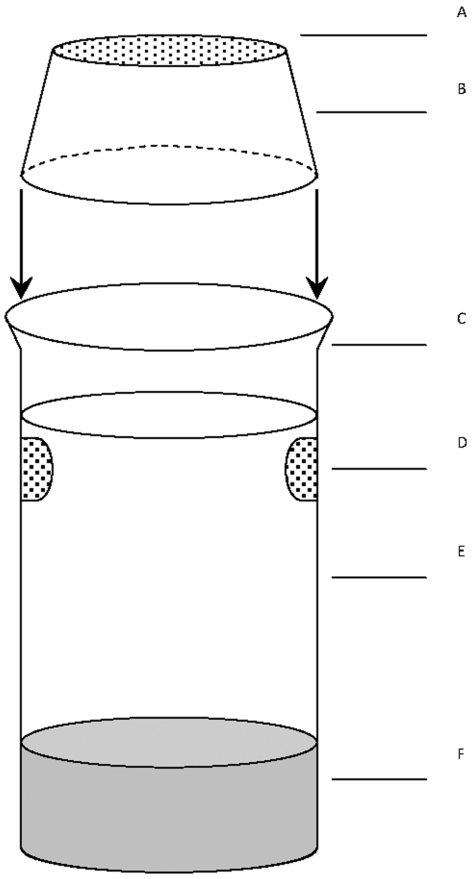
Aine	Pitoisuudet
Hiukkaset	< 20 mg/l
Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ionisoitumaton ammoniakki	< 1 µg/l
Kovuus $CaCO_3$:na	< 400 mg/l (*)
Jäännöskloori	< 10 mg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden ja polykloorattujen bifenyylien kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

(*) Jos kovuusionien ja testiaineen välillä epäillään yhteisvaikutusta, on kuitenkin käytettävä pehmeämpää vettä (tässä tapauksessa ei saa käyttää Elendt M4 -viljelynestettä).

Lisäys 5

Chironomid-toukkien kuoriutumisen tarkkailuohjeet

Dekantterilaseihin asetetaan pyydykset kuoriutuneita toukkia varten. Näitä pyydyksiä tarvitaan päivästä 20 lähtien testin loppuun saakka. Alla on esimerkki käytetystä pyydyksestä:



A: polyamidiverkko

B: ylösalaisin käännetyt muovikupit

C: reunukseton altistusdekantterilasi

D: verkkoaukot vedenvaihtoa varten

E: vettä

F: sedimentti

C.29 **BIOHAJOAVUUS – CO_2 SULJETUISSA ASTIOISSA (HEADSPACE-TESTI)**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 310 (2006). Testimenetelmällä voidaan arvioida kemikaalien biohajoavuutta, ja sen avulla saadaan vastaavaa tietoa kuin tämän liitteen luvussa C.4, A–F kuvatuilla kuudella testimenetelmällä. Niinpä kemikaalia, jonka tulokset ovat positiiviset tässä testimenetelmässä, voidaan pitää helposti biohajoavana, eli se hajoaa nopeasti ympäristössä.

2. Vakiintunut hiilidioksidimenetelmä (CO_2) (1), joka perustuu Sturmin alkuperäiseen testiin (2) ja jolla arvioidaan orgaanisten kemikaalien biohajoavuutta mittaamalla mikrobien toiminnan tuloksena syntyvää hiilidioksidia, on tavallisesti ensimmäinen vaihtoehto, kun testataan heikosti liukenevia ja voimakkaasti adsorboivia kemikaaleja. Sitä käytetään myös liukeneville (mutta ei haihtuville) kemikaaleille, sillä monet pitävät hiilidioksidin muodostumista ainoana pitävänä todisteena mikrobien toiminnasta. Liuenneen orgaanisen hiilen poistumista voivat aiheuttaa fyysis-kemialliset prosessit – adsorptio, haihtuminen, saostuminen, hydrolyysi – sekä mikrobien toiminta, ja monet ei-biologiset reaktiot kuluttavat happea. Orgaaniset kemikaalit harvoin tuottavat hiilidioksidia abioottisesti. Alkuperäisessä ja muunnetussa Sturmin testissä (1)(2) CO_2:ta poistetaan nestefaasista absorboiviin

astioihin kuplittamalla (sparging) eli hiilidioksidia poistetaan kuplittamalla ilmaa nestefaasin läpi. Larsonin versiossa (3)(4) CO_2 siirretään puolestaan reaktioastiasta absorboiviin materiaaleihin kuljettamalla hiilidioksidia sisältämätöntä ilmaa kaasutilan (headspace) läpi ja lisäksi ravistamalla testiastiaa jatkuvasti. Ainoastaan Larsonin muunnoksessa reaktioastiaa ravistetaan. Liukenemattomia aineita sekoitetaan standardissa ISO 9439 (5) ja alkuperäisessä yhdysvaltalaisessa versiossa (6), joissa kummassakin käytetään kuplitusta (sparging) kaasutilan vaihdon sijaan. Toisessa virallisessa US EPA -menetelmässä (7), joka perustuu Gledhillin menetelmään (8), ravistettu reaktioastia suljetaan ilmatiiviisti, ja tuotettu CO_2 sidotaan astiassa olevaan emäkseen suoraan kaasufaasista, kuten klassisissa Warburgin/Barcroftin respirometripulloissa.

3. On kuitenkin osoitettu, että epäorgaaninen hiili (IC) kerääntyy standardin Sturmin muunnetun testin aikana väliaineessa useisiin kemikaaleihin (9). Epäorgaanisen hiilen pitoisuus oli jopa 8 mg/l aniliinin (20 mg C/l) hajoamisen aikana. Siten CO_2:n sitominen emäkseen ei antanut oikeaa kuvaa siitä, miten paljon CO_2:ta tuotettiin mikrobiologisesti hajoamisen aikana. Tästä syystä vaatimus, että > 60 prosenttia $ThCO_2$:sta on kerättävä 10-päiväisen jakson aikana (10 %:n hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää), jotta testikemikaali voidaan luokitella helposti biohajoavaksi, ei täyty joidenkin sellaisten kemikaalien osalta, jotka määriteltäisiin helposti biohajoaviksi DOC-poistuman perusteella.

4. Kun hajoamisprosentti on alempi kuin odotettu arvo, epäorgaanista hiiltä saattaa kerääntyä testiliuokseen. Silloin hajoavuutta voidaan arvioida muilla nopean biohajoavuuden testeillä.

5. Sturmin menetelmän muiden heikkouksien (vaivalloinen, aikaa vievä, alttiimpi koevirheille eikä sovellu haihtuville kemikaaleille) vuoksi oli aiemmin alettu etsiä Gledhillin tekniikan lisäksi toista suljetun astian menetelmää läpivirtausjärjestelmien (10)(11) sijaan. Boatman *et al* (12) tarkastelivat aiempia menetelmiä ja ottivat käyttöön suljetun kaasutilan järjestelmän, jossa CO_2 vapautetaan kaasutilaan inkubaation jälkeen happamoittamalla väliaine. CO_2 mitattiin kaasukromatografisella (GC)/IC-analyysillä automaattisesti kaasutilasta otetuista näytteistä, mutta nestefaasin liuennutta epäorgaanista hiiltä (DIC) ei huomioitu. Lisäksi käytetyt astiat olivat hyvin pieniä (20 ml) ja niissä oli vain 10 ml:aa väliainetta, mikä aiheutti ongelmia esimerkiksi, kun liukenemattomia testikemikaaleja lisättiin hyvin pieniä määriä. Lisäksi siirrostetussa liuoksessa ei välttämättä ole ollenkaan tai tarpeeksi mikro-organismeja, jotka pystyvät hajottamaan testikemikaaleja.

6. Nämä vaikeudet voitettiin Struijsin ja Stoltenkampin (13) sekä Birchin ja Fletcherin (14) itsenäisissä tutkimuksissa. Jälkimmäiset saivat inspiraation anaerobisen biohajoavuuden testissä käytetystä laitteesta (15). Ensimmäisessä menetelmässä (13) CO_2 mitataan kaasutilassa happamoittamisen ja tasapainottumisen jälkeen, kun taas jälkimmäisessä (14) DIC mitataan sekä kaasu- että nestefaasissa, ilman käsittelyä. Yli 90 prosenttia muodostuneesta IC:stä oli nestefaasissa. Kummassakin menetelmässä on etunsa Sturmin testiin verrattuna, sillä niissä testijärjestelmä on pienempi ja helpompi käsitellä, haihtuvia kemikaaleja voidaan testata ja mahdollinen viive tuotetun CO_2:n mittauksessa vältetään.

7. Nämä kaksi lähestymistapaa yhdistettiin ISO Headspace CO_2 -standardissa (16), joka rengastestattiin (17). Nykyinen testimenetelmä perustuu juuri tähän standardiin. Noita kahta lähestymistapaa on käytetty myös US EPA -menetelmässä (18). CO_2:n mittaamiseen suositellaan kahta menetelmää eli CO_2 kaasutilassa happamoittamisen jälkeen (13) ja IC nestefaasissa emäksisen aineen lisäämisen jälkeen. Jälkimmäisen menetelmän otti käyttöön Peterson, kun tälle Headspace-menetelmälle, joka oli muunnettu luontaisen biohajoavuuden mittausta varten, tehtiin laboratorioiden välinen CONCAWE-tutkimus (19). Tähän testimenetelmään on sisällytetty muutokset, jotka tehtiin vuonna 1992 (20) tämän liitteen lukuun C.4 Biohajoavuuden määritys, joten olosuhteet (väliaine, kesto jne.) ovat muuten samat kuin muutetussa Sturmin testissä (20). Birch ja Fletcher (14) ovat osoittaneet, että tällä Headspace-testillä saatiin samoilla kemikaaleilla hyvin samankaltaisia tuloksia kuin tarkistettujen testimenetelmien OECD:n yhteistutkimuksissa (21).

TESTIN PERIAATE

8. Testikemikaali (tavallisesti 20 mg C/l), joka on ainoa hiilen ja energia lähde, inkuboidaan puskuri-mineraalisuolaliuoksessa, johon on siirrostettu sekapopulaatiosta otettuja mikroeliöitä. Testi tehdään suljetuissa pulloissa, joissa on ylätilassa ilmaa, joka toimii happivarastona aerobista biohajoamista varten. Testikemikaalin lopullisen aerobisen biohajoamisen tuottama CO_2 määritetään mittaamalla, kuinka paljon enemmän epäorgaanista hiiltä muodostuu testipulloissa verrattuna pulloihin, joissa on vain siirrostettua liuosta. Biohajoaminen ilmaistaan ThIC-arvona, joka perustuu alun perin lisätyn testikemikaalin (orgaanisena hiilenä) määrään.

9. DOC-poistuma ja/tai testikemikaalin primäärisen biohajoamisen laajuus voidaan myös mitata (20).

TESTIKEMIKAALIA KOSKEVIA TIETOJA

10. Testikemikaalin orgaanisen hiilen pitoisuuden (% w/w) on oltava tiedossa kemiallisen rakenteen tai mittauksen perusteella, jotta hajoamisprosentti voidaan laskea. Jos testikemikaalit ovat haihtuvia, mitattu tai laskettu Henryn lain vakio auttaa määrittämään soveltuvan kaasutilan ja nestetilavuuden suhteen. Testikemikaalin toksisuus mikro-organismeille on hyvä olla tiedossa, kun valitaan soveltuvaa testipitoisuutta ja tulkitaan heikosta biohajoavuudesta kertovia tuloksia. Inhibitiota on suositeltavaa kontrolloida, ellei olet tiedossa, että testikemikaali ei estä mikrobien toimintaa (katso kohta 24).

MENETELMÄN SOVELTUVUUS

11. Tätä testiä voidaan soveltaa vesiliukoisiin ja liukenemattomiin testikemikaaleihin, mutta testikemikaalin hyvä dispersio on varmistettava. Kun käytetään suositeltua kaasutilan ja nestetilavuuden välistä suhdetta 1:2, voidaan testata haihtuvia kemikaaleja, joiden Henryn lain vakio on enintään 50 Pa m^3 mol^{-1}, sillä testikemikaalin osuus kaasutilassa ei ole yli 1 prosenttia (13). Kaasutilan tilavuuden on oltava pienempi, kun testataan tätä haihtuvampia kemikaaleja, mutta niiden biologinen hyötyosuus voi asettaa rajoituksia varsinkin, jos ne liukenevat heikosti veteen. Käyttäjien on kuitenkin valittava kaasutilan ja nestetilavuuden suhde sekä testikemikaalin pitoisuus siten, että happi riittää täydelliseen aerobiseen biohajoamiseen (esimerkiksi suuren substraattipitoisuuden ja pienen kaasutilavuuden käyttöä on vältettävä). Ohjeet ovat kirjallisuusviitteissä (13)(23).

VERTAILUKEMIKAALIT

12. Testimenetelmän toimivuus tarkistetaan testaamalla rinnakkaisesti vertailukemikaalia, jonka biohajoavuus on tiedossa. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää aniliinia, natriumbentsoaattia tai etyleeniglykolia, kun testataan vesiliukoisia kemikaaleja, ja 1-oktanolia, kun testataan heikosti liukenevia kemikaaleja (13). Näiden kemikaalien biohajoavuuden täytyy olla > 60 % ThIC 14 päivän kuluessa.

TOISTETTAVUUS

13. Menetelmän ISO-yhteistutkimuksessa (17) saatiin seuraavat tulokset, kun käytettiin suositeltuja olosuhteita ja hiilen pitoisuus testikemikaalissa oli 20 mg C/l.

Testikemikaali	Biohajoavuuden keskiarvo (28 vrk)	Variaatiokerroin (%)	Laboratorioiden määrä
Aniliini	90	16	17
1-oktanoli	85	12	14

Testin sisäinen variaatio (toistettavuus) oli pieni, kun käytettiin aniliinia. Variaatiokerroin oli enintään 5 prosenttia lähes kaikissa testiajoissa. Kahdessa tapauksessa toistettavuus oli huonompi, ja suurempi variaatio johtui luultavasti suuresta IC:n tuotannosta nollakokeissa (kontrolleissa). Toistettavuus oli huonompi käytettäessä 1-oktanolia, mutta se oli silti alle 10 prosenttia 79 prosentissa testiajoista. Suurempi testin sisäinen variaatio saattoi johtua annosteluvirheistä, sillä suljettuihin testipulloihin injektoitiin pieni määrä (3–4 µl) 1-oktanolia. Variaatiokertoimet ovat suuremmat, kun käytetään testikemikaalin pienempiä pitoisuuksia ja varsinkin kun pitoisuus on alle 10 mg C/l. Tämä voidaan estää osittain pienentämällä epäorgaanisen hiilen kokonaismäärää (TIC) inokulaatissa.

14. Kun EU:n yhteistutkimuksessa (24) viittä pinta-aktiivista ainetta lisättiin pitoisuudella 10 mg C/l, saatiin seuraavat tulokset.

Testikemikaali	Biohajoavuuden keskiarvo (28 vrk)	Variaatiokerroin (%)	Laboratorioiden määrä
Tetraprolyleeni Bentseenisulfonaatti	17	45	10
Di-iso-oktyylisulfo-sukkinaatti (anioninen)	72	22	9
Heksadekyyli-trimetyyli (*) Ammoniumkloridi (kationinen)	75	13	10

Testikemikaali	Biohajoavuuden keskiarvo (28 vrk)	Variaatiokerroin (%)	Laboratorioiden määrä
Iso-nonyylifenoli-(etoksylaatti)$_9$ (ioniton)	41	32	10
Kokamidopropyyli Dimetyylihydroksi Sulfobetaiini (amfoteerinen)	60	23	11

(*) Toksisuutta neutraloitiin lisäämällä SiO_2:ta.

Tulokset osoittavat, että variaatio oli yleensä suurempi, jos pinta-aktiivinen aine oli huonosti hajoava. Testin sisäinen variaatio oli alle 15 prosenttia yli 90 prosentissa tapauksista. Suurin variaatio oli 30–40 prosenttia.

HUOMAUTUS: Useimmat pinta-aktiiviset aineet eivät ole yksimolekyylisiä lajeja, vaan isomeerien, homologien jne. sekoituksia. Ne hajoavat erilaisten latenssiaikojen jälkeen ja erilaisilla kineettisillä nopeuksilla, jolloin käyrät ovat loivia ja epäselviä eikä 60 prosentin kynnysarvoa välttämättä saavuteta 10-päiväisessä jaksossa, vaikka yksin testattuna jokainen yksittäinen molekyylilaji saavuttaisi > 60 prosentin kynnysarvon 10 päivässä. Sama voi ilmetä myös muissa monimutkaisissa seoksissa.

MENETELMÄN KUVAUS

Laite

15. Tavallinen laboratoriolaite ja lisäksi:

a) lasisia seerumipulloja, suljettu butyylikumitulpalla ja alumiinisulkimilla. Suositeltu koko on 125 ml, jolloin kokonaistilavuus on noin 160 ml (tässä tapauksessa jokaisen pullon tilavuuden pitää olla tunnetusti 160 ± 1 ml). Pienempää astiaa voidaan käyttää, kun tulokset täyttävät kohdissa 66 ja 67 kuvatut ehdot

b) hiilianalysaattori tai muu väline (esim. kaasukromatografi) epäorgaanisen hiilen mittaamista varten

c) ruiskuja, joiden tarkkuus on suuri, kaasu- ja nestenäytteitä varten

d) orbital-ravistelija ympäristössä, jonka lämpötila on vakioitu

e) hiilidioksiditonta ilmaa – tätä voidaan valmistaa kuljettamalla ilmaa sooda-kalkkirakeiden läpi tai käyttämällä kaasuseosta, jossa on 80 prosenttia N_2:ta ja 20 prosenttia 0_2:ta (valinnainen) (katso kohta 28)

f) kalvosuodatin, huokoskoko 0,20–0,45 µm (valinnainen)

g) orgaanisen hiilen analysaattori (valinnainen).

Reagenssit

16. Käytä pelkästään analyysilaatuisia reagensseja.

Vesi

17. Tislattu tai deionisoitu vesi, jonka orgaaninen kokonaishiilipitoisuus on ≤ 1 mg/l. Tämä edustaa alkuperäistä, testikemikaalin suositellun annoksen antamaa ≤ 5 prosentin orgaanista hiilipitoisuutta.

Mineraalisuolakasvatusalustan kantaliuokset

18. Kantaliuokset ja mineraalisuolakasvatusalusta vastaavat standardia ISO 14593 (16) ja luvun C.4 biohajoavuuden testejä (20). Suuremman ammoniumkloridipitoisuuden (2,0 g/l eikä 0,5 g/l) käyttö on tarpeen vain poikkeustapauksissa, kuten jos testikemikaalin pitoisuus on > 40 mg C/l. Kantaliuokset säilytetään jääkaapissa ja hävitetään kuuden kuukauden kuluttua tai aiemmin, jos on merkkejä saostumisesta tai mikrobikasvustosta. Valmista seuraavat kantaliuokset:

a) kaliumdivetyfosfaatti (KH_2PO_4) 8,50 g

dikaliumvetyfosfaatti (K_2HPO_4) 21,75 g

dinatriumvetyfosfaattidihydraatti ($Na_2HPO_42H_2O$) 33,40 g

ammoniumkloridi (NH_4Cl) 0,50 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi. Liuoksen pH-arvon on oltava 7,4 (± 0,2). Jos näin ei ole, valmista uusi liuos.

b) kalsiumkloridihydraatti ($CaCl_{2.}2H_2O$) 36,40 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi.

c) magnesiumsulfaattiheptahydraatti ($MgSO_{4.}7H_2O$) 22,50 g

Liuota veteen ja täytä 1 litraksi.

d) rauta(III)kloridiheksahydraatti ($FeCl_{3.}6H_20$) 0,25 g

Liuota veteen, täytä 1 litraksi ja lisää yksi tippa väkevöityä HCl-liuosta.

Epäorgaanisen liuoksen valmistus

19. Sekoita 10 ml liuosta (a) ja noin 800 ml vettä (kohta 17), lisää sitten 1 ml liuoksia (b), (c) ja (d) ja täytä sitten vedellä 1 litraksi (kohta 17).

Muut reagenssit

20. Väkevöity ortofosforihappo (H_3PO_4) (massa tilavuutta kohti > 85 %).

Natriumhydroksidiliuos 7M

21. Liuota 280 g natriumhydroksidia (NaOH) 1 litraan vettä (kohta 17). Määritä tämän liuoksen DIC-pitoisuus ja huomioi arvo testitulosta laskettaessa (katso kohdat 55 ja 61), etenkin kohdassa 66 (b) annetun laatuvaatimuksen kannalta. Valmista uusi liuos, jos DIC-pitoisuus on liian suuri.

Testikemikaali

22. Valmista kantaliuos riittävän vesiliukoisesta testikemikaalista veteen (kohta 17) tai testiviljelyaineeseen (kohta 19). On suositeltavaa, että pitoisuus on satakertainen verrattuna lopulliseen testissä käytettävään pitoisuuteen. Kantaliuoksen pH-arvon säätäminen voi olla tarpeen. Kantaliuos lisätään epäorgaaniseen liuokseen, jotta lopullinen orgaanisen hiilen pitoisuus on 2–40 mg C/l, mieluiten 20 mg C/l. Jos käytetty pitoisuus on tätä alempi, tarkkuus saattaa kärsiä. Liukenevat ja liukenemattomat nestemäiset kemikaalit voi lisätä astioihin suoraan ruiskulla, jonka tarkkuus on suuri. Heikosti liukenevat ja liukenemattomat testikemikaalit saattavat vaatia erityiskäsittelyä (25). Vaihtoehdot ovat seuraavat:

a) tunnettujen punnittujen määrien lisääminen suoraan

b) ultraäänidispersio ennen lisäystä

c) dispersio käyttämällä tarvittavia emulgointiaineita, jotta voidaan määrittää ennen lisäystä, onko niillä inhiboivia tai stimuloivia vaikutuksia mikrobien toimintaan

d) nestemäisten testikemikaalien adsorptio tai liuotus soveltuvaan haihtuvaan liuottimeen, inerttiin aineeseen tai kantaja-aineeseen (esim. lasikuitusuodattimeen), minkä jälkeen mahdollinen liuotin haihdutetaan ja tunnetut määrät lisätään suoraan

e) testikemikaaliliuoksen tunnetun tilavuuden lisääminen helposti haihtuvaan liuottimeen tyhjässä testiastiassa, minkä jälkeen liuotin haihdutetaan.

Aineiden ja liuottimien, joita käytetään kohdissa (c), (d) ja (e), mahdolliset stimuloivat tai inhiboivat vaikutukset mikrobien toimintaan on testattava (katso kohta 42(b)).

Vertailukemikaali

23. Valmista (liukenevan) vertailukemikaalin kantaliuos veteen (kohta 17). On suositeltavaa, että pitoisuus on satakertainen verrattuna lopulliseen testissä käytettävään pitoisuuteen (20 mg C/l).

Inhibition tarkistus

24. Testikemikaalit eivät usein hajoa merkittävästi biohajoavuuden määrittämiseen käytetyissä olosuhteissa. Yksi mahdollinen syy on, että testikemikaali estää inokulaattia pitoisuudella, jossa sitä lisätään testiin. Testiin voidaan sisällyttää inhibition tarkistus, mikä helpottaa inhibition tunnistamista (takautuvasti) mahdolliseksi syyksi tai osatekijäksi. Inhibition tarkistuksella voidaan myös sulkea pois tällaiset vaikutukset ja osoittaa, että nollahajoaminen tai heikko hajoaminen liittyy ainoastaan siihen, että testikemikaalit eivät ole alttiita mikrobihyökkäykselle testiolosuhteissa. Testikemikaalin toksisuudesta (aerobisille) mikro-organismeille saadaan tietoa valmistamalla testiviljelyaine, joka sisältää testikemikaalia ja vertailukemikaalia (kohta 19), kumpaakin lisättävinä pitoisuuksina (katso kohdat 22 ja 23).

Siirrosaine

25. Siirrosaine voi olla peräisin monesta eri lähteestä: aktiivilietteestä, jätevedestä (ilman kloorikäsittelyä), pintavedestä, maa-aineksesta tai näiden seoksesta (20). Lähteen biohajoamistoiminta on tarkistettava vertailukemikaalin avulla. Oli lähde mikä tahansa, aiemmin testikemikaalille altistuneita mikro-organismeja ei saa käyttää, jos menetelmää käytetään nopean biohajoavuuden testaamiseen.

Varoitus: aktiiviliete, jätevesi ja poistovesi sisältävät patogeenisiä organismeja, ja niitä on käsiteltävä varoen.

26. Kokemuksen perusteella siirrosaineen optimaalinen tilavuus täyttää seuraavat ehdot:

— mahdollistaa riittävän biohajoamistoiminnan

— hajottaa vertailukemikaalia määrätyssä määrin (katso kohta 66)

— antaa 10^2–10^5 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä millilitraa kohden lopullisessa seoksessa

— antaa normaalisti suspendoituneen kiintoaineen pitoisuudeksi 4 mg/l lopullisessa seoksessa, kun käytetään aktiivilietettä. Pitoisuus voi olla enintään 30 mg/l, mutta se voi nostaa CO_2-tuotantoa merkittävästi nollakokeissa (26)

— antaa alle 10 prosenttia testikemikaalin antamasta alkuperäisestä orgaanisen hiilen pitoisuudesta

— 1–10 ml siirrosainetta 1 testiliuoslitraa kohden.

Aktiiviliete

27. Aktiiviliete kerätään tuoreena pääosin kotitalouksien jätevettä käsittelevän vedenpuhdistamon tai laboratoriolaitoksen ilmastussäiliöstä. Tarvittaessa karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla (esim. 1 mm^2:n verkkoseulalla), minkä jälkeen liete pidetään aerobisena.

28. Lietteen annetaan asettua tai se sentrifugoidaan (esimerkiksi 1 100 × g 10 minuutin ajan) karkeiden hiukkasten poiston jälkeen. Pintaliete hylätään. Lietettä voidaan pestä epäorgaanisessa liuoksessa. Väkevöity liete suspendoidaan epäorgaaniseen liuokseen (lopullinen pitoisuus 3–5 g kuiva-ainetta/1) ja säilötään ilmastettuna.

29. Lietteen on tultava tehokkaasti toimivasta, perinteisen tekniikan mukaisesta laitoksesta. Jos liete on otettava suurkuormituslaitoksesta tai jos epäillään lietteen sisältävän inhibiittoreita, liete on pestävä. Liete sekoitetaan hyvin, minkä jälkeen uudelleen suspendoitunut liete saa asettua tai se sentrifugoidaan. Pintaliete hylätään ja pesty liete suspendoidaan uudelleen uuteen epäorgaaniseen liuokseen. Menettelyä toistetaan, kunnes voidaan katsoa, ettei lietteessä ole enää ylimääräistä substraattia tai inhibiittoria.

30. Kun liete on täysin uudelleensuspendoitunut (tai jos lietettä käytetään sellaisenaan), näyte kerätään välittömästi ennen käyttöä. Suspendoituneen kuiva-aineen pitoisuus määritetään näytteestä.

31. Yksi vaihtoehto on lisäksi aktiivilietteen homogenointi (3–5 g suspendoitunutta kuiva-ainetta/l). Lietettä käsitellään Waring-sekoittimessa keskinopeudella 2 minuutin ajan. Sekoitetun lietteen annetaan asettua 30 minuutin ajan (tai tarvittaessa kauemmin), ja neste dekantoidaan. Näin saatua nestettä käytetään siirrosaineena (pitoisuus: 10 ml/l epäorgaanista liuosta).

32. CO_2:n muodostumista nollakokeessa voidaan vähentää vielä lisää ilmastamalla lietettä yön yli ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia. Käytä 4 mg/l aktiivilietteen kiintoainesta siirrosaineen pitoisuutena tässä testissä (13).

Sekundaarinen jätevesi

33. Siirrosaineen lähteenä voidaan käyttää myös pääosin kotitalousjätevesiä puhdistavasta käsittelylaitoksesta tai laboratoriolaitoksesta saatavaa sekundaarista jätevettä. Säilytä näyte aerobisissa olosuhteissa ja käytä se näytteenottopäivänä tai esikäsittele tarvittaessa. Karkeat hiukkaset poistetaan suodattamalla jätevesi karkealla suodattimella ja pH-arvo mitataan.

34. IC-pitoisuutta lasketaan ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia (kohta 15 e), tunnin ajan samalla, kun pH pidetään arvossa 6,5 ortofosforihapolla (kohta 20). pH-arvo palautetaan alkuperäiseen arvoon natriumhydroksidilla (kohta 21), ja näytteen annetaan asettua noin tunnin, minkä jälkeen siirrosaineeksi otetaan soveltuva tilavuus pintalietettä. Hiilidioksidittoman ilman käyttö laskee siirrosaineen IC-pitoisuutta. Kun suodatetun, ilmakäsitellyn jäteveden suositeltua enimmäistilavuutta (100 ml) litraa kohden käytettiin siirrosaineena, kontrolliastioiden IC-pitoisuus oli 0,4–1,3 mg/l (14), mikä vastaa 2–6,5 prosenttia, kun hiilen pitoisuus testikemikaalissa on 20 mg C/l, ja 4–13 prosenttia, kun hiilen pitoisuus on 10 mg C/l.

Pintavedet

35. Soveltuvasta pintavedestä otetaan näyte. Näytettä säilytetään aerobisissa olosuhteissa, ja se on käytettävä näytteenottopäivänä. Näyte väkevöidään tarvittaessa suodattamalla tai sentrifugoimalla. Jokaisessa testiastiassa käytettävän siirrosaineen tilavuuden on täytettävä kohdassa 26 annetut ehdot.

Maa-ainekset

36. Soveltuvasta maa-aineksesta otetaan näyte enintään 20 cm maan pinnan alta. Kivet, kasvien jäännökset ja selkärangattomat poistetaan maanäytteestä, minkä jälkeen se seulotaan 2 mm:n verkkosiivilällä (jos näyte on niin märkä, ettei sitä voi seuloa heti, anna sen kuivua osittain). Näytettä säilytetään aerobisissa olosuhteissa, ja se on käytettävä näytteenottopäivänä. (Jos näytettä kuljetetaan löysästi suljetussa mustassa polyeteenikassissa, sitä voidaan säilyttää kassissa kuukauden 2–4 °C:n lämpötilassa).

Siirrosaineen esikäsittely

37. Esikäsittelyn avulla siirrosaine voidaan sopeuttaa testiolosuhteisiin, mutta ei testattavaan kemikaaliin. Esikäsittely voi vähentää CO_2:n muodostumista nollakokeessa. Esikäsittelyssä testiaineen pitoisuudeksi laimennetaan 30 mg/l, ja sen jälkeen aktiivilietettä ilmastetaan kostella ilmalla, joka ei sisällä hiilidioksidia, 5–7 päivän ajan testilämpötilassa.

TESTIMENETELMÄ

Pullojen määrä

38. Testiin tarvittava pullojen määrä (kohta 15 a) määräytyy analyysitiheyden ja testin keston mukaan.

39. On suositeltavaa, että kolme pulloa analysoidaan rinnakkain riittävien aikavälien jälkeen, jotta 10-päiväinen jakso voidaan tunnistaa. Vähintään viisi testipulloa (kohta 15 a) sarjoista (a), (b) ja (c) (ks. kohta 42) analysoidaan testin lopussa, jotta biohajoavuuden keskiarvolle voidaan laskea 95 prosentin luottamusvälit.

Siirrostettu liuos

40. Siirrosainetta käytetään pitoisuudella 4 mg litrassa aktiivilietteen kiintoainetta. Valmista riittävä määrä siirrostettua liuosta juuri ennen käyttöä lisäämällä esimerkiksi 2 ml sopivasti käsiteltyä aktiivilietettä (kohdat 27–32) pitoisuudella 2 000 mg/l yhteen litraan mineraalisuolakasvatusalustaa (kohta 19). Jos käytetään sekundaarista jätevettä, lisää enintään 100 ml jätevettä (kohta 33) 900 ml:aan mineraalisuolakasvatusalustaa (kohta 19) ja laimenna siirrosaineella 1 litraksi.

Pullojen valmistelu

41. Siirrostetun liuoksen alikvootteja annostellaan rinnakkaispulloihin siten, että kaasutilan (headspace) ja nesteen suhde on 1:2 (jos pullon tilavuus on esim. 160 ml, lisää 107 ml). Muitakin suhteita voi käyttää, mutta katso kohdassa 11 annettu varoitus. Kun käytetään muuntyyppistä siirrosainetta, on varmistettava huolellisesti, että siirrostettu liuos on sekoitettu hyvin, jotta se jakautuu tasaisesti testipulloihin.

42. Pullosarjoihin (kohta 15 a) kuuluvat seuraavat osat:

a) testiastiat (F_T), jotka sisältävät testikemikaalia

b) kontrollipullot (F_B), jotka sisältävät vain testiviljelyainetta ja siirrosainetta. Lisäksi testikemikaalin siirtämiseen testiastioihin voidaan tarvita kemikaaleja, liuottimia, aineita ja lasikuitusuodattimia

c) astiat (F_C), jotka sisältävät vertailukemikaalia testimenettelyn tarkistamista varten

d) tarvittaessa astiat (F_I), joilla tarkistetaan testikemikaalin inhibitiovaikutus ja joissa on sekä testikemikaalia että vertailukemikaalia samoissa pitoisuuksissa (kohta 24) kuin pulloissa F_T ja F_C

e) astiat (F_S), joilla tarkistetaan mahdollinen abioottinen hajoaminen (a) plus 50 mg/l $HgCl_2$:ta tai muulla tavoin steriloituna (esim. autoklaavissa).

43. Vesiliukoiset testikemikaalit ja vertailukemikaalit lisätään vesipitoisina kantaliuoksina (kohdat 22, 23 ja 24), kunnes pitoisuus on 10–20 mg C/l.

44. Liukenemattomat testikemikaalit ja liukenemattomat vertailukemikaalit lisätään pulloihin eri tavoin (katso kohdat 22 a–e) testikemikaalin luonteen mukaan. Ne lisätään joko ennen siirrostettua liuosta tai sen jälkeen testikemikaalin käsittelyn mukaan. Jos käytössä on jokin kohdissa 22 a–e annetuista menetelmistä, kontrollipulloja F_B (kohta 42 b) käsitellään muuten samoin, mutta ilman testikemikaalia tai vertailukemikaalia.

45. Haihtuvat testikemikaalit injektoidaan suljettuihin pulloihin (kohta 47) mikroruiskulla. Annos lasketaan injektoidun tilavuuden ja testikemikaalin tiheyden mukaan.

46. Astioihin lisätään tarvittaessa vettä, jotta nestetilavuus on sama jokaisessa astiassa. On varmistettava, että kaasutilan ja nesteen suhde (yleensä 1:2) ja testikemikaalin pitoisuus ovat sellaisia, että kaasutilassa on riittävästi happea täydellistä biohajoamista varten.

47. Sen jälkeen kaikki pullot suljetaan esimerkiksi butyylikumikalvolla tai alumiinikorkilla. Haihtuvat testikemikaalit lisätään tässä vaiheessa (kohta 45). Jos testiliuoksen DOC-pitoisuuden laskua halutaan seurata ja alkuperäisen IC-pitoisuuden nollahetken analyysejä (steriilit kontrollit, kohta 42 e) tai muita analyysejä halutaan tehdä, ota sopivan kokoinen näyte testiastiasta. Hävitä testiastia ja sen sisältö tämän jälkeen.

48. Suljetut pullot asetetaan pyörivään ravistimeen (kohta 15 d), jonka ravistusnopeus riittää pitämään pullojen sisällön hyvin sekoitettuna ja suspendoituneena (esim. 150–200 rpm), ja niitä inkuboidaan pimeässä lämpötilassa 20 °C ± 1 °C.

Näytteenotto

49. Näytteenottotapa määräytyy lag-vaiheen ja testikemikaalin biohajoamisen kineettisen nopeuden mukaan. Pullot analysoidaan näytteenottopäivänä, joita pidetään vähintään kerran viikossa tai useammin (esim. kahdesti viikossa), jos täydellinen hajoamiskäyrä on tarpeen. Tarvittava määrä rinnakkaispulloja (F_T, F_B ja F_C sekä F_I ja F_S, jos käytössä) otetaan ravistajasta (ks. kohta 42). Testin normaali kesto on 28 päivää. Jos biohajoamiskäyrä osoittaa, että tasannevaihe on saavutettu ennen päivää 28, testi voidaan lopettaa jo aikaisemmin. Ota näytteet viidestä pullosta, jotka on varattu testipäivän 28 analysointia varten, ja laske tulosten perusteella luottamusvälit tai biohajoamisprosentin variaatiokerroin. Inhibition ja abioottisen hajoamisen tarkistusta varten varatuista pulloista ei tarvitse ottaa näytteitä yhtä usein kuin muista pulloista. Riittää, kun näyte otetaan päivänä 1 ja 28.

Epäorgaanisen hiilen (IC) analyysi

50. Pullojen CO_2-tuotanto määritetään mittaamalla epäorgaanisen hiilen (IC) pitoisuuden nousu inkubaation aikana. Testin aikana tuotetun IC:n mittaamiseen on kaksi suositeltavaa menetelmää, jotka on kuvattu alla. Koska näiden menetelmien tulokset voivat poiketa hieman toisistaan, käytä vain yhtä menetelmää yhdessä testiajossa.

51. Menetelmä (a) on suositeltava, jos siirrosaineessa on todennäköisesti jäänteitä lasisuodatinpaperista ja/tai liukenemattomasta testikemikaalista. Analyysi voidaan tehdä kaasukromatografilla, jos hiilianalysaattoria ei ole käytettävissä. On tärkeää, että pullot ovat testilämpötilassa tai sitä lähellä, kun kaasutilan kaasua analysoidaan. Menetelmä (b) voi olla helpompi, jos laboratoriossa käytetään hiilianalysaattoreita IC:n mittaamiseen. On tärkeää, että natriumhydroksidiliuos (kohta 21), jolla CO_2 muunnetaan karbonaatiksi, on vasta valmistettu tai sen IC-pitoisuus on tunnettu, jotta se voidaan huomioida testituloksia laskettaessa (ks. kohta 66 b.)

Menetelmä (a): happamoittaminen pH-arvoon < 3

52. Ennen jokaista analyysierää IC-analysaattori kalibroidaan käyttämällä soveltuvaa IC-standardia (esim. 1 % w/w CO_2:ta N_2:ssa). Väkevöity ortofosforihappo (kohta 20) injektoidaan jokaisen pullon kalvon läpi, jotta siirrosaineen pH-arvoksi tulee < 3 (esim. 1 ml, kun testiviljelyaineen tilavuus on 107 ml). Pullot asetetaan takaisin ravistajaan. Kun pulloja on ravistettu yksi tunti testilämpötilassa, ne otetaan pois ravistajasta, kaasualikvootit (esim. 1 ml) otetaan jokaisen pullon kaasutilasta ja injektoidaan IC-analysaattoriin. Mitatut IC-pitoisuudet rekisteröidään (mg C/l).

53. Tämä menetelmä perustuu siihen, että kun pH-arvo on happamoitettu alle kolmeen ja tasapainotus tehty lämpötilassa 20 °C, CO_2:n jakautumisen testipullojen neste- ja kaasufaasin välillä tasapainovakio on 1,0 pitoisuutena mitattuna (13). Tämä on osoitettava vähintään kerran seuraavalla tavalla:

Valmistele pullot, joissa IC:tä on 5 ja 10 mg/l, käyttämällä vedetöntä natriumkarbonaattia (Na_2CO_3) ja vettä, joka ei sisällä CO_2:ta ja joka valmistetaan happamoittamalla veden pH-arvoksi 6,5 ortofosrofihapolla (kohta 20). Kuplita yön yli ilmalla, joka ei sisällä CO_2:ta, ja nosta pH neutraaliksi emäksellä. Varmista, että kaasutilan ja nesteen tilavuuksien suhde on sama kuin testeissä (esim. 1:2). Happamoita ja tasapainota kohdan 52 ohjeiden mukaisesti ja mittaa IC-pitoisuudet sekä kaasutilasta että nestefaasista. Tarkista, että nämä kaksi pitoisuutta ovat samat koevirheen sisällä. Jos näin ei ole, työvaiheet on käytävä läpi. IC:n jakautumista neste- ja kaasufaasin välille ei tarvitse tarkistaa aina, kun testi tehdään. Se voidaan tehdä kalibroinnin yhteydessä.

54. Jos DOC-poistumaa halutaan mitata (vain vesiliukoiset testikemikaalit), näytteet otetaan erillisten (happamoittamattomien) pullojen nestefaasista, kalvosuodatetaan ja injektoidaan DOC-analysaattoriin. Näitä pulloja voidaan tarvittaessa käyttää muihin analyyseihin, primaarisen biohajoamisen mittaamista varten.

Menetelmä (b): CO_2:n muuntaminen karbonaatiksi

55. IC-analysaattori kalibroidaan ennen jokaista analyysierää soveltuvalla standardilla, kuten natriumbikarbonaattiluoksella ($NaHCO_3$) vedessä, joka ei sisällä CO_2:ta (ks. kohta 53), IC-pitoisuus 0–20 mg/l. Natriumhydroksidiliuos (7M, kohta 21) (esim. 1 ml, kun testiviljelyaineen tilavuus on 107 ml) injektoidaan kalvon läpi jokaiseen pulloon, josta näyte otetaan, ja pulloja ravistetaan 1 tunti testilämpötilassa. Käytä samaa NaOH-liuosta kaikissa tiettynä päivänä analysoitavissa pulloissa. Samaa liuosta ei kuitenkaan tarvitse käyttää testin kaikilla näytteenottokerroilla. Jos IC:n absoluuttiset nolla-arvot tarvitaan kaikilla näytteenottokerroilla, NaOH-liuoksen IC on määritettävä aina ennen käyttöä. Pullot otetaan pois ravistajasta, ja niiden annetaan tasaantua. Jokaisen pullon nestefaasista otetaan sopiva tilavuus (esim. 50–1 000 µl) ruiskulla. Nämä näytteet injektoidaan IC-analysaattoriin, ja IC-pitoisuudet merkitään ylös. On varmistettava, että käytettävä analysaattori soveltuu tällä menetelmällä tuotettujen emäksisten näytteiden käsittelyyn.

56. Tämä menetelmä perustuu siihen, että kun emästä on lisätty ja pulloja ravistettu, IC-pitoisuus kaasutilassa on hyvin pieni. Tämä on tarkistettava vähintään kerran käyttämällä IC-standardeja, lisäämällä emästä, tasapainottamalla ja mittaamalla IC-pitoisuus sekä kaasutilassa että nestefaasissa (ks. kohta 53). Pitoisuuden pitäisi olla lähes nolla kaasutilassa. Tätä virtuaalisesti täydellisen CO_2-absorption tarkistusta ei tarvitse tehdä aina, kun testi tehdään.

57. Jos DOC-poistumaa halutaan mitata (vain vesiliukoiset testikemikaalit), näytteet otetaan erillisten pullojen (joihin ei ole lisätty emästä) nestefaasista, kalvosuodatetaan ja injektoidaan DOC-analysaattoriin. Näitä pulloja voidaan tarvittaessa käyttää muihin analyyseihin, primaarisen biohajoamisen mittaamista varten.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten laskeminen

58. Jos oletetaan, että testikemikaali on mineralisoitunut sataprosenttisesti CO_2:ksi, kontrollien tuotannon ylittävä ThIC on yhtä kuin jokaiseen testipulloon testin alussa lisätty TOC, eli:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}.$$

Yhdessä pullossa olevan epäorgaanisen hiilen kokonaismassa (TIC) (mg) on:

$$\text{TIC} = (\text{mg C nesteessä} + \text{mg C kaasutilassa}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Yhtälö [1]}$$

jossa:

V_L = nesteen tilavuus pullossa (litraa)

CL = IC-pitoisuus nesteessä (mg/l hiilenä)

VH = kaasutilan tilavuus (litraa)

CH = IC-pitoisuus kaasutilassa (mg/l hiilenä).

TIC-laskelmat tässä testissä IC:n mittaamiseen käytettyä kahta analyysimenetelmää varten on kuvattu kohdissa 60 ja 61. Biohajoamisprosentti (% *D*) saadaan seuraavasti:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Yhtälö [2]}$$

jossa:

TICt = mg TIC testipullossa aikana t

TICb = keskimääräinen mg TIC vertailupulloissa aikana t

TOC = alun perin testiastiaan lisätty mg TOC.

Biohajoamisprosentti % D lasketaan testipulloille (F_T), vertailupulloille (F_C) ja mahdollisille inhibition seurantaan tarkoitetuille pulloille (F_I) kuhunkin näytteenottoaikaan mennessä tuotetun TIC:n määrästä.

59. Jos TIC-pitoisuus on noussut merkittävästi steriileissä kontrolleissa (F_S) testijakson aikana, voidaan päätellä, että testikemikaali on hajonnut abioottisesti. Tämä on huomioitava laskettaessa D:tä kaavalla [2].

Happamoittaminen pH-arvoon < 3

60. Koska happamoittaminen pH-arvoon < 3 ja tasapainottaminen tasapainottaa TIC-pitoisuuden neste- ja kaasufaasissa, ainoastaan kaasufaasin IC-pitoisuus mitataan. Kaava [1] $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, jossa V_B = seerumipullon tilavuus.

CO_2:n muuntaminen karbonaatiksi

61. Tässä menetelmässä laskelmat tehdään kuten kaavassa [1], mutta kaasufaasin hyvin pieni IC-määrä jätetään huomioimatta, eli $V_H \times C_H = 0$, ja $TIC = V_L \times C_L$.

Tulosten ilmaiseminen

62. Biohajoamiskäyrä saadaan esittämällä biohajoamisprosentti D suhteessa inkubaatioaikaan ja lag-vaihe, biohajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja tasannevaihe eli vaihe, jolloin maksimaalinen hajoaminen on saavutettu ja biohajoamiskäyrä on loiventunut, ilmaistaan, jos mahdollista. Jos rinnakkaistestipulloista F_T saadaan verrattavissa olevat tulokset (ero < 20 %), piirretään keskiarvokäyrä (ks. lisäys 2, kuva 1). Jos näin ei ole, jokaista astiaa varten piirretään oma käyrä. Tasannevaiheen biohajoamisprosentin keskiarvo määritetään tai korkein arvo arvioidaan (esim. kun käyrä laskee tasannevaiheessa), mutta jälkimmäisessä tapauksessa on tärkeää varmistaa, että arvo ei ole poikkeava havainto. Kirjaa tämä biohajoamisen enimmäistaso testiraporttiin testikemikaalin biohajoamisasteena. Jos testiastioiden määrä ei riittänyt tasannevaiheen osoittamiseen, keskiarvo lasketaan testin viimeisenä päivänä mitatuista tiedoista. Tämä viimeinen arvo, viiden rinnakkaisnäytteen keskiarvo, osoittaa biohajoamisprosentin määritystarkkuuden. Kirjaa ylös myös 10-päiväisen jakson lopussa saatu arvo.

63. Vertailukemikaalin F_C käyrä laaditaan samalla tavalla, ja samoin abioottisen eliminaation tarkistuksen F_S ja inhibition tarkistuksen F_I, jos ne olivat käytössä.

64. TIC:n määrät kontrollipulloissa (F_B) kirjataan samoin kuin pulloissa F_S (abioottinen tarkistus), jos sellaiset olivat käytössä.

65. Laske F_I-astioiden D ainoastaan seoksen vertailukomponentin odotetun teoreettisen IC-saannin perusteella. Jos päivänä 28 $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, voidaan olettaa, että testikemikaali esti siirrosaineen toimintaa, mikä voi selittää testiolosuhteissa saadut matalat D_{FT}-arvot. Tässä tapauksessa testi voidaan toistaa käyttämällä alempaa testipitoisuutta ja mielellään vähentämällä DIC:n määrää siirrosaineessa ja kontrollipulloissa muodostuvaa TIC:tä, sillä muutoin alempi pitoisuus heikentää menetelmän tarkkuutta. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää toista siirrosainetta. Jos TIC-pitoisuus nousee merkittävästi (> 10 %) F_S-pullossa (abioottinen), abioottisia hajoamisprosesseja on voinut tapahtua.

Tulosten luotettavuus

66. Testi on luotettava, jos

a) keskimääräinen hajoamisprosentti astioissa F_C, jotka sisältävät vertailukemikaalia, on > 60 prosenttia 14. inkubaatiopäivään mennessä ja

b) TIC:n keskimääräinen määrä kontrollipulloissa F_B testin lopussa on > 3 mg C/l.

Jos nämä ehdot eivät täyty, testi on toistettava käyttämällä toisesta lähteestä saatua siirrosainetta ja/tai testivaiheet on käytävä läpi. Jos esimerkiksi ongelmana on suuri IC-tuotanto kontrollipulloissa, on noudatettava kohdissa 27–32 annettuja ohjeita.

67. Jos testikemikaali ei saavuteta arvoa 60 % ThIC ja se on osoitettu ei-inhiboivaksi (kohta 65), testi voidaan toistaa käyttämällä suurempaa siirrosaineen pitoisuutta (enintään 30 mg/l aktiivilietettä ja 100 ml jätevettä/l) tai eri lähteestä saatua siirrosainetta, varsinkin jos hajoaminen oli suuruudeltaan 20–60 prosenttia.

Tulosten tulkinta

68. Jos biohajoaminen on > 60 % ThIC 10-päiväisen jakson aikana tässä testissä, testikemikaali on helposti biohajoava aerobisissa oloissa.

69. Jos kynnysarvoa 60 % ThIC ei saavuteta, määritä aineen pH-arvo pulloissa, joita ei ole muutettu happamaksi tai emäksiseksi. Jos arvo on alle 6,5, nitrifikaatiota on voinut tapahtua. Toista tässä tapauksessa testi käyttämällä puskuriliuosta, jonka pitoisuus on suurempi.

(1) Hajoamisprosentti astioissa F_C, jotka sisältävät vertailuainetta
(2) Hajoamisprosentti astioissa F_I

Testiraportti

70. Laadi taulukko, johon merkitään jokaisen testipullon (F_T), vertailupullon (F_C) ja mahdollisten inhibition seurantaan tarkoitettujen pullojen (F_I) % D-arvo jokaisena näytteenottopäivänä. Jos rinnakkaispulloista saadaan verrattavissa olevat tulokset, piirrä käyrä arvon % D keskiarvosta ajan suhteen. Kirjaa ylös TIC:n määrä kontrollipulloissa (F_B) ja steriileissä kontrollipulloissa (F_S) DOC ja/tai muut määreet sekä niiden poistumaprosentit.

71. Määritä % D -arvon keskiarvo tasannevaiheessa tai käytä korkeinta arvoa, jos biohajoamiskäyrä laskee tasannevaiheessa, ja anna tämä arvo testikemikaalin biohajoamisasteena. Jälkimmäisessä tapauksessa on tärkeää varmistaa, että korkein arvo ei ole poikkeava arvo.

72. Testiraportin on sisällettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— yleisnimi, kemiallinen nimi, CAS-numero, rakennekaava ja merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— testikemikaalin puhtaus (epäpuhtaudet),

Testiolosuhteet:

— viittaus tähän testimenetelmään

— käytetyn testijärjestelmän kuvaus (astian tilavuus, kaasutilan ja nesteen suhde, sekoitustapa jne.)

— testikemikaalin ja vertailukemikaalin lisääminen testijärjestelmään: käytetty testipitoisuus ja jokaiseen pulloon annostellun hiilen määrä, mahdollinen liuottimien käyttö

— käytetyn siirrosaineen tiedot, mahdollinen esikäsittely

— inkubointilämpötila

— IC-analyysin periaatteen validointi

— käytetyn IC-analysaattorin (ja muiden käytettyjen analyysimenetelmien) pääominaisuudet

— rinnakkaisnäytteiden määrä.

Tulokset:

— raakatiedot ja lasketut biohajoavuusarvot taulukkomuodossa

— testi- ja vertailukemikaalin hajoamisprosenttikäyrä suhteessa aikaan, lag-vaihe, hajoamisvaihe, 10-päiväinen jakso ja kulmakerroin

— poistumaprosentti tasannevaiheessa, testin lopussa ja 10-päiväisen jakson jälkeen

— syyt mahdolliseen testitulosten hylkäämiseen

— muut käytetyn menetelmän kannalta merkitykselliset tiedot

— tulosten pohdinta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys – hiilidioksidin muodostumiskoe (Menetelmä C.4-C).

2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159–167.

3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153–1161.

4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195–1210.

5) ISO 9439 (1990; tarkistettu 1999). Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922–929.

9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801–812.

10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181–185.

11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51–53.

12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233–243.

13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204–211.

14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507–524.

15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527–1550.

16) ISO 14593, (1999) Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO_2 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813–1822.

18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219–3235.

20) Tämän liitteen luku C.4 Biohajoavuuden määritys.

21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

22) Tämän liitteen luku C.11 Aktiivilietteen soluhengityksen inhibitiotesti.

23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319–327.

24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25) ISO 10634 (1996) Water Quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

Lisäys 1

LYHENTEET JA MÄÄRITELMÄT

IC: "Inorganic carbon" – Epäorgaaninen hiili

$ThCO_2$: "Theoretical carbon dioxide" (mg) – Hiilidioksidimäärä, joka lasketaan saatavan testattavan aineen tunnetusta tai mitatusta, epäorgaaniseen muotoon muunnetusta hiilestä. $ThCO_2$ ilmaistaan myös muodostuneen hiilidioksidin painona (mg) testattavan kemikaalin massaa (mg) kohti.

DOC: "Dissolved organic carbon" – Liuoksessa oleva orgaaninen hiili tai orgaaninen hiili, joka läpäisee 0,45 µm:n suodattimen tai jää pinnalle, kun liuosta on sentrifugoitu nopeudella 40 000 ms^{-2} (n. 4 000 g) 15 minuutin ajan.

DIC: "Dissolved inorganic carbon" – liuennut epäorgaaninen hiili

ThIC: "Theoretical inorganic carbon" – teoreettinen epäorgaaninen hiili

TIC: "Total inorganic carbon" – epäorgaanisen hiilen kokonaismäärä

Helposti biohajoava: Tietyt lopullisen biohajoamisen seulontatestit läpäisseiden kemikaalien yleisluokitus. Kyseiset testit ovat niin tiukkoja, että tällaisten aineiden voidaan katsoa olevan nopeasti ja täydellisesti biohajoavia vedessä ja aerobisissa olosuhteissa.

10-päiväinen jakso: 10 prosentin hajoamistason saavuttamista seuraavat 10 päivää.

Itsestään/luontaisesti biohajoava: Kemikaali, jonka tiedetään varmojen todisteiden perusteella olevan primäärisesti tai lopullisesti biohajoava kaikissa tunnetuissa biohajoavuustesteissä.

Lopullinen aerobinen biohajoaminen: Hajoamisen taso, joka saavutetaan, kun eliöt ovat hyödyntäneet testattavan aineen täysin. Tämän prosessin tuloksena syntyy hiilidioksidia, vettä, epäorgaanisia suoloja ja uutta mikrobista solukkoa (biomassaa).

Mineralisaatio: Orgaanisen yhdisteen täydellinen hajoaminen CO_2:ksi ja H_2O:ksi aerobisissa olosuhteissa sekä CH_4:ksi, CO_2:ksi ja H_2O:ksi anaerobisissa olosuhteissa.

Lag-vaihe: Aika testin alusta siihen, kun hajottavien mikro-organismien sopeutuminen ja/tai adaptaatio on tapahtunut ja testikemikaalin tai orgaanisen aineen biohajoamisaste on havaittavalla tasolla (esim. 10 prosenttia biohajoamisen teoreettisesta enimmäistasosta tai tätä alempi, riippuen mittaustekniikan tarkkuudesta).

Hajoamisvaihe: Hajoamisaika on lag-vaiheen päättymistä seuraava, 90 prosentin hajoamistason saavuttamiseen kuluva ajanjakso.

Tasannevaihe: Tasannevaihe on vaihe, jolloin maksimaalinen hajoaminen on saavutettu ja biohajoamiskäyrä on loiventunut.

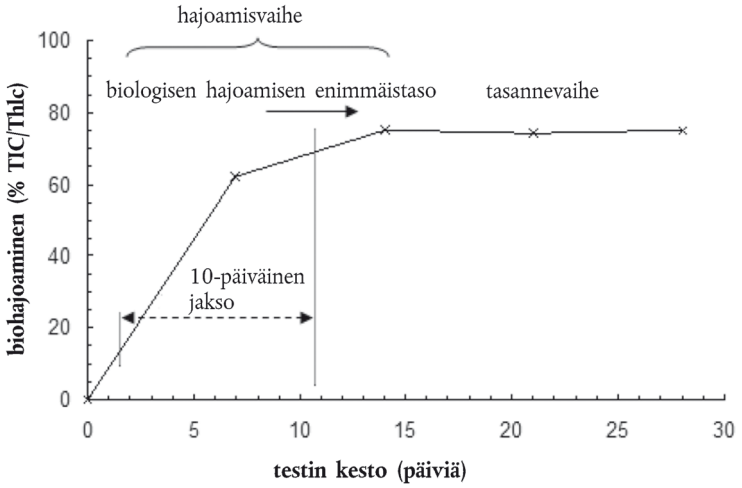
Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Lisäys 2

Esimerkki biohajoamiskäyrästä

Kuva 1

1-oktanolin biologinen hajoaminen CO_2-kaasutilatestissä (headspace)



Sanasto

biohajoaminen

hajoamisvaihe

biologisen hajoamisen enimmäistaso

tasannevaihe:

10-päiväinen jakso

testin kesto (päiviä)

C.30 **BIOKERTYVYYS MAALLA ELÄVISSÄ HARVASUKASMADOISSA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta nro 317 (2010). Ympäristökohtaloon liittyvistä testimenetelmistä Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa (tämän liitteen luku C.13 (49)) julkaistiin vuonna 1996 ja Biokertyvyys pohjaeläiminä lietteessä elävissä harvasukasmadoissa (53) julkaistiin vuonna 2008. Vesiympäristöstä saatujen biokertyvyystietojen ekstrapolointi maalla eläviin organismeihin, kuten lieroihin, on vaikeaa tai mahdotonta. Testikemikaalin rasvahakuisuuteen perustuvia mallilaskelmia, kuten (14) (37), käytetään tätä nykyä, kun arvioidaan kemikaalien biologista kertymistä maahan, kuten esimerkiksi EU:n teknisessä ohjeessa (19). Osa-aluekohtaisen testimenetelmän tarvetta on jo käsitelty, esim. (55). Tällainen menetelmä on erityisen tärkeä, kun arvioidaan sekundaarista myrkytystä maaravintoketjuissa (4). Useissa kansallisissa testimenetelmissä käsitellään biokertymistä muissa organismeissa kuin kaloissa. Esimerkkinä (2) ja (72). ASTM (American Society for Testing and Materials) (3) on kehittänyt menetelmän, jolla voidaan mitata saastuneen maa-aineksen biokertymistä lieroihin (*Eisenia fetida*, Savigny) ja änkyrimatoihin. Kansainvälisesti hyväksytty menetelmä biokertymisen määrittämiseen maaperässä, johon testiainetta on lisätty, edistää kemikaalien riskinarviointia maa-alueen ekosysteemeissä (25) (29).

2. Maata syövät selkärangattomat altistuvat maaperään sitoutuneille kemikaaleille. Näiden eläinten joukossa maalla elävillä harvasukasmadoilla on tärkeä rooli maaperän rakenteessa ja toiminnassa (15) (20). Nämä harvasukasmadot elävät maassa ja osittain maan pinnalla (erityisesti karikkeessa). Ne ovat usein runsaimpia lajeja biomassalla mitattuna (54). Koska nämä eläimet aiheuttavat maaperän bioturbaatiota ja ovat saaliseläimiä, niillä voi olla suuri vaikutus kemikaalien biologiseen hyötyosuuteen muille organismeille, kuten selkärangattomille (kuten petopunkeille ja kovakuoriaisille, esim. (64)) tai selkärankaisille saalistajille (kuten ketuille ja lokeille) (18) (62). Osa maalla elävien harvasukasmatojen lajeista, joita käytetään nykyään ekotoksikologisissa testeissä, on kuvattu liitteessä 5.

3. ASTM:n oppaassa "Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus" (3) on paljon tärkeää ja hyödyllistä tietoa nykyisen maaperän biokertyvyyden testimenetelmän toiminnasta. Muita asiakirjoja, joihin tässä testimenetelmässä viitataan, ovat tämän liitteen luku C.13 Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa (49) ja OECD:n testiohje nro 315: Biokertyvyys pohjaeläiminä lietteessä elävissä harvasukasmadoissa (53). Lisäksi testimenetelmän tietolähteinä on käytetty käytännön kokemusta maaperän biokertymistutkimuksista ja julkaistua kirjallisuutta, kuten (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) ja (79).

4. Tämä testimenetelmä soveltuu lähinnä stabiileille, neutraaleille orgaanisille kemikaaleille, jota adsorboituvat maaperään. Maaperään liittyvien stabiileiden metalliorgaanisten yhdisteiden biokertyvyyden testaaminen voi olla mahdollista tällä testimenetelmällä. Menetelmää voidaan soveltaa myös metalleihin ja muihin hivenaineisiin.

ENNAKKOEDELLYTYS

5. Kemikaalin biokertyminen maalla eläviin harvasukasmatoihin on mitattu raskasmetalleilla (ks. esim. (63)) ja pysyvillä orgaanisilla kemikaaleilla, joiden log K_{ow} -arvo on välillä 3,0–6,0, esim. (40). Tällaiset testit koskevat myös seuraavia aineita:

— kemikaalit, joiden log K_{ow} -arvo on yli 6,0 (superhydrofobiset kemikaalit)

— kemikaalit, jotka kuuluvat sellaisten orgaanisten kemikaalien luokkaan, jotka voivat tunnetusti biokertyä eläviin organismeihin, kuten pinta-aktiiviset tai hyvin adsorboituvat kemikaalit

— kemikaalit, joiden rakenteelliset ominaisuudet viittaavat mahdolliseen biokertyvyyteen, kuten tunnetusti biokertyvien kemikaalien analogit

— metallit.

6. Testikemikaalin tiedot, kuten yleisnimi, kemiallinen nimi (mieluiten IUPAC-nimi), rakennekaava, CAS-numero, puhtaus, turvallisuus ja varotoimet, asianmukaiset säilytysolosuhteet ja analyysimenetelmät, on selvitettävä ennen tutkimusta. Lisäksi seuraavien seikkojen on oltava tiedossa:

a) vesiliukoisuus

b) oktanoli/vesi-jakautumiskerroin K_{ow}

c) maa-vesijakautumiskerroin K_{oc}

d) höyrynpaine

e) hajoavuus (esim. maassa, vedessä)

f) tunnetut metaboliitit.

7. Radioaktiivisesti merkittyjä ja merkitsemättömiä testikemikaaleja voidaan käyttää. Radioaktiivisesti merkittyjen kemikaalien käyttö on kuitenkin suositeltavaa, sillä se helpottaa analyysiä. Päätös tehdään havaitsemisrajojen tai lähtökemikaalin ja metaboliittien mittaustarpeen perusteella. Jos käytetään radioaktiivisesti merkittyä testikemikaalia ja mitataan radioaktiivisten jäämien kokonaismäärää, on tärkeää, että radioaktiiviset jäämät sekä maaperässä että testiorganismeissa kuvataan lähtötestikemikaalin prosentteina ja merkitään ei-lähtökemikaaleiksi esimerkiksi tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopulla otetuissa näytteissä, jotta lähtötestikemikaalin ja maaperän metaboliittien biokertyvyystekijä (BAF) voidaan laskea (ks. kohta 50). Tässä kuvattua menetelmää on muokattava esimerkiksi käyttämällä riittävää biomassaa, kun mitataan orgaanisia testikemikaaleja tai metalleja, joita ei ole merkitty radioaktiivisesti. Kun mitataan radioaktiivisten jäämien kokonaismäärää (nestetuikelaskennalla uuton jälkeen, polttamalla tai kudosta liuottamalla), biokertyvyystekijä perustuu lähtötestikemikaaliin ja metaboliitteihin. BAF-laskennan on suositeltavaa perustua lähtötestikemikaalin pitoisuuteen organismeissa ja radioaktiivisten jäämien kokonaismäärään. BAF-arvosta lasketaan BSAF-kerroin, joka ilmaisee biokertyvyyttä maaperästä maaeliöstön lajeihin, normalisoituna matojen rasvapitoisuuden ja maaperän orgaanisen hiilen pitoisuuden (OC) suhteen, jotta eri biokertyvyystestien tuloksia voidaan vertailla.

8. Testikemikaalin toksisuuden testissä käytetyille lajeille on oltava tiedossa (esim. vaikutuspitoisuus ECx tai tappava pitoisuus LCx kertymävaiheessa). Ks. esim. (19). Testikemikaalin valitun pitoisuuden on oltava mieluiten noin 1 prosentti sen akuutista asymptoottisesta LC50-arvosta ja vähintään 10 kertaa korkeampi kuin sen havaitsemisraja maassa käytettävällä määritysmenetelmällä. On suositeltavaa käyttää subletaalien tutkittavien ominaisuuksien pitkäaikaisista tutkimuksista saatuja toksisuusarvoja, jos sellaisia on käytettävissä (51) (52). Jos tietoja ei ole saatavissa, välittömän myrkyllisyyden testistä saadaan hyödyllistä tietoa (ks. esim. (23)).

9. Testiliuoksissa, maaperässä ja biologisessa aineksessa olevan kemikaalin kvantifioimiseksi täytyy olla käytettävissä sopiva määritysmenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan. Käytettävissä on oltava myös näytteen valmistusta ja säilyttämistä koskevat tiedot sekä materiaalin käyttöturvallisuustiedotteet. Testattavan aineen havaitsemisrajojen sekä maassa että madon kudoksissa pitäisi myös olla tiedossa. Käytettäessä 14C-merkittyä testattavaa ainetta, on tunnettava ominaisradioaktiivisuus (esim. Bq mol-1) ja epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden prosenttiosuus. Testikemikaalin ominaisradioaktiivisuuden on oltava tarpeeksi korkea, jotta analysointi helpottuu, eivätkä käytetyt testipitoisuudet saa aiheuttaa toksisia vaikutuksia.

10. Testi voidaan tehdä keinomaalla tai luonnonmaalla. Käytetyn luonnonmaan ominaisuudet, kuten maan tai sen ainesosien alkuperä, pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet) ja vedensitomiskyky (WHC), on tiedettävä ennen testin aloittamista (3) (48).

TESTIN PERIAATE

11. Testikemikaalin biokertymistä kuvaavia parametreja ovat biokertyvyystekijä (BAF), kertymävakio (k_s) ja poistumisvakio (k_e). Määritelmät ovat lisäyksessä 1.

12. Testissä on kaksi vaihetta: kertymävaihe (altistusvaihe) ja poistumavaihe (altistuksen jälkeinen vaihe). Kertymävaiheen aikana matojen rinnakkaiset testiryhmät altistetaan maalle, johon on lisätty testikemikaalia. Testieläinten lisäksi on matojen kontrolliryhmä, jotka altistetaan muuten identtisille olosuhteille, mutta ilman testikemikaalia. Testiorganismien kuivapaino ja rasvapitoisuus mitataan. Mittaukset voidaan tehdä kontrolliryhmän madoille. Analyyttiset tausta-arvot saadaan analysoimalla kontrollimatojen ja maan näytteitä. Poistumavaiheessa madot siirretään maahan, joka ei sisällä testikemikaalia. Poistumavaihe tarvitaan muulloin kuin silloin, kun testikemikaalin kertymä on ollut hyvin vähäinen altistusvaiheen aikana. Poistumavaiheesta saadaan tietoa siitä, millä nopeudella testiorganismit erittävät testikemikaalia (esim. (27)). Jos tasapainotilaa ei saavuteta kertymävaiheen aikana, kineettisten parametrien – kineettisen biokertyvyystekijän BAFk, kertymis- ja poistumisvakioiden – määrityksen on hyvä perustua kertymä- ja poistumisvaiheen tulosten samanaikaiseen sovittamiseen. Testikemikaalin pitoisuutta madoissa ja matojen pinnalla seurataan testin kummassakin vaiheessa.

13. Kertymävaiheen aikana mittauksia tehdään näytteenottoajankohtina enintään 14 vuorokauden (änkyrimadot) tai 21 vuorokauden ajan (lierot), kunnes tasapainotila saavutetaan (11) (12) (67). Tasapainotila saavutetaan, kun pitoisuutta madoissa suhteessa aikaan esittävä käyrä on aika-akselin suuntainen ja kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä pitoisuusmääritystä eroavat enintään ± 20 prosenttia tilastollisen vertailun perusteella (esim. varianssianalyysi tai regressioanalyysi).

14. Poistumavaiheessa testiorganismit siirretään astioihin, joissa on samaa substraattia mutta ei testikemikaalia. Poistumavaiheen aikana mittauksia tehdään näytteenottoaikoina 14 vuorokautta (änkyrimadot) tai 21 vuorokautta (lierot), ellei analyyttinen määritys osoita aiemmin, että testikemikaalin jäämät ovat laskeneet madoissa 90 prosenttia. Testikemikaalin pitoisuus madoissa poistumavaiheen jälkeen raportoidaan eliminoitumattomina jääminä. Tasapainotilan biokertyvyystekijä (BAFss) lasketaan mieluiten sekä madoissa (Ca) ja maassa (Cs) olevan pitoisuuden suhteena, kun tasapainotila näyttää olevan saavutettu, että kineettisenä biokertyvyystekijänä (BAFK) maan kertymävakion (ks) ja poistumavakion (ke) 2 suhteena (määritelmät ovat lisäyksessä 1), kun oletetaan, että reaktio noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa (tietoa laskelmista on lisäyksessä 2). Jos on ilmeistä, että reaktio ei noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, on käytettävä muita malleja.

15. Kertymävakio, poistumavakio (tai vakiot, jos käytetään muita malleja), kineettinen biokertyvyystekijä (BAFK) ja mahdollisuuksien mukaan näiden muuttujien luottamusvälit lasketaan tietokonemalleista (ohjeet ovat lisäyksessä 2). Mallin soveltuvuuden voi määrittää esimerkiksi korrelaatiokertoimella tai determinaatiokertoimella (soveltuvuus on hyvä, jos kerroin on lähellä yhtä) tai khii^2-testillä. Myös keskivirheen koko tai arvioitujen parametrien luottamusväli voivat kuvata mallin soveltuvuutta.

16. Jos testikemikaali on hyvin lipofiilinen, testitulosten vaihtelua voi vähentää ilmaisemalla biokertyvyystekijät suhteessa rasvapitoisuuteen ja orgaanisen hiilen pitoisuuteen (kilossa maan orgaanista hiiltä, kilossa madon rasvamäärässä). Tämä perustuu siihen, että tietyissä kemikaalien luokissa biokertyvyyspotentiaalin ja rasvahakuisuuden välillä on selvä suhde, mikä osoitettu kalojen osalta (47). Kalan rasvapitoisuuden ja näiden kemikaalien

biokertyvyyden välillä on suhde. Samanlaisia korrelaatioita on havaittu pohjaeliöissä. Tästä esimerkkinä (30) (44). Korrelaatio on osoitettu myös maalla elävien harvasukasmatojen osalta (esim. (5) (6) (7) (14)). Jos matojen kudosta on saatavilla riittävästi, eläinten rasvapitoisuus voidaan määrittää käyttämällä samaa biologista ainesta, jota käytettiin testikemikaalin pitoisuuden määrittämiseen. Rasvapitoisuus voidaan mitata myös kontrollieläimistä.

TESTIN LUOTETTAVUUS

17. Testi on luotettava, jos seuraavat ehdot täyttyvät sekä kontrolli- että käsittelyryhmässä:

— Testin lopussa yleinen kuolleisuus kertymä- ja poistumavaiheen aikana ei saa olla yli 10 prosenttia (lierot) tai 20 prosenttia (änkyrimadot) käytettyjen matojen kokonaismäärästä.

— *Eisenia fetida*- ja *Eisenia andrei* -lajien keskimääräinen painohäviö, joka mitataan kertymävaiheen ja poistumavaiheen lopussa, ei saa olla yli 20 prosenttia verrattuna jokaisen jakson alun alkuperäiseen tuorepainoon (f.w.).

MENETELMÄN KUVAUS

Testilajit

18. Biokertyvyystesteihin suositellaan useita maalla elävien harvasukasmatojen lajeja. Yleisimmin käytetyt lajit tunkioliero eli kompostiliero (*Eisenia fetida*) tai *Eisenia andrei* (Lumbricidae), änkyrimato (*Enchytraeus albidus*), *Enchytraeus crypticus* ja *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae)) on kuvattu lisäyksessä 5.

Laite

19. Missään laitteiston osissa ei saisi käyttää materiaaleja, jotka voivat liuottaa tai adsorboida testikemikaalia, joista voi liueta muita kemikaaleja ja jotka voivat vaikuttaa haitallisesti testieläimiin. Testissä voidaan käyttää normaaleja suorakulmaisia tai lieriömäisiä astioita, jotka on valmistettu kemiallisesti inertistä materiaalista ja jotka ovat riittävän tilavia testimatojen määrään nähden. Ruostumatonta terästä, muovia tai lasia voidaan käyttää laitteissa ja välineissä, jotka ovat kosketuksissa testiliuosten kanssa. Testiastiat on peitettävä siten, että madot eivät pääse karkaamaan, mutta astiaan täytyy kuitenkin päästä riittävästi ilmaa. Jos käytettävän kemikaalin adsorptiokerroin on korkea, kuten synteettisillä pyretroideilla, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet on heitettävä pois käytön jälkeen (49). Radioaktiivisesti merkittyjä testiaineita ja haihtuvia kemikaaleja on estettävä karkaamasta. Testiastioista mahdollisesti haihtuvat jäämät on kerättävä loukuilla (esim. kaasunpesupulloilla), joissa on soveltuvaa adsorbenttia.

Maa-aines

20. Testissä käytettävän maa-aineksen on oltava laadultaan sellaista, että testiorganismit elävät ja mielellään myös lisääntyvät siinä totuttautumisvaiheen ja testin aikana ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään epänormaalia muutosta. Matojen kuuluu kaivautua maa-ainekseen.

21. Tämän liitteen luvussa C.8 (48) kuvattua keinomaata suositellaan käytettäväksi substraattina testeissä. Ohjeet keinomaan valmistamisesta biokertyvyystestejä varten ja keinomaan säilytysohjeet annetaan lisäyksessä 4. Ilmakuivattua keinomaata voidaan säilyttää huoneenlämpötilassa käyttöön asti.

22. Myös saastumattomalta paikalta kerättyä luonnonmaata voidaan käyttää testeissä ja/tai kasvatuksessa. Luonnonmaasta on annettava vähintään alkuperä (keräyspaikka), pH, orgaanisen hiilen pitoisuus, hiukkaskokojakauma (hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet), suurin mahdollinen vedensitomiskyky (WHCmax) ja vesipitoisuus prosentteina (3). Hyödyllistä tietoa saadaan, kun maa-aineksesta tai sen ainesosista analysoidaan mikrosaasteet ennen sen käyttöä. Jos käytettävä maa-aines on peräisin viljelysmaasta, sitä ei saa olla käsitelty kasvinsuojeluaineilla tai lannoitettu hoidetuista eläimistä saadulla lannalla vähintään vuoteen eikä orgaanisilla lannoitteilla vähintään kuuteen kuukauteen ennen näytteenottoa (50). Luonnonmaan käsittely ennen laboratoriossa tehtäviä ekotoksikologisia testejä harvasukasmadoilla kuvataan kohdassa (3). Jos käytetään luonnonmaata, säilytysaika laboratoriossa on pidettävä mahdollisimman lyhyenä.

Testikemikaalin lisääminen

23. Testikemikaali lisätään maa-ainekseen. Testikemikaalin fysikaaliskemialliset ominaisuudet on otettava huomioon. Jos testikemikaali on vesiliukoinen, se on liuotettava kokonaan veteen ennen sekoittamista maa-ainekseen. Heikosti veteen liukenevien testikemikaalien suositellussa lisäysmenetelmässä yksi tai monta (keino)maan ainesosaa pinnoitetaan testikemikaalilla. Esimerkiksi kvartsihiekkaa tai sen osaa voidaan liottaa liuoksessa, jossa on testikemikaalia ja soveltuvaa orgaanista liuotinta. Liuoksen annetaan hitaasti haihtua kuivaksi. Sen jälkeen

testikemikaalilla pinnoitettu osio sekoitetaan märkään maahan. Tässä menetelmässä on se suuri etu, että maahan ei lisätä lainkaan liuotinta. Kun käytetään luonnonmaata, testikemikaali voidaan lisätä ilmakuivattuun maa-ainekseen, kuten edellä on kuvattu keinomaan osalta, tai sekoittaa märkään maahan, minkä jälkeen mahdollinen liuotusapuaine haihdutetaan. Märän maan ja liuottimien kosketusta on vältettävä, jos suinkin mahdollista. Seuraavat seikat on otettava huomioon (3):

— Jos liuottimena käytetään muuta kuin vettä, liuottimen on oltava veteen sekoittuvaa ja/tai se on voitava poistaa muulla tavoin (kuten haihduttamalla), jotta maa-ainekseen jää vain testikemikaalia.

— Jos liuotinkontrolli on käytössä, negatiivista kontrollia ei tarvita. Liuotinkontrollissa on oltava korkein pitoisuus maahan lisättyä liuotinta. Käytettävän liuottimen on oltava peräisin samasta erästä, josta kantaliuos on tehty. Liuottimen toksisuus ja haihtuvuus sekä testikemikaalin liukenevuus valittuun liuottimeen ovat tärkeimmät kriteerit soveltuvan liuotusapuaineen valinnassa.

24. Jos kemikaali liukenee heikosti veteen ja orgaanisiin liuottimiin, haluttu testipitoisuus saadaan sekoittamalla testikemikaaliin 2,0–2,5 g hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa testiastiaa kohden esimerkiksi huhmareella. Tämä kvartsihiekan ja testikemikaalin seos lisätään esikostutettuun maahan ja sekoitetaan hyvin soveltuvaan määrään deionisoitua vettä, jotta saadaan tarvittava kosteuspitoisuus. Lopullinen seos jaetaan testiastioihin. Sama toistetaan jokaista testipitoisuutta varten, ja lisäksi valmistellaan asianmukainen kontrolli, jossa on 2,0–2,5 g hienoksi jauhettua kvartsihiekkaa testiastiaa kohden.

25. Testikemikaalin pitoisuus maassa on määritettävä testikemikaalin lisäämisen jälkeen. Ennen testiorganismien lisäämistä on varmistettava, että testikemikaali on jakautunut homogeenisesti maahan. Käytetty lisäysmenetelmä ja tietyn lisäysmenetelmän valintaperusteet ilmoitetaan (24).

26. Ihanteellisessa tilanteessa maa ja huokosvesifaasi ovat tasapainossa ennen organismien lisäämistä. Suositeltava tasapainotusjakso on neljä päivää lämpötilassa 20 °C. Useilla heikosti veteen liukenevilla orgaanisilla kemikaaleilla vie päiviä tai kuukausia, ennen kuin adsorboituneet ja liuotetut fraktiot ovat aidosti tasapainossa. Tutkimuksen tarkoituksen vaatiessa, esimerkiksi ympäristöolosuhteita jäljiteltäessä, maata, johon testikemikaalia on lisätty, voidaan "kypsyttää" pidempäänkin, esimerkiksi kolme viikkoa lämpötilassa 20 °C, kun kyseessä ovat metallit (22).

Testiorganismien viljely

27. Madot pidetään mieluiten pysyvästi laboratorioviljelmässä. *Eisenia fetidan*, *Eisenia andrein* ja *Enchytraeid*-lajien laboratorioviljelyohjeet ovat lisäyksessä 5 (ks. myös (48) (51) (52)).

28. Testeissä käytettävillä madoilla ei saa olla havaittavia sairauksia, poikkeavuuksia tai loisia.

TESTIN SUORITTAMINEN

29. Testiorganismit altistetaan testikemikaalille kertymävaiheessa. Kertymävaiheen pituus on 14 vuorokautta (änkyrimadot) tai 21 vuorokautta (lierot), ellei jo aiemmin voida osoittaa, että tasapainotila on saavutettu.

30. Poistumavaiheessa madot siirretään maahan, joka ei sisällä testikemikaalia. Ensimmäinen näyte otetaan 4–24 h poistumavaiheen alkamisen jälkeen. Esimerkkejä 21-päiväisen kertymävaiheen ja 21-päiväisen poistumavaiheen näytteenoton aikatauluista on lisäyksessä 3.

Testiorganismit

31. Monien maalla elävien änkyrimatolajien yksilöpaino on hyvin pieni (esim. *Enchytraeus albidus* -yksilöiden märkäpaino 5–10 mg ja *Enchytraeus crypticus*- ja *Enchytraeus luxuriosus* -lajien vähemmän). Jotta paino voidaan mitata ja kemiallinen analyysi tehdä, voi olla tarpeen yhdistää rinnakkaisten testiastioiden madot (eli kaikkia rinnakkaisastian matoja käytetään yhteen kudosanalyysiin). Jokaiseen rinnakkaisastiaan lisätään 20 änkyrimatoa, ja rinnakkaisnäytteitä on oltava vähintään kolme. Jos testikemikaalin analyyttinen havaitsemisraja on korkea, matoja saatetaan tarvita enemmän. Jos testilajin yksilöpaino on tätä suurempi (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei*), voidaan käyttää rinnakkaisnäyteastioita, joissa on vain yksi yksilö.

32. Testissä käytettävien lierojen on painettava suunnilleen yhtä paljon (esim. *Eisenia fetidan* ja *Eisenia andrein* yksilöpainon on oltava 250–600 mg). Änkyrimatojen (esim. *Enchytraeus albidus*) pituuden on oltava noin 1 cm. Kaikkien tietyssä testissä käytettävien matojen on oltava peräisin samasta lähteessä, ja eläinten on oltava aikuisia ja sukukypsiä (ks. lisäys 5). Koska eläimen paino ja ikä saattavat vaikuttaa BAF-arvoihin (esim.

rasvapitoisuuden vaihtelun ja/tai munien vuoksi), nämä parametrit on kirjattava täsmällisesti ja huomioitava tuloksia tulkittaessa. Lisäksi BAF-arvoihin vaikuttaa myös munakoteloiden mahdollinen muniminen altistusjaksolla. On suositeltavaa, että testimatojen alaryhmä punnitaan ennen testiä, jotta keskimääräinen märkä- ja kuivapaino voidaan arvioida.

33. Maa-mato-suhteen on oltava korkea, jotta testikemikaalin pitoisuuden lasku maassa voidaan minimoida kertymisjakson aikana. *Eisenia fetida*- ja *Eisenia andrei* -lajeille maata on oltava vähintään 50 g (kuivapaino) matoa kohden, ja änkyrimadoille suositellaan vähintään 10–20 g maata (kuivapaino) testiastiaa kohden. Astiassa olevan maakerroksen paksuuden on oltava 2–3 cm (änkyrimadot) tai 4–5 cm (lierot).

34. Testissä käytetyt madot poistetaan viljelmästä (esim. änkyrimadot korupihdeillä). Aikuiset eläimet siirretään käsittelemättömään testimaahan totuttautumista varten ja ruokitaan (ks. kohta 36). Jos testiolosuhteet poikkeavat viljelyolosuhteista, 24–72 tunnin totuttamisjakso on riittävä, jotta madot ehtivät sopeutua testioloihin. Totuttamisjakson jälkeen lierot huuhdellaan siirtämällä ne lasimaljoihin (esim. petrimaljoihin), joissa on puhdasta vettä. Lierot punnitaan, ennen kuin ne lisätään testimaahan. Ennen punnitusta ylimääräinen vesi poistetaan madoista painamalla niitä varovasti astian reunaa vasten tai taputtelemalla ne varovasti kuiviksi kevyesti kostutetulla paperiliinalla.

35. Testiorganismien kaivautumiskäyttäytymistä havainnoidaan ja tiedot kirjataan ylös. Kun testeissä käytetään lieroja, eläimet (kontrolli- ja testieläimet) yleensä kaivautuvat maahan parissa tunnissa. Tarkista asia 24 tunnin kuluessa siitä, kun madot on lisätty testiastioihin. Jos lierot eivät kaivaudu maahan (esim. yli 10 prosenttia on kaivautumatta yli puolet aikaa kertymävaiheesta), testiolosuhteet eivät ole sopivat tai testiorganismit eivät ole terveitä. Tällöin testi on lopetettava ja aloitettava alusta. Änkyrimadot elävät lähinnä maan huokosissa, ja niiden ruumiinpeite on usein vain osittaisessa kosketuksessa ympäröivään substraattiin. Kaivautuvien ja ei-kaivautuvien änkyrimatojen altistuksen oletetaan olevan vastaava, eikä testiä tarvitse välttämättä toistaa, jos änkyrimadot eivät kaivaudu.

Ruokinta

36. Ruokintaa on harkittava, jos käytetään maata, jossa orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus on matala. Kun käytetään keinomaata, lieroille on suositeltavaa antaa kerran viikossa 7 mg kuivatettua lantaa yhtä grammaa maata (kuivapaino) kohden ja änkyrimadoille 2–2,5 mg jauhettuja kaurahiutaleita viikossa yhtä grammaa maata (kuivapaino) kohden (11). Ensimmäinen ravintoannos sekoitetaan maahan heti testiorganismien lisäämisen jälkeen. Viljelmissä on suositeltavaa käyttää samantyyppistä ravintoa (katso lisäys 5).

Valo ja lämpötila

37. Testeissä testiastioiden ympäristössä käytetään kontrolloitua valon ja pimeän vaihtelua siten, että 16 tuntia on valoisaa ja 8 tuntia pimeää. Valon suositeltava voimakkuus on 400–800 luksia (3). Lämpötilan on oltava 20 ± 2 °C koko testin ajan.

Testipitoisuudet

38. Testissä käytetään yhtä pitoisuutta. Lisäpitoisuutta tai -pitoisuuksia saa käyttää vain perustellusta syystä. Jos testikemikaalin toksisuus (ECx) on lähellä analyyttistä havaitsemisrajaa, on suositeltavaa käyttää radioaktiivisesti merkittyä testikemikaalia, jonka ominaisradioaktiivisuus on korkea. Metallien osalta pitoisuuden on oltava taustatasoa korkeampi kudoksissa ja maassa.

Rinnakkaisnäytteet

39. Kineettisissä mittauksissa (kertymä- ja poistumavaihe), käsiteltyjen rinnakkaisastioiden määrä on vähintään kolme näytteenottokertaa kohden. Rinnakkaisnäytteitä on valmistettava niin monta, että ne riittävät kaikkiin näytteenottokertoihin kertymä- ja poistumavaiheen aikana.

40. Biologisiin havaintoihin ja mittauksiin (esim. kuivapainon ja märkäpainon suhde, rasvapitoisuus) ja matojen ja maan taustapitoisuuksien analysointiin tarvitaan vähintään 12 rinnakkaisastiaa negatiivista kontrollia varten (neljä alussa, neljä kertymävaiheen lopussa ja neljä poistumavaiheen lopussa), jos ei käytetä muuta liuotinta kuin vettä. Jos testikemikaalin lisäämisessä käytetään jotakin liuotusapuainetta, käsiteltyjen rinnakkaisnäytteiden lisäksi tarvitaan liuotinkontrolli (neljä rinnakkaisastiaa alussa, neljä kertymävaiheen lopussa ja neljä poistumavaiheen lopussa), jossa on kaikki muut ainesosat testattavaa ainetta lukuun ottamatta. Tässä tapauksessa voidaan valmistella vielä neljä negatiivista kontrolliastiaa (ei liuotinta) valinnaista näytteenottoa varten kertymävaiheen lopussa. Rinnakkaisnäytteitä verrataan biologisesti liuotinkontrolliin, jotta saadaan tietoa liuottimen mahdollisesta vaikutuksesta testiorganismeihin. On suositeltavaa perustaa varalle riittävä määrä ylimääräisiä rinnakkaisastioita (esim. kahdeksan) käsittelyä ja kontrollia/kontrolleja varten.

Maan laatua koskevien mittausten taajuus

41. Maan pH, maan kosteuspitoisuus ja lämpötila (jatkuva) testihuoneessa mitataan kertymä- ja poistumavaiheen alussa ja lopussa. Maan kosteuspitoisuus tarkistetaan kerran viikossa punnitsemalla testiastiat ja vertaamalla todellista painoa alkuperäiseen painoon testin alussa. Vedenhukka korvataan lisäämällä deionisoitua vettä.

Näytteenotto ja analyysit madoista ja maasta

42. Esimerkki lierojen ja änkyrimatojen biokertymistestien kertymä- ja poistumavaiheen aikataulusta on lisäyksessä 3.

43. Testiastioista otetaan maanäyte, josta määritetään testikemikaalin pitoisuus ennen matojen lisäämistä sekä kertymä- ja poistumavaiheen aikana. Testin aikana testikemikaalin pitoisuudet määritetään madoista ja maasta. Kokonaispitoisuudet maassa mitataan. Pitoisuudet huokosvedessä voidaan myös mitata haluttaessa. Tässä tapauksessa perusteet ja soveltuvat menetelmät on määritettävä ennen tutkimuksen aloittamista ja sisällytettävä raporttiin.

44. Madoista ja maasta otetaan näyte vähintään kuusi kertaa kertymä- ja poistumavaiheen aikana. Jos testikemikaalin stabiilisuus on osoitettu, maa-analyysien määrää voi vähentää. On suositeltavaa analysoida vähintään kolme rinnakkaisnäytettä kertymävaiheen alussa ja lopussa. Jos kertymävaiheen lopussa mitattu pitoisuus maassa poikkeaa alkuperäisestä pitoisuudesta yli 30 prosenttia, myös muina päivinä otetut maanäytteet on analysoitava.

45. Poista kunakin näytteenottoajankohtana madot tietyn rinnakkaisnäytteen maasta (esim. levittämällä rinnakkaisnäytteen maa-aines matalalle vadille ja poimimalla madot pehmeillä korupihdeillä) ja huuhtaise madot vedellä matalassa lasi- tai teräsastiassa. Poista ylimääräinen vesi (ks. kohta 34). Siirrä madot varovasti esipunnittuun astiaan ja punnitse ne heti suolen sisältö mukaan lukien.

46. Sen jälkeen lierojen (*Eisenia*) annetaan tyhjentää suoli yli esim. kostealle suodatinpaperille peitetyssä petrimaljassa (ks. kohta 34). Kun suoli on tyhjennetty, matojen paino määritetään, jotta mahdollinen biomassan lasku testin aikana voidaan määrittää (katso kohdassa 17 annetut luotettavuuskriteerit). Änkyrimadot punnitaan ja kudokset analysoidaan ilman suolen tyhjentämistä, sillä se on teknisesti vaikeaa matojen pienen koon vuoksi. Kun lopullinen painon määritys on tehty, madot tapetaan heti soveliaimmalla tavalla (esim. nestemäisellä typellä tai pakastamalla alle −18 °C:n lämpötilassa).

47. Poistumavaiheen aikana madot korvaavat kontaminoituneen suolensisällön puhtaalla maalla. Siitä syystä matojen, jotka eivät tyhjennä suolta (tässä yhteydessä änkyrimatojen), heti poistumavaiheen jälkeen tehdyissä mittauksissa on mukana suolen kontaminoitunut maa. Vedessä elävien harvasukasmatojen osalta oletetaan, että poistumavaiheen ensimmäisten 4–24 tunnin jälkeen kontaminoitunut suolen sisältö on korvautunut puhtaalla sedimentillä, esim. (46). Vastaavia löydöksiä on raportoitu lieroista radioaktiivisesti merkityn kadmiumin ja sinkin kertymisen tutkimuksissa (78). Änkyrimadoilla, joiden suolta ei ole tyhjennetty, tätä poistumavaiheen ensimmäistä näytettä voidaan pitää kudospitoisuutena suolen tyhjennyksen jälkeen. Jotta kontaminoitumattoman maan laimentava vaikutus testattavan aineen pitoisuuteen poistumavaiheessa voidaan huomioida, suolen sisällön paino voidaan arvioida madon märkäpainon ja tuhkapainon tai madon kuivapainon ja tuhkapainon suhteesta.

48. Maa- ja matonäytteet on suositeltavaa analysoida heti poistamisen jälkeen (1–2 päivän kuluessa), jotta hajoaminen ja muu hävikki voidaan välttää, ja keskimääräiset kertymä- ja poistumanopeudet on suositeltavaa laskea testin kuluessa. Jos analyysi viivästyy, näytteitä säilytetään asianmukaisella tavalla, kuten pakastamalla (≤ −18 °C).

49. On tarkistettava, että kyseisessä menetelmässä kemiallisen analyysin tarkkuus ja toistettavuus sekä testikemikaalin saalis maa- ja matonäytteistä ovat tyydyttävät. Havaitsemisraja (LOD) ja määritysraja (LOQ) on raportoitava. On myös tarkistettava, että testikemikaalia ei havaita kontrolliastioissa taustapitoisuutta suurempina pitoisuuksina. Kun testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa Ca on > 0 kontrollimadoissa, se on sisällytettävä kineettisten parametrien laskentaan (ks. lisäys 2). Kaikkia näytteitä on käsiteltävä koko testin ajan siten, että esim. kontaminaatio ja hävikki (joka johtuu esim. testikemikaalin adsorboitumisesta näytteenottovälineeseen) on mahdollisimman vähäistä).

50. Kun testikemikaalit ovat radioaktiivisesti merkittyjä, voidaan analysoida lähtökemikaali ja metaboliitit. Lähtötestikemikaalin ja metaboliittien kvantifiointi tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa antaa tärkeää tietoa. Sen jälkeen näytteet "puhdistetaan" siten, että lähtötestikemikaali voidaan määrittää erikseen. Jos yksittäiset metaboliitit muodostavat yli 10 prosenttia analysoidun näytteen tai näytteiden radioaktiivisuudesta, näiden metaboliittien tunnistus on suositeltavaa.

51. Kokonaissaanto sekä testikemikaalin saanto madoista, maasta ja mahdollisista loukuista, joissa on adsorbentteja haihtuneen testikemikaalin keräystä varten, on kirjattava ylös ja raportoitava.

52. Tietystä testiastiasta otetut yksilöt voidaan yhdistää, jos kyseessä ovat änkyrimadot, jotka ovat pienempiä kuin lierot. Jos yhdistäminen vähentää rinnakkaisnäytteiden määrää, soveltuvien tilastomenetelmien määrä laskee. Jos tietty tilastomenetelmä ja tilastollinen voima ovat tarpeen, testissä on oltava yhdistämisen, tarvittavien menetelmien ja tilastollisen voiman edellyttämä määrä rinnakkaisastioita.

53. BAF on suositeltavaa ilmaista kokonaiskuivapainon funktiona ja tarvittaessa (esim. hyvin hydrofobiset kemikaalit) rasvapitoisuuden funktiona. Rasvapitoisuus on määritettävä soveltuvilla menetelmillä (tähän tarkoitukseen mukautetaan olemassa olevia menetelmiä, esim. (31) (58)). Näissä menetelmissä käytetään kloroformi-metanoliuuttoa. Kloorattujen liuottimien käyttöä on kuitenkin hyvä välttää. Käytä kohdassa (17) kuvattua Blighin ja Dyerin menetelmän muunnosta (9). Koska eri menetelmillä ei välttämättä saada samoja arvoja, on tärkeää kuvailla käytetty menetelmä. Ihanteellisessa tapauksessa (jos esim. matokudosta on riittävästi) rasva-analyysi tehdään samalle näytteelle tai uutteelle, josta testattava aine määritetään, koska rasvat täytyy usein poistaa uutteesta ennen kuin sitä voi käyttää kromatografiseen määritykseen (49). Rasvapitoisuus voidaan mitata myös kontrollieläimistä BAF-arvojen normalisointia varten. Jälkimmäinen vaihtoehto vähentää välineiden kontaminaatiota testikemikaalilla.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

54. Testikemikaalin kertymäkäyrä saadaan esittämällä madoissa tai matojen pinnalla kertymävaiheen aikana oleva testikemikaalin pitoisuus ajan funktiona aritmeettisella asteikolla. Jos käyrä osoittaa tasannevaihetta tai tasapainotilaa (määritelmät ovat lisäyksessä 1), tasapainotilan biokertymiskerroin BAF lasketaan seuraavalla kaavalla:

$$\frac{C_a \text{ tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa (keskiarvo)}}{C_s \text{ tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa (keskiarvo)}}$$

C_a on testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa

C_s on testikemikaalin pitoisuus maassa

55. Jos tasapainotilaa ei saavuteta, BAFss-arvon sijaan määritetään nopeusvakioihin perustuva BAF_K seuraavasti:

— Määritä kertyvyyskerroin (BAF_K) kertymävakion (k_s) ja poistumavakion (k_e) suhteena.

— Kertymä- ja poistumanopeudet on hyvä laskea samaan aikaan (ks. kaava 11 lisäyksessä 2).

— Poistumavakio (k_e) määritetään yleensä poistumakäyrästä, joka kuvaa testiaineen pitoisuutta madoissa poistumavaiheessa. Kertymävakio (k_s) lasketaan tunnetulla k_e-arvolla ja C_a-arvolla, joka saadaan kertymäkäyrästä (ks. lisäys 2). Paras menetelmä BAF_K:n ja nopeusvakioiden k_s ja k_e laskemiseksi on estimoida tietokoneella epälineaariset parametrit. Jos on ilmeistä, ettei poistuma noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, on käytettävä monimutkaisempia malleja.

Testiraportti

56. Testiraporttiin on sisällytettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— käytettävissä olevat tiedot testikemikaalin välittömästä tai pitkäaikaistoksisuudesta (esim. EC_x, LC_x, NOEC) maalla eläville harvasukasmadoille

— puhtaus, fysikaalinen olomuoto ja fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, esim. log K_{ow}, vesiliukoisuus

— kemialliset tunnistetiedot, testattavan aineen lähde, mahdollisen liuottimen tunnistetiedot ja pitoisuus

— jos testikemikaali on radioaktiivisesti leimattu, leimattujen atomien tarkka sijainti, ominaisradioaktiivisuus ja radiokemiallinen puhtaus.

Testilajit:

— tieteellinen nimi, kanta, lähde, mahdollinen esikäsittely, totuttamistiedot, ikä, koko jne.

Testiolosuhteet:

— käytetty testimenetelmä

— käytetty valaistustyyppi ja valon ominaisuudet sekä valojakso(t)

— testisuunnitelman kuvaus (esim. testiastioiden määrä ja koko, maan massa ja maakerroksen korkeus, rinnakkaisnäytteiden määrä, matojen määrä rinnakkaisnäytettä kohden, testipitoisuuksien määrä, kertymä- ja poistumavaiheen kesto, näytteenottotaajuus)

— testiastian materiaalin valintaperusteet

— testattavan aineen valmistelu ja lisäys sekä tietyn menetelmän valintaperusteet

— nimelliset testipitoisuudet, testiastioissa mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat sekä menetelmä, jolla arvot on laskettu

— keinomaan ainesosien lähde tai maa-aineksen alkuperä, jos käytetään luonnollista maata, mahdollisen esikäsittelyn kuvaus, kontrollien tulokset (eloonjäänti, biomassan kehitys, lisääntyminen), maan ominaisuudet (pH, orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus, hiukkaskokojakauma eli hiekan, siltin ja saven prosenttiosuudet, WHC_{max}, vesipitoisuus prosentteina testin alussa ja lopussa sekä muut tehdyt mittaukset)

— yksityiskohtaiset tiedot maa- ja matonäytteiden käsittelystä, mukaan lukien tiedot testattavan aineen säilytyksestä, lisäämistavasta, uutosta ja analyysimenetelmistä (sekä tarkkuudesta) matojen ja maan osalta sekä rasvapitoisuudesta (jos mitattu) ja testiaineen saannista.

Tulokset:

— kontrollimatojen ja jokaisessa testiastiassa olevien matojen kuolleisuus sekä mahdolliset havainnot epätavallisesta käyttäytymisestä (esim. maan välttely, lisääntymisen puute änkyrimatojen biokertyvyystestissä)

— maan ja testiorganismien kuiva- ja märkäpainon suhde (hyödyllinen normalisointia varten)

— matojen märkäpainot jokaisella näytteenottokerralla, lierojen märkäpainot testin alussa sekä jokaisella näytteenottokerralla ennen suolen tyhjennystä ja sen jälkeen

— testiorganismien rasvapitoisuus (jos määritetty)

— käyrät, jotka osoittavat testikemikaalin kertymä- ja poistumakinetiikan madoissa, ja aika tasapainotilan saavuttamiseen

— C_a ja C_s (tarvittaessa keskihajonta ja alue) kaikille näytteenottoajankohdille (C_a ilmaistaan muodossa grammaa kilossa koko ruumiin märkä- ja kuivapainoa ja C_s muodossa grammaa kilossa maan märkä- ja kuivapainoa) jos eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) tarvitaan (esim. kahden tai usean testin tulosten vertailuun, kun eläinten rasvapitoisuus poikkeaa toisistaan), C_a voidaan ilmaista myös muodossa grammaa kilossa organismin rasvamäärässä ja C_s muodossa grammaa kilossa maan orgaanista hiiltä (OC)

— BAF (kiloa maata kilossa matoa), maan kertymävakio k_s (grammaa maata kilossa matoa, päivä$^{-1}$), poistumavakio k_e (päivää$^{-1}$) ja BSAF (kiloa maan orgaanista hiiltä kilossa madon rasvamäärässä) voidaan myös ilmoittaa

— jos mitattu: maassa ja testieläimissä havaitut lähtökemikaalin, metaboliittien ja sitoutuneiden jäämien prosenttiosuudet (esim. testikemikaalin, jota ei voida uuttaa tavallisilla uuttomenetelmillä, määrä prosentteina)

— tietojen tilastollisessa analysoinnissa käytetyt menetelmät.

Tulosten arviointi

— kohdassa 17 annettujen luotettavuusehtojen täyttyminen

— odottamattomat tai epätavalliset tulokset, kuten testikemikaalin epätäydellinen poistuminen testieläimistä.

KIRJALLISUUSVIITTEET

1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688–00a.

3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: s. 26

4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.

6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W&Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.

7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.

8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.

9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.

10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, s. 671.

11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.

13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13–20.

14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91–100.

15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2–29.

16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, s. 555–576.

17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140–145.

19) Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1907/2006, annettu 18 päivänä joulukuuta 2006, kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta, EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.

20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman&Hall, London, s. 426.

21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: s. 149 Ladattavissa osoitteessa: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf

23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: s. 57

24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.

26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897–1905.

27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501–1514.

28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, s. 156.

29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.

30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.

31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.

32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.

34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. Teoksessa: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W.&Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

35) ISO 11268–2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

36) Jaenike J (1982). "E*isenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.

37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.

38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.

39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.

40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.

41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.

42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.

43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, s. 137.

44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.

45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.

46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates*. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48) Tämän liitteen luku C.8: Myrkyllisyystutkimus madoilla.

49) Tämän liitteen luku C.13. Biokertyvyys: testi kaloilla läpivirtausolosuhteissa.

50) Tämän liitteen luku C.21. Maaperän mikrobit: typen muuntumistesti.

51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388.

55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. Teoksessa: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.

56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77–81.

57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431–1436.

59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: s. 373

61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W.&Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.

62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107–127.

63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110–2120.

64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413–433.

65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M.&Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.

70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167–1171.

71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277–285.

74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW&Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023–1033.

76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409–417.

77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161–165.

78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843–1851.

79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT

Biokertyvyys on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen väliaineessa. Biokertymistä aiheuttaa biokonsentraatio ja biomagnifikaatio (katso seuraavat kohdat).

Biokonsentraatio on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen, joka johtuu ainoastaan kemikaalin kertymisestä ympäröivästä väliaineesta (ruumiin pinnan ja syödyn maan kautta), verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen väliaineessa.

Biomagnifikaatio on organismissa tai sen pinnalla olevan testikemikaalin pitoisuuden lisääntyminen, joka johtuu pääasiassa kontaminoituneen ravinnon tai saaliin nauttimisesta, verrattuna testikemikaalin pitoisuuteen ravinnossa tai saaliissa. Biomagnifikaatio voi aiheuttaa testattavan aineen siirtymistä tai kertymistä ravintoverkoissa.

Poistuminen on testikemikaalin poistumista testiorganismikudoksesta aktiivisilla tai passiivisilla prosesseilla riippumatta siitä, onko ympäröivässä väliaineessa testattavaa ainetta vai ei.

Biokertyvyystekijä (BAF) minä tahansa tämän kertyvyystestin kertymävaiheen ajankohtana on testikemikaalin pitoisuus testiorganismissa tai sen pinnalla (C_a, grammaa kilossa madon kuivapainoa) jaettuna kyseisen kemikaalin pitoisuudella väliaineessa (C_s, grammaa kilossa maan kuivapainoa). BAF ilmoitetaan kiloina maata kilossa matoa.

Biokertyvyystekijä tasapainotilassa (BAF_{ss}) ei muutu merkittävästi pitkän ajanjakson aikana, kun testikemikaalin pitoisuus väliaineessa on vakio tänä aikana (C_s, grammaa kilossa maan kuivapainoa).

Biokertyvyystekijöitä, jotka on laskettu suoraan maan kertymävakion (k_s) ja poistumavakion (k_e) suhteesta (katso jäljempänä), sanotaan kineettisiksi biokertyvyystekijöiksi (BAF_K).

Eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) on testikemikaalin rasvan suhteen normalisoitu pitoisuus testiorganismissa tai sen pinnalla jaettuna orgaanisen hiilen suhteen normalisoidulla pitoisuudella maassa tasapainotilassa. C_a ilmaistaan grammoina kilossa organismin rasvamäärässä, ja C_s grammoina kilossa maan orgaanista ainesta. BSAF ilmaistaan kiloina orgaanista hiiltä kilossa rasvaa.

Tasannevaihe tai **tasapainotila** on altistusvaiheessa samanaikaisesti tapahtuvien kertymä- ja poistumaprosessien välinen tasapainotila. Tasapainotila saavutetaan BAF:ää ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä BAF-määritystä poikkeavat enintään ± 20 prosenttia eikä näiden kolmen näytteenottoajanjakson välillä ole tilastollisesti merkitseviä eroja. Kun testataan kemikaaleja, jotka kertyvät hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta (49).

Orgaaninen hiili-vesi-jakautumiskerroin (K_{oc}) on kemikaalin maan orgaanisen hiilen fraktiossa olevan pitoisuuden ja vedessä tasapainotilassa olevan pitoisuuden välinen suhde.

Oktanoli-vesi-jakautumiskerroin (K_{ow}) on kemikaalin n-oktanoliliukoisuuden ja vesiliukoisuuden suhde tasapainotilassa, josta käytetään myös merkintää P_{ow}. Logaritmia K_{ow} (log K_{ow}) käytetään ilmaisemaan kemikaalin biokertyvyyspotentiaalia vesieliöissä.

Kertymä- eli altistumisvaihe on aika, jona testiorganismit altistetaan testattavalle kemikaalille.

Maan kertymävakio (k_s) on numeerinen arvo, joka määrittää kuinka nopeasti testiaineen pitoisuus nousee testiorganismissa tai sen pinnalla, koska testiainetta kertyy maafaasista. k_s ilmaistaan grammoina maata kilossa matoa, d^{-1}.

Poistumavaihe alkaa, kun testiorganismit on siirretty kontaminoituneesta väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole testattavaa ainetta. Poistumavaiheen aikana tutkitaan kyseisen testikemikaalin (netto)poistumaa testiorganismeista.

Poistumavakio (k_e) on numeerinen arvo, joka kuvaa testattavan aineen pitoisuuden alenemisen nopeutta testiorganismissa tai sen pinnalla, kun testiorganismit on siirretty testattavaa ainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta. k_e:n laatu on päivää$^{-1}$).

Testikemikaali: Tätä testimenetelmää käyttäen testattu aine tai seos.

Lisäys 2

Kertymä- ja poistumaparametrien laskeminen

Biokertymistestin tärkein tutkittava ominaisuus on biokertyvyystekijä BAF. Mitattu BAF voidaan laskea jakamalla pitoisuus testiorganismissa C_a pitoisuudella maassa C_s tasapainotilassa. Jos tasapainotilaa ei saavuteta kertymävaiheessa, BAF_K lasketaan nopeusvakioista eikä BAFss-arvosta. On kuitenkin ilmoitettava, perustuuko BAF tasapainotilan pitoisuuksiin vai nopeusvakioihin.

Kineettinen biokertyvyystekijä (BAF_K), maan kertymävakio (k_s) ja poistumavakio (k_e) lasketaan yleensä tietokoneella käyttäen epälineaarisia parametrien arviointimenetelmiä kohdassa (68) kuvattujen mallien perusteella. Kun tietokoneelle syötetään sarja peräkkäisiä aikapitoisuustuloksia ja mallikaavat:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 1]}$$

tai

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 2]}$$

jossa

C_a = kemikaalin pitoisuus madoissa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_s = kertymävakio kudoksessa [grammaa maata kilossa matoa, d-1]

C_s = kemikaalin pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_e = poistumavakio [d-1]

t_c = aika kertymävaiheen lopussa

nämä ohjelmat laskevat BAF_K-, k_s- ja k_e-arvot.

Kun taustapitoisuus ei-altistuneissa madoissa esim päivänä 0 poikkeaa merkittävästi nollasta (näin voi käydä esim. metallien kanssa), taustapitoisuus ($C_{a,0}$) on sisällytettävä näihin yhtälöihin seuraavasti:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 3]}$$

ja

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 4]}$$

Jos massaa havaitaan testikemikaalin pitoisuuden merkittävää laskua kertymävaiheen aikana, voidaan käyttää seuraavia malleja, esim. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[yhtälö 5]}$$

jossa

C_s = kemikaalin pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_0 = hajoamisen nopeusvakio maassa [d-1]

C_0 = kemikaalin alkuperäinen pitoisuus maassa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[yhtälö 7]}$$

jossa

C_a = kemikaalin pitoisuus madoissa [grammaa kilossa märkä- tai kuivapainoa]

k_s = kertymävakio kudoksessa [grammaa maata kilossa matoa, d-1]

k_0 = hajoamisen nopeusvakio maassa [d-1]

k_e = poistumavakio [d-1]

t_c = aika kertymävaiheen lopussa.

Kun tasapainotila saavutetaan kertymävaiheessa (eli t = ∞), yhtälö 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[yhtälö 1]}$$

voidaan muuttaa seuraavasti:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

tai

$$C_a/C_s = k_s/k_e = BAF_K \qquad \text{[yhtälö 8]}$$

Tällöin k_s/k_e x C_s lähenee testiaineen pitoisuutta matokudoksissa tasapainotilassa ($C_{a,ss}$).

Eliöstön-maaperän kertyvyyskerroin (BSAF) voidaan laskea seuraavasti:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[yhtälö 9]}$$

jossa f_{oc} on maan orgaanisen hiilen fraktio ja f_{lip} on matojen rasvan fraktio, joista kumpikin määritetään mieluiten testissä otetuista näytteistä. Ne perustuvat kuivapainoon tai märkäpainoon.

Poistumakinetiikkaa voidaan mallintaa poistumavaiheen tietojen avulla ja soveltamalla seuraavaa malliyhtälöä ja tietokonepohjaisia epälineaarisia parametrien arviointimenetelmiä. Jos ajan suhteen esitetyt datapisteet viittaavat testiaineen pitoisuuden jatkuvaan eksponentiaaliseen laskuun eläimissä, poistumisen ajallista esiintymistä voidaan kuvata yhden lohkon mallilla (yhtälö 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[yhtälö 10]}$$

Toisinaan poistumisprosessit vaikuttavat kaksivaiheisilta: C_a laskee nopeasti alkuvaiheissa, mutta poistumisen myöhemmissä vaiheissa testattavat aineet poistuvat hitaammin, esim. (27) (68). Nämä kaksi vaihetta voidaan tulkita olettamalla, että organismissa on kaksi eri lohkoa, joista testattava aine poistuu eri nopeuksilla. Tällöin on tutustuttava asiaa käsittelevään kirjallisuuteen, esim. (38) (39) (40) (78).

Edellä annettuja malliyhtälöitä käyttämällä voidaan laskea myös kineettiset parametrit (k_s ja k_e) yhdellä kertaa soveltamalla ensimmäisen asteen kineettistä mallia samanaikaisesti kaikkiin kertymä- ja poistumavaiheen tietoihin. Tällaisen kertymä- ja poistumavakioiden yhdistetyn laskennan kuvaus on viitteissä (40), (72) ja (69).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[yhtälö 11]}$$

Huomautus: Kun kertymä- ja poistumaparametrit estimoidaan samanaikaisesti yhdistetyistä kertymä- ja poistumatiedoista, yhtälön 11 ”m” on kuvaaja, joka sallii tietokoneohjelman määrittää yhtälön alaehdot niitä vastaavan vaiheen datajoukkoihin ja tehdä arvioinnin oikein (m = 1 kertymävaiheelle, m = 2 poistumavaiheelle).

Siitä huolimatta malliyhtälöiden käytössä on noudatettava varovaisuutta varsinkin, kun testikemikaalin biologisessa hyötyosuudessa tai (bio)hajoamisessa tapahtuu muutoksia testin aikana (ks. esim. (79)).

Lisäys 3

ESIMERKKEJÄ BIOKERTYVYYSTESTIEN AIKATAULUISTA

Testi lieroilla

a) Kertymävaiheessa 8 näytteenottopäivää kineettisten tietojen laskentaa varten

Päivä	Toiminnot
– 6	Valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Testikemikaaliliuoksen lisääminen maafraktioon, mahdollisen liuottimen haihdutus, maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, testiolosuhteiden vakauttaminen 4 päivän ajan (3 viikkoa, jos maahan lisätään metallia)
– 3 – – 1	Testiorganismien erottaminen viljelmästä totuttautumista varten, maan ainesosien valmistelu ja kostutus
0	Kosteuden ja maan pH-arvon mittaus, maanäytteiden ottaminen käsitellyistä astioista ja liuotinkontrolleista testikemikaalien pitoisuuden määrittämistä varten, ravintoannoksen lisääminen, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, riittävän matojen alanäytteiden säilyttäminen analyyttisten tausta-arvojen, märkä- ja kuivapainon sekä rasvapitoisuuden määrittämistä varten, kaikkien testiastioiden punnitus maan kosteuden kontrollointia varten, tuloilman kontrollointi, jos käytössä on suljettu testijärjestelmä
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testattavan aineen pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
8–9	Sama kuin päivänä 3
10	Sama kuin päivänä 1
11–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
15–16	Sama kuin päivänä 3
17	Sama kuin päivänä 1
18–20	Sama kuin päivänä 3
21	Sama kuin päivänä 1, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaaminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, kertymävaiheen loppu, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä poistumavaihetta varten astioihin, joissa on puhdasta maata (ei suolen tyhjennystä), maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Esialtistustoimet (tasapainovaihe) on ajoitettava testikemikaalin ominaisuuksien mukaan.
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

b) Poistumavaihe

Päivä	Toiminnot
– 6	Maan ainesosien valmistelu ja kostutus, valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, inkubaatio testiolosuhteissa 4 päivän ajan
0 (kertymävaiheen loppu)	Lämpötilan ja maan pH-arvon mittaus, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, ravintoannoksen lisääminen, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä astioihin, joissa on puhdasta maata, maa- ja matonäytteet 4–6 tunnin kuluttua testikemikaalin pitoisuuden määrittämistä varten
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testikemikaalin pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
8–9	Sama kuin päivänä 3
10	Sama kuin päivänä 1
11–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
15–16	Sama kuin päivänä 3
17	Sama kuin päivänä 1
18–20	Sama kuin päivänä 3
21	Sama kuin päivänä 1, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaus, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Maa valmistellaan ennen poistumavaihetta samoin kuin ennen kertymävaihetta
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

Testi änkyrimadoilla

a) Kertymävaiheessa 8 näytteenottopäivää kineettisten tietojen laskentaa varten

Päivä	Toiminnot
– 6	Valmistellun maa-aineksen sopeuttaminen 48 tunnin ajan
– 4	Testikemikaaliliuoksen lisääminen maafraktioon, mahdollisen liuottimen haihdutus, maan ainesosien sekoitus, maan jakaminen testiastioihin, testiolosuhteiden vakauttaminen 4 päivän ajan (3 viikkoa, jos maahan lisätään metallia)

Päivä	Toiminnot
– 3 – – 1	Testiorganismien erottaminen viljelmästä totuttautumista varten, maan ainesosien valmistelu ja kostutus
0	Kosteuden ja maan pH-arvon mittaus, maanäytteiden ottaminen käsitellyistä astioista ja liuotinkontrolleista testikemikaalien pitoisuuden määrittämistä varten, ravintoannoksen lisääminen maahan, matojen punnitus ja satunnaistettu jakaminen testiastioihin, riittävän matojen alanäytteiden säilyttäminen analyyttisten tausta-arvojen, märkä- ja kuivapainon sekä rasvapitoisuuden määrittämistä varten, kaikkien testiastioiden punnitus maan kosteuden kontrollointia varten, tuloilman kontrollointi, jos käytössä on suljettu testijärjestelmä
1	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytymisen ja lämpötilan kirjaaminen, maa- ja matonäytteiden ottaminen testattavan aineen pitoisuuden määrittämistä varten
2	Sama kuin päivänä 1
3	Tuloilman kontrollointi, matojen käyttäytyminen ja lämpötila
4	Sama kuin päivänä 1
5–6	Sama kuin päivänä 3
7	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen maahan, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen ja haihtuneen veden korvaaminen
9	Sama kuin päivänä 1
10	Sama kuin päivänä 3
11	Sama kuin päivänä 1
12–13	Sama kuin päivänä 3
14	Sama kuin päivänä 1, ravintoannoksen lisääminen maahan, lämpötilan ja maan pH-arvon mittaaminen, maan kosteuden kontrollointi punnitsemalla testiastiat uudelleen, kertymävaiheen loppu, matojen siirtäminen jäljellä olevista altistetuista rinnakkaisnäytteistä poistumavaihetta varten astioihin, joissa on puhdasta maata (ei suolen tyhjennystä), maa- ja matonäytteet liuotinkontrolleista
	Esialtistustoimet (tasapainovaihe) on ajoitettava testikemikaalin ominaisuuksien mukaan
	Päivänä 3 kuvatut toimet tehdään päivittäin (vähintään kaikkina arkipäivinä).

Lisäys 4

Keinomaan valmistus- ja säilytyssuosituksia

Koska tietystä lähteestä peräisin olevaa luonnonmaata ei välttämättä ole saatavana vuoden ympäri ja koska luonnonmaan sisältämät organismit ja mikrosaasteet voivat vaikuttaa testiin, tässä testissä on suositeltavaa käyttää keinomaata, joka on kuvattu tämän liitteen luvussa C.8 Myrkyllisyystutkimus madoilla (48). Useat testilajit pystyvät elämään, kasvamaan ja lisääntymään tässä keinomaassa, ja testi- ja viljelyolosuhteiden yhdenmukaisuus on mahdollisimman suuri sekä laboratorion sisällä että laboratorioiden välillä.

Maan ainesosat

Turve:	10 %	Rahkasuoturve OECD:n ohjeen 207 (48) mukaisesti
Kvartsihiekka:	70 %	Teollinen kvartsihiekka (ilmakuivattu), raekoko: yli 50 prosenttia hiukkasista on oltava 50–200 µm, mutta kaikkien hiukkasten on oltava alle ≤ 2 mm
Kaoliniittisavi:	20 %	Kaoliniittipitoisuus ≥ 30 %
Kalsiumkarbonaatti:	≤ 1 %	$CaCO_3$, jauhettu, kemiallisesti puhdas

Haluttaessa keinomaan orgaanisen hiilen pitoisuutta voidaan pienentää esimerkiksi laskemalla turpeen määrän 4–5 prosenttiin kuivamaasta ja lisäämällä hiekan määrää vastaavasti. Kun orgaanisen hiilen pitoisuus pienenee, testikemikaalin adsorboituminen maahan (orgaaniseen hiileen) saattaa heikentyä ja testikemikaalin saatavuus madoille nousta (74). On osoitettu, että *Enchytraeus albidus* ja *Eisenia fetida* täyttävät lisääntymiskriteerit, kun luonnonmaan orgaanisen hiilen pitoisuus on matala, esim. 2,7 prosenttia (33), (60). Kokemuksen mukaan sama saadaan aikaan keinomaassa käyttämällä 5 prosenttia turvetta.

Valmistelut

Maan kuivat ainesosat sekoitetaan perusteellisesti (esim. suurella laboratoriosekoittimella). Tämä tehdään noin viikko ennen testin alkua. Sekoitetun kuivamaan ainekset kostutetaan deionisoidulla vedellä vähintään 48 tuntia ennen testattavan aineen lisäämistä, jotta happamuus ehtii vakiintua. pH-määritystä varten käytetään maan ja 1 M KCl -liuoksen sekoitusta suhteessa 1:5. Jos pH-arvo ei ole vaaditulla alueella (6,0 ± 0,5), maahan lisätään riittävä määrä $CaCO_3$:ta tai valmistetaan uusi maaerä.

Keinomaan suurin mahdollinen vedensitomiskyky (WHC) määritetään standardin ISO 11268-2 (35) mukaisesti. Vähintään kaksi vuorokautta ennen testin aloittamista kuiva keinomaa kostutetaan lisäämällä deionisoitua tai synteettistä vettä, kunnes vesipitoisuus on noin puolet lopullisesta. Lopullisen vesipitoisuuden on oltava 40–60 prosenttia suurimmasta mahdollisesta vedensitomiskyvystä (WHCmax). Testin alussa esikostutettu maa jaetaan yhtä moneen erään kuin testissä käytetään pitoisuuksia ja kontrolleja, ja kosteuspitoisuus säädetään 40–60 prosenttiin WHC_{max}-arvosta testattavan aineen liuoksella ja/tai lisäämällä deionisoitua tai synteettistä vettä. Kosteuspitoisuus määritetään testin alussa ja lopussa (lämpötilassa 105 °C). Kosteuspitoisuuden on oltava optimaalinen lajeille. Kosteuspitoisuuden voi tarkistaa myös seuraavasti: kun maata puristetaan varovasti käsin, sormien välissä pitäisi näkyä pieniä vesipisaroita.

Säilytys

Keinomaan kuivia ainesosia voidaan säilyttää huoneenlämmössä käyttöön asti. Valmistettua, esikostutettua maata voidaan säilyttää viileässä enintään kolme vuorokautta ennen testiaineen lisäämistä. Veden haihtumista on ehkäistävä. Kun maahan on lisätty testiaine, maa on käytettävä heti, ellei ole tiedossa, että tiettyä maata voidaan säilyttää ilman, että se vaikuttaa testattavan aineen toksisuuteen ja biologiseen hyötyosuuteen. Näytteitä maasta, johon testiainetta on lisätty, voidaan säilyttää kyseisen testiaineen suositelluissa säilytysolosuhteissa analyysiin saakka.

Lisäys 5

Maalla elävien harvasukasmatojen lajit, joita suositellaan maan biokertyvyystestejä varten

Lierot

Suositeltu testilaji on *Eisenia fetida* (Savigny 1826), joka kuuluu Lumbricidae-heimoon. Vuodesta 1972 lähtien on erotettu kaksi alalajia *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* (10). Jaeniken (36) mukaan ne ovat aidosti eri lajeja. *Eisenia fetida* on helppo tunnistaa segmenttien kirkkaankeltaisista väleistä, kun taas *Eisenia andrei* on yhtenäisen tummanpunainen. Ne ovat todennäköisesti kotoisin Mustanmeren alueelta. Nykyisin ne ovat levinneet ympäri maailmaa ja etenkin ihmisen muokkaamiin elinympäristöihin, kuten tunkioihin. Kumpaakin lajia voidaan käyttää ekotoksikologisissa ja biokertyvyystesteissä.

Eisenia fetidaa ja *Eisenia andreita* myydään kaupallisesti esim. kalansyötiksi. Niiden elinaika on lyhyt verrattuna muihin *Lumbricidae*-heimon lieroihin, ja ne tulevat sukukypsiksi noin 2–3 kuukauden iässä (huoneenlämmössä). Optimaalinen lämpötila on noin 20–24 °C. Lierot elävät mieluiten kosteassa alustassa, jonka pH on lähes neutraali ja joka sisältää paljon orgaanista ainesta. Koska näitä lajeja on käytetty yleisesti standardoiduissa ekotoksikologisissa testeissä noin 25 vuoden ajan, niiden kasvattaminen on vakiintunutta (48) (77).

Kumpaakin lajia voidaan kasvattaa hyvin erilaisissa eläinjätteissä. ISO:n suosittelema kasvatusalusta (35) on hevosen- tai lehmälantaa ja turvetta suhteessa 50:50. Kasvatusalustan pH-arvon on oltava noin 6–7 (sitä säädellään kalsiumkarbonaatilla). Ionisen johtavuuden on oltava matala (alle 6 mS/cm tai suolapitoisuus alle 0,5 %) eikä kasvatusalustassa saa olla liikaa ammoniakkia tai eläinten virtsaa. Kaupallista puutarhamultaa, joka ei sisällä lisäaineita, OECD:n mukaista keinomaata (48) tai näiden kahden sekoitusta suhteessa 50:50 voidaan myös käyttää. Alustan on oltava kostea mutta ei liian märkä. Kasvatuslaatikon soveltuva koko on 10–50 litraa.

Jotta saadaan vakioikäisiä ja -painoisia matoja, viljelmä on paras aloittaa munakoteloilla. Munakoteloita saadaan lisäämällä aikuisia matoja kasvatuslaatikkoon, jossa on tuoretta substraattia. Käytännön kokemus on osoittanut, että hyvä jälkeläistuotto saavutetaan, kun matojen tiheys on noin 100 aikuista matoa substraattikiloa (märkäpaino) kohden. Aikuiset madot poistetaan 28 vuorokauden kuluttua. Munakoteloista kuoriutuneita lieroja käytetään testaukseen, kun ne ovat sukukypsiä vähintään 2 kuukauden mutta alle 12 kuukauden kuluttua.

Edellä kuvattujen lajien matoja voidaan pitää terveinä, jos ne liikkuvat alustassa mutta eivät yritä lähteä siitä pois ja lisääntyvät jatkuvasti. Hyvin hidas liikkuminen tai keltainen peräpää (*Eisenia fetida* -lajilla) viittaa substraatin ehtymiseen. Tällöin on suositeltavaa lisätä tuoretta substraattia ja/tai vähentää eläinten määrää laatikossa.

Valikoitua lisäviitemateriaalia

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. Teoksessa: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. s. 331–338.

Änkyrimadot

Suositeltava laji on *Enchytraeus albidus*, Henle 1837. *Enchytraeus albidus* on nivelmatojen pääjakson harvasukasmatojen alaluokan *Enchytraeidae*-heimon suurimpia lajeja (jopa 15 mm), ja se on levinnyt ympäri maailmaa, esim. (8). *Enchytraeus albidusta* esiintyy merellisissä, limnisissä ja maaluontotyypeissä lähinnä hajoavassa orgaanisessa aineessa (levä, komposti) ja harvoin niityillä (42). Tämä laaja ekologinen sietokyky ja eräät morfologiset variaatiot viittaavat siihen, että lajista saattaa olla eri rotuja.

Enchytraeus albidusta myydään kaupallisesti kalanruoaksi. On tarkistettava, ettei viljelmä ole kontaminoitunut jollakin, yleensä pienemmällä lajilla (60). Jos kontaminaatiota ilmenee, kaikki madot on pestävä vedellä petrimaljassa. Sen jälkeen aikuiset *Enchytraeus albidus* -madot valitaan (stereomikroskoopilla) uuden viljelmän perustamista varten. Kaikki muut

madot hävitetään. Näiden matojen elinikä on lyhyt, sillä kypsyyden saavuttaminen kestää 33 vuorokaudesta (18 °C:n lämpötilassa) 74 vuorokauteen (12 °C:n lämpötilassa). Testiin saa käyttää ainoastaan viljelmiä, joita on säilytetty ongelmitta laboratoriossa vähintään 5 viikkoa (yhden sukupolven).

Muut *Enchytraeus*-suvun lajit ovat myös soveltuvia, ja etenkin *Enchytraeus luxuriosus*. Tämä laji on todellinen maaeläjä, ja se on kuvattu äskettäin (65). Jos käytetään muita *Enchytraeus*-lajeja, ne on tunnistettava selvästi ja lajin valintaperusteet on raportoitava.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) -laji kuuluu samaan ryhmään kuin *Enchytraeus luxuriosus*. Sitä ei ole varmuudella todettu kentällä, vaan lajia on kuvattu vain lieroviljelmissä ja komposteissa (Römbke 2003). Siksi lajin alkuperäisiä ekologisia vaatimuksia ei tunneta. Tuoreet laboratoriotutkimukset erilaisissa maaperissä ovat kuitenkin vahvistaneet, että tällä lajilla on laaja sietokyky maan ominaisuuksille, kuten pH:lle ja koostumukselle (Jänsch *et al.* 2005). Tätä lajia on käytetty viime vuosina usein ekotoksikologisissa tutkimuksissa helpon kasvatuksen ja testauksen vuoksi (esim. Kuperman *et al.* 2003). Madot ovat kuitenkin pieniä, (3–12 mm, keskimäärin 7 mm) (Westheide & Müller 1996), joten niitä on vaikeampi käsitellä kuin *Enchytraeus albidus* -lajia. Kun tätä lajia käytetään *Enchytraeus albiduksen* sijaan, testiastia voi haluttaessa olla pienempi. Lisäksi on otettava huomioon, että tämä laji lisääntyy erittäin nopeasti. Generaatioaika on alle 20 vuorokautta lämpötilassa 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999), ja vielä lyhyempi tätä korkeammassa lämpötilassa.

Enchytraeus albidus -lajin änkyrimatoja (sekä muita *Enchytraeus*-lajeja) voidaan kasvattaa suurissa muovilaatikoissa (esim. 30 × 60 × 10 cm tai 20 × 12 × 8 cm pienikokoisille madoille), joissa on keinomaan ja kaupallisen, kontaminoitumattoman ja lisäaineettoman puutarhamullan seosta. Kompostiainesta on vältettävä, sillä se voi sisältää myrkyllisiä kemikaaleja, kuten raskasmetalleja. Kasvatusmaasta on poistettava eläimistö pakastamalla se kolme kertaa ennen käyttöä. Puhdasta keinomaata voidaan myös käyttää, mutta lisääntymisnopeus voi olla hitaampi kuin sekoitetuissa substraateissa. Substraatin pH-arvon on oltava 6,0 ± 0,5. Viljelmää pidetään inkubaattorissa lämpötilassa 15 ± 2 °C ilman valoa. Yli 23 °C:n lämpötilaa on vältettävä. Keino- tai luonnonmaan on oltava kosteaa, mutta ei märkää. Kun maata painetaan kevyesti kädellä, näkyviin pitäisi tulla vain pieniä vesipisaroita. Hapettomia olosuhteita on aina vältettävä (jos esimerkiksi käytetään kantta, kannessa on oltava tarpeeksi reikiä, jotta ilmanvaihto on riittävää). Kasvatusmaa on ilmastettava sekoittamalla sitä varovasti kerran viikossa.

Madot ruokitaan vähintään kerran viikossa ruokahalun mukaisesti kaurahiutaleilla, jotka pannaan koloon maanpinnan alle ja peitetään maalla. Jos astiassa on jäljellä edellisellä ruokintakerralla annettua ruokaa, ruoanmäärää säädetään vastaavasti. Jos jäljellä olevassa ravinnossa kasvaa sientä, vaihda kaurahiutaleet uusiin. Lisääntymistä voi stimuloida antamalla kaurahiutaleiden lisäksi kaupallista vitaminoitua proteiinijauhetta kahden viikon välein. Kolmen kuukauden kuluttua eläimet siirretään vasta valmistettuun viljelmään tai kasvatusalustaan. Kaurahiutaleet, joita säilytetään suljetuissa astioissa, on käsiteltävä autoklaavissa tai kuumennettava ennen käyttöä, jotta infektiot ja jauhopunkit (esim. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) tai petopunkit (esim. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina) voidaan välttää. Ruoka jauhetaan desinfioinnin jälkeen, jotta se on helppo levittää maan pinnalle. Muita mahdollisia ravinnonlähteitä ovat leivontahiiva tai TetraMin®-kalanruoka.

Kasvatusolosuhteet ovat yleensä riittävän hyvät, jos madot eivät yritä poistua substraatista, madot liikkuvat maassa nopeasti, matojen ulkopinta on kiiltävä ja siihen on tarttunut maahiukkasia, madot ovat vaaleita ja näkyvissä on eri ikäisiä matoja. Matoja voidaan pitää terveinä, jos ne lisääntyvät jatkuvasti.

Valikoitua lisäviitemateriaalia

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitroheterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W ja Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W ja Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.”